



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA A COMPETÊNCIA
OVOCITÁRIA EM CÉLULAS DO CUMULUS BOVINAS**

DANIELLE DE MOURA CORDEIRO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA A COMPETÊNCIA
OVOCITÁRIA EM CÉLULAS DO CUMULUS BOVINAS**

ALUNO: Danielle de Moura Cordeiro

ORIENTADOR: Margot Alves Nunes Dode

PUBLICAÇÃO: 50D/2011

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF

DEZEMBRO DE 2011

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CORDEIRO, D. M. **Identificação de marcadores moleculares para a competência ovocitária em células do cumulus bovinas**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 136 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando a reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

CORDEIRO, D. M. **Identificação de marcadores moleculares para a competência ovocitária em células do cumulus bovinas**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 136 p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011.

1. Expressão gênica. 2. Células do cumulus. 3. Ovócito. 4. Bovino.

CDD ou CDU

Agris / FAO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA A COMPETÊNCIA
OVOCITÁRIA EM CÉLULAS DO CUMULUS BOVINAS**

DANIELLE DE MOURA CORDEIRO

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD, (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) E-mail: margot@cenargen.embrapa.br (ORIENTADOR)

IVO PIVATO, Doutor, (Universidade de Brasília) E-mail: pivato@unb.br (EXAMINADOR INTERNO)

MARCIO JOSÉ POÇAS-FONSECA, Doutor, (Universidade de Brasília) E-mail: mpossas@unb.br (EXAMINADOR EXTERNO)

ROSANGELA VIEIRA DE ANDRADE, Doutora, (Universidade Católica de Brasília) E-mail: rosangelav@ucb.br (EXAMINADOR EXTERNO)

EDUARDO DE OLIVEIRA MELO, Doutor, (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) E-mail: comelo@gmail.com (EXAMINADOR EXTERNO)

MAURÍCIO MACHAIM FRANCO, Doutor (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) E-mail: mfranco@cenargen.embrapa.br (SUPLENTE)

BRASÍLIA, 01 DE DEZEMBRO DE 2011.

“Tudo posso nAquele que me fortalece”

(Filipenses 4,13),

dedico...

Aos meus pais, Herondina e Newton (*in memoriam*), pela paciência, bondade, apoio incondicional e eterno amor que sempre me dedicaram.

Ao meu esposo Fernando, que apesar da distância não mediu esforços para estar sempre presente durante este longo tempo de espera.

Às minhas filhotas Lorenza e Lauren por serem meus diplomas de mãe e por encherem a minha vida de beleza, alegria e aprendizado.

Aos meus tios, pela confiança, alegria e carinho com que sempre me acolhem. Em especial, Tia Jô e Tio Air pelo amor, apoio e encorajamento em todos os momentos e situações.

Aos meus queridos primos e amigos pela confiança, entusiasmo e o apoio de sempre.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Dra. Margot Alves Nunes Dode**, agradeço pela acolhida, pela oportunidade, apoio e consideração que sempre me dispensou. A sua competência e segurança foram fundamentais para esta conquista. Doutora, sou-lhe sinceramente grata.

À **UnB** pela oportunidade concedida para realização deste trabalho.

À **Universidade Católica de Brasília** pelo apoio concedido para realização deste trabalho.

Ao meu chefe, **Profº Ruy de Araújo Caldas** pela compreensão, apoio, bondade e exemplo durante todos estes anos de convivência.

Aos **amigos e colegas de trabalho** pela compreensão e encorajamento recebidos.

À **Embrapa-Cenargen** pela oportunidade concedida para realização deste trabalho.

Ao **Eduardo** pela oportunidade, colaboração e boa vontade dispensadas para a concretização deste curso.

Ao **Maurício** pela colaboração e experiência científica transmitida.

Ao **Rodolfo** pela amizade e oportunidades concedidas para a minha formação no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cenargen.

À **Rosana** pela grande colaboração e pela eficiência com que me auxiliou na realização deste trabalho.

À **Isabela, Sidney e Ana Luíza** pela grande colaboração, bondade e disposição.

Aos **amigos e colegas do Laboratório** pela colaboração e encorajamento.

A **todos**, meu muito obrigado!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACOES	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivo geral	4
1.2 Objetivos específicos	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Ovogênese e foliculogênese	5
2.2 Maturação e competência ovocitária	9
2.3 Importância das células do cumulus na aquisição da competência ovocitária	14
2.4 Estudos da expressão de genes associados à competência ovocitária	18
2.5 Genes selecionados para validação em células do cumulus	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DE TRANSCRITOMA DE CÉLULAS DO CUMULUS BOVINAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE GENES MARCADORES DA COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA	51
1 RESUMO	52
2 ABSTRACT	53
3 INTRODUÇÃO	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Delineamento experimental	56
4.2 Recuperação e seleção dos complexos cumulus-ovócitos	56
4.3 Armazenamento das células do cumulus	58
4.4 Análise de microarranjo	58
4.4.1 Extração de RNA	58
4.4.2 Amplificação de RNA total, síntese do cDNA e hibridação dos microarranjos	59

4.4.3 Análises dos resultados dos microarranjos, função molecular dos genes diferencialmente expressos e correlação de processos biológicos	60
4.5 Análise estatística	61
5 RESULTADOS	62
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÕES	85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DE GENES EM CÉLULAS DO CUMULUS BOVINAS: POTENCIAIS MARCADORES DA COMPETÊNCIA OVÓCITÁRIA	93
1 RESUMO	94
2 ABSTRACT	95
3 INTRODUÇÃO	96
4 MATERIAL E MÉTODOS	98
4.1 Delineamento experimental	98
4.2 Recuperação e seleção dos complexos cumulus-ovócitos	98
4.3 Armazenamento das células do cumulus	99
4.4 Validação dos genes por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	100
4.4.1 Extração de RNA total e transcrição reversa	100
4.4.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	101
4.5 Análise estatística	103
5 RESULTADOS	104
6 DISCUSSÃO	107
7 CONCLUSÕES	114
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
CAPÍTULO 4 -	122
1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
ANEXOS	125
1 ANEXO A – RELAÇÃO DE GENES	126

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Capítulo 1	
1.1 – Morfologia de um folículo terciário ou De Graaf	8

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Capítulo 2	
2.1 - A. Complexo cumulus-ovócito (COC) bovino. B. Folículos ovarianos bovinos de diferentes tamanhos	57
2.2 - NUSE - Erros-padrão não-escalados normalizados (<i>Normalized Unscaled Standard Errors</i>). Estimativas do erro padrão obtidas para cada gene em cada arranjo pelo modelo de sumarização (RMA)	64
2.3 - Número total de genes menos e mais expressos em células do cumulus bovinas isoladas a partir de pools de COCs obtidos de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de folículos de 1-3 mm de diâmetro ($P < 0,05$), submetidas à análise de microarranjo	65
2.4 - Plotagem da dispersão dos transcritos de células do cumulus bovinas testados em relação à significância, $-\log_{10}$ (valor de P), e as diferenças de expressão gênica entre os folículos de 1-3 mm e $\geq 8,1$ mm, Log 2 (<i>fold change</i>)	65
2.5 - Classificação funcional de genes menos e mais expressos em células do cumulus bovinas de folículos $\geq 8,1$ mm de diâmetro comparados aos folículos de 1-3 mm, de acordo com KEGG (<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)	68
2.6 - Via metabólica 1 (VM1) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ <i>fold change</i>) e menos ($\leq 2,5$ <i>fold change</i>) expressos em células do cumulus bovinas provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis)	75
2.7 - Via metabólica 2 (VM 2) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ <i>fold change</i>) e menos ($\leq 2,5$ <i>fold change</i>) expressos em células do cumulus bovinas provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity	76

Pathways Analysis)

- 2.8 - Via molecular de sinalização de interferon gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovinas provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis) 77
- 2.B.9 - Via metabólica 3 (VM 3) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis) 131
- 2.B.10 - Via metabólica 4 (VM 4) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis) 132
- 2.B.11 - Via metabólica 5 (VM 5) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis) 133
- 2.B.12 - Via metabólica 6 (VM 6) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis) 134
- 2.B.13 - Via metabólica 7 (VM 7) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis) 135
- 2.B.14 - Via metabólica 8 (VM 8) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold 136

change) e menos ($\leq 2,5$ *fold change*) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis)

2.B.15 – Via metabólica 9 (VM 9) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ *fold change*) e menos ($\leq 2,5$ *fold change*) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis) 137

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Capítulo 2	
2.1 - Análise de qualidade de RNA total extraído das amostras	62
2.2 - Lista de genes com expressão aumentada em células do cumulus bovinas provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm de diâmetro comparado aos folículos de 1-3 mm de diâmetro	69
2.3 - Lista de genes com expressão diminuída em células do cumulus bovinas provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm de diâmetro comparados aos folículos de 1-3 mm de diâmetro	73
2.A.1 - Relação de genes diferencialmente expressos em células do cumulus bovinas provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com a classificação funcional IPA (<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>)	127

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Capítulo 3	
3.1 - Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real	103
3.2 - Nível de transcritos dos ARHGAP22, COL18A1 e GPC4 analisados por PCR em tempo real em células do cumulus bovinas de complexos-cumulus ovócitos oriundos de diferentes tamanhos de folículos (1-3; 6-8 e $\geq 8,1$ mm). Cada grupo foi analisado utilizando-se 4 pools de amostras e avaliados em três réplicas. Os dados (média \pm EPM) foram normalizados pelo gene GAPDH e expressos em relação à amostra controle, por meio do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência	105
3.3 - Nível de transcritos dos genes FGF11, IGFBP4 e SPRY1 analisados por PCR em tempo real em células do cumulus bovinas oriundas de ovócitos de diferentes tamanhos de folículos (1-3; 6-8 e $\geq 8,1$ mm). Cada grupo foi analisado utilizando-se 4 pools de amostras e avaliados em três réplicas. Os dados (média \pm EPM) foram normalizados pelo gene GAPDH e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência	106

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Capítulo 3	
3.1 - Sequência <i>primers</i> específicos para os genes mais e menos expressos e constitutivo, tamanho do fragmento em pb (pares de base), temperatura de anelamento e concentração	102

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACOES

AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância
ARHGAP22	proteína ativadora de GTPase Rho 22
BMP15	proteína morfogenética óssea 15
CC	células do cumulus
CG	células da granulosa
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementar
COC	complexo cumulus-ovócito
COL18A1	colágeno XVIII A1
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
EPM	erro padrão da média
F	<i>primer forward</i>
FGF11	fator de crescimento de fibroblastos 11
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDF9	fator de crescimento e diferenciação 9
GPC4	glicana 4
ICSI	injeção de espermatozóide intracitoplasmática
IGFBP4	proteína ligadora de IGF 4
IPA	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LH	hormônio luteinizante

NUSE	<i>Normalized Unscaled Standard Errors</i>
pb	pares de base
PBS	solução salina em tampão fosfato
PIVE	produção <i>in vitro</i> de embriões
qPCR	reação em cadeia pela polimerase quantitativa em tempo real
R	<i>primer reverse</i>
RIN	número de integridade do RNA
RLE	<i>Relative Log Expression</i>
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
ncRNA	ácido ribonucléico não-codante
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
RT	transcrição reversa
SFB	soro fetal bovino
SPRY1	<i>sprouty</i> homólogo 1, antagonista da sinalização de FGF (<i>Drosophila</i>)
TGFβ	fator de crescimento e transformação beta
TRA	tecnologia de reprodução assistida
VM1	via metabólica 1
VM2	via metabólica 2

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA A COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM CÉLULAS DO CUMULUS BOVINAS

Autor: Danielle de Moura Cordeiro

Orientador: Margot Alves Nunes Dode

As células do cumulus exercem um importante papel durante o crescimento do ovócito, maturação, ovulação e fecundação e, portanto, influenciam a qualidade do ovócito. Com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos em células do cumulus (CC) bovinas foi realizado a análise de microarranjo, utilizando complexos cumulus-ovócitos (COCs) com diferentes graus de competência. Para isso foi utilizado o modelo do tamanho de folículo em que COCs competentes foram recuperados de folículos $\geq 8,1$ mm e incompetentes de folículos de 1-3 mm de diâmetro. Nessa análise, foram identificados 4.178 genes diferencialmente expressos ($P < 0,05$) nas duas categorias de CCs. Dentre os genes diferencialmente expressos utilizou-se um critério de corte adicional em que somente aqueles com $2,5x$ *fold* para mais ou menos foram considerados. Foi, então, gerada uma lista preliminar de 143 genes mais expressos e 80 genes menos expressos em CCs de folículos competentes em relação aos incompetentes, que poderiam possivelmente estar envolvidos com a aquisição da competência ovocitária. Esses genes foram investigados de acordo com suas respectivas funções celulares e a maioria deles foi classificada como relacionados às funções do ciclo celular, ovulação e inflamação, reparo de DNA, metabolismo de energia, metabolismo de aminoácidos, sinalização celular e meiose. Três vias moleculares

envolvendo esses genes foram discutidas. Seis desses genes candidatos a potenciais marcadores (FGF11, IGFBP4, SPRY1, ARHGAP22, COL18A1 e GPC4) foram selecionados para validação por qPCR em células do cumulus obtidas de folículos de 1-3, 6-8 e $\geq 8,1$ mm de diâmetro. Dos genes validados, três deles (COL18A1, GPC4 e IGFBP4) confirmaram a expressão diferencial detectada no microarranjo ($P < 0,05$). Entretanto, somente o GPC4 apresentou expressão diferencial entre os folículos mais competentes, 6-8 e $\geq 8,1$ mm, em relação aos menos competentes de 1-3 mm, podendo, portanto, ser utilizado como marcador para prever a competência dos ovócitos.

Palavras Chave: expressão gênica, células do cumulus, competência ovocitária

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS FOR OOCYTE COMPETENCE IN BOVINE CUMMULUS CELLS

Author: Danielle de Moura Cordeiro

Adviser: Margot Alves Nunes Dode

Cumulus cells have an important role during oocyte growth, maturation, ovulation and fertilization. Therefore they influence oocyte quality. In an attempt to identify genes differentially expressed in bovine cumulus cells (CC) of different competence, microarray analysis was performed. The model of follicle size in which competent cumulus-oocyte-complexes (COCs) were recovered from follicles ≥ 8.1 mm and incompetent from follicles 1-3 mm in diameter was used. In this analysis, we identified 4,178 genes differentially expressed ($P < 0.05$) in the two categories of CCs. In addition to P value we set a cut-off value of 2.5 fold change in gene expression for up or down. Based on those criteria a preliminary list was produced with 143 genes up and 80 genes down regulated, respectively, in CCs of competent follicles in relation to incompetent ones. These genes were investigated according to their cellular functions and most of them were classified as related to the cell cycle, ovulation and inflammation, DNA repair, energy metabolism, metabolism of amino acids, cell signaling and meiosis. Three molecular pathways involving these genes were discussed. Six candidate genes (FGF11, IGFBP4, SPRY1, ARHGAP22, and COL18A1 GPC4) were selected for validation by qPCR in cumulus cells of follicles 1-3, 6-8 and ≥ 8.1 mm in diameter. Among the selected genes, three of them (COL18A1, GPC4 and IGFBP4) confirmed the differential expression detected in the microarray ($P < 0,05$). However, only

GPC4 showed differential expression between competent follicles, 6-8 and ≥ 8.1 mm when compared to 1-3 mm. These markers can be used to predict oocyte competence.

Key Words: gene expression, cummulus cells, oocyte competence

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* é uma importante tecnologia reprodutiva que gera ovócitos maduros que são capazes de suportar o desenvolvimento do embrião para serem utilizados em técnicas de reprodução assistida (TRAs). Com o uso crescente dessas técnicas existe um grande incentivo clínico e comercial para melhorar a eficiência da maturação *in vitro* que, apesar de inúmeros estudos terem sido realizados, ainda continua ineficiente (Assidi et al., 2008). No que se refere a humanos, as TRAs oferecem possibilidades, por exemplo, de tratamento para casais inférteis por meio de procedimentos que incluem a seleção de gametas competentes para fecundação e a produção de embriões viáveis (Balaban & Urman, 2006). Já no que se refere aos animais domésticos, a seleção de ovócitos de qualidade é de grande importância para as técnicas de produção *in vitro* de embriões (PIVE), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferência nuclear, transgenese, dentre outras tecnologias emergentes. Portanto, considerando que somente ovócitos competentes têm a capacidade de promover um desenvolvimento embrionário normal, o sucesso da PIVE e demais TRAs, tanto em humanos como animais, depende da disponibilidade de ovócitos competentes.

A competência ovocitária é progressivamente adquirida durante os estágios finais da foliculogênese, por meio de várias mudanças celulares e moleculares que conferem ao ovócito a capacidade de completar a divisão meiótica e prosseguir o seu desenvolvimento (Coticchio et al., 2004). Um desafio crítico é entender em que consiste essa competência e os mecanismos que a governam (Gilchrist & Thompson, 2007) e, desta forma, proporcionar alternativas para obtenção de ovócitos mais competentes.

Muitas tentativas têm sido utilizadas para identificar as diferenças entre ovócito competentes e incompetentes, tais como a avaliação dos aspectos celulares, como número e compactação das CCs, aspecto do citoplasma, morfologia do ovócito, tamanho do folículo,

momento da clivagem, idade da doadora, quantidade e distribuição de organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias e grânulos corticais, avaliação dos transcritos necessários para as fases iniciais de desenvolvimento, análise da expressão global de genes, dentre outros. Entretanto, essas abordagens ou são insuficientes para prever a competência de desenvolvimento, ou são invasivas e inviabilizam a utilização posterior do ovócito, havendo, portanto, a necessidade de se identificar outras metodologias para selecionar ovócitos de qualidade.

Desde que os ovócitos de mamíferos se desenvolvem no microambiente folicular, circundado pelas células do cumulus, estas células exercem seus efeitos diretamente no ovócito. De fato, as células do cumulus suportam a maturação ovocitária, facilitam o transporte do ovócito dentro do oviduto durante a ovulação e, além disso, orquestram o mecanismo complexo que controla a interação espermatozóide-ovócito, sendo essenciais para os processos de aquisição da competência (Tanghe, 2002). As comunicações bi-direcionais entre esses dois grupos celulares estabelecem uma interdependência de tal forma que os ovócitos dependem da presença das células foliculares que enviam sinais estimulando seu crescimento e maturação, e as células foliculares dependem de fatores secretados pelo ovócito para seu crescimento e funcionamento (Gilchrist et al., 2004; Taft et al., 2002). Portanto, o estudo da expressão de genes em folículos, incluindo cumulus e ovócitos, pode contribuir para um melhor entendimento da maturação e a eficiência na aquisição da competência ovocitária (Lonergan et al., 2003). Além disso, a elucidação das vias de sinalização envolvidas na comunicação entre o ovócito e células do cumulus durante a maturação podem auxiliar no melhor entendimento da origem dos distúrbios na maturação do ovócito, envolvidos na redução da fertilidade (Assidi et al., 2008).

Considerando-se que as células do cumulus são normalmente descartadas durante os procedimentos de coleta do ovócito, e que elas podem refletir o potencial de fertilidade, a análise da expressão de genes nessas células está emergindo como uma nova abordagem para os estudos da competência (Hamel et al., 2008; Assidi et al., 2008). Por representar um método não-invasivo para avaliar a qualidade do ovócito, o estudo dessas células é interessante para a identificação de potenciais biomarcadores. Portanto, o presente estudo visou a identificar, em células do cumulus, por meio da análise de expressão gênica em larga escala, genes candidatos a marcadores para competência ovocitária em bovinos.

1.1 Objetivo Geral

Identificar nas células do cumulus genes envolvidos com a competência ovocitária em bovinos.

1.2 Objetivos Específicos

a) Identificar pela tecnologia de microarranjo de alta densidade, genes diferencialmente expressos em células do cumulus provenientes de folículos incompetentes e competentes;

b) Quantificar nas células do cumulus a abundância de transcritos dos genes mais expressos – fator de crescimento de fibroblasto 11 (FGF11), proteína ligante de fatores de crescimento semelhante à insulina 4 (IGFBP4), *sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)* (SPRY1) e dos menos expressos – proteína ativadora de GTPase Rho 22 (ARHGAP22), colágeno XVIII (COL18A1) e glicana 4 (GPC4), candidatos a marcadores para competência ovocitária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovogênese e Folículogênese

O processo de formação, desenvolvimento e maturação do ovócito é denominado de ovogênese e conforme descrito por Russe (1983) consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais até o estágio de ovócito haplóide fecundado.

Em bovinos, por volta do 40º dia de gestação, ocorre a migração das células germinativas primordiais do saco vitelínico para a região das gônadas primitivas. Durante a migração, as células germinativas primordiais multiplicam-se ativamente e após chegarem no local do ovário em formação, se diferenciam em ovogônias (Gordon, 1994). Essas ovogônias ainda sofrerão sucessivas mitoses e, posteriormente, entrarão na meiose I, sendo então chamados de ovócitos primários. Os ovócitos, após iniciarem o processo de divisão meiótica ficam retidos no estágio de prófase I (Austin & Short, 1982; Soto-Suazo & Zorn, 2005; van den Hurk & Zhao, 2005). Portanto, em mamíferos, no momento do nascimento todos os ovócitos estocados nos ovários encontram-se no estágio de prófase I da primeira divisão meiótica (Hafez & Hafez, 2004; Wang & Sun, 2007).

A foliculogênese em mamíferos é associada à ovogênese (Hafez & Hafez, 2004) e, apesar de serem processos distintos, são interdependentes. A foliculogênese é um evento também iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, que pode ser definido como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, começando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo de De Graaf ou pré-ovulatório (van den Hurk & Zhao, 2005).

Nos folículos primordiais, o ovócito é circundado por uma única camada de células achatadas da pré-granulosa (Fair, 2003) e logo que o estoque de folículos primordiais é estabelecido, inicia-se o crescimento que ocorre somente em um grupo de folículos de cada vez. O crescimento folicular é um processo contínuo durante toda a vida reprodutiva (Austin & Short, 1982).

A reserva folicular ovariana é composta por folículos primordiais, que podem ou não continuar o desenvolvimento e maturação. A maioria (milhares) deles sofrerá degeneração (atresia), outros serão ativados e continuarão o seu desenvolvimento (Fortune, 2003) e apenas uns poucos (centenas) chegarão a ovular.

A ativação do crescimento folicular em bovinos consiste de um balanço entre fatores inibitórios e estimulantes de origem local e/ou sistêmica que provavelmente regulam a ativação dos folículos primordiais. O hormônio anti-Mulleriano é conhecido por inibir a ativação dos folículos primordiais, enquanto outros membros da família dos fatores de crescimento de transformação beta (TGF β), como as ativinas, BMPs e GDF9, dentre outros, estão implicados na regulação da ativação desses folículos (van den Hurk & Zhao, 2005).

A transição de folículo primordial para primário é observada quando a única camada de células da granulosa ao redor do ovócito torna-se cubóide, com aumento no número de células formando o folículo primário (Hulshof et al., 1992; Fair, 2003). A progressão para o estágio de folículo secundário é caracterizada pelo aparecimento de uma segunda camada de células da granulosa (Driancourt, 1991), que se torna mais proliferativa e se desenvolve aumentando em número (van den Hurk & Zhao, 2005). Além disso, durante essa fase, ocorre a deposição inicial do material da zona pelúcida ao redor do ovócito (Fair, 1997a; 2003) e a formação dos grânulos corticais no citoplasma (Fair et al., 1997a). É durante a fase de folículo secundário que o folículo parece tornar-se responsivo às gonadotrofinas (Xu et al., 1995; Bao & Garverik, 1998) e também está associada com os primeiros sinais detectáveis de síntese de RNA (Fair et al., 1997b).

Durante todo o período de desenvolvimento folicular o ovócito permanece retido de estágio de diplóteno da prófase I. Entretanto, o seu crescimento continua, com aumento no volume e várias alterações estruturais e bioquímicas (Warsaman & Albertini, 1994). Uma complexa organização citoplasmática ocorre, incluindo a modificação e redistribuição das organelas existentes (Picton et al., 1998). Junto com o grande aumento da síntese de RNA e proteína, o número de ribossomos, mitocôndrias e outras organelas celulares também aumenta durante o crescimento do ovócito (Dieleman et al., 2002). O acúmulo de numerosas vesículas, grânulos de glicogênio, proteínas, gotas de lipídeos e corpos

multivesiculares é um indicativo de estocagem e transporte molecular através da membrana do ovócito (Soyal et al., 2000; Dieleman et al., 2002).

A transição para folículo terciário é caracterizada pela continuada proliferação e diferenciação das células circundantes do ovócito em teca interna e externa e das células do cumulus, bem como, a formação de cavidade antral pelo acúmulo de fluido folicular (Driancourt, 1991; Gordon 1994) (Figura 1.1). Os ovócitos em estágio de folículos terciários iniciais ainda são transcricionalmente ativos, o que continua até o folículo alcançar 2-3 mm e o ovócito um diâmetro correspondente a 110 μ m (Crozet et al., 1986; Fair et al., 1995, 1996).

Somente após o estabelecimento do balanço hormonal adequado e o pico pré-ovulatório de LH, é que o ovócito é estimulado a retomar a meiose e chegar até o estágio de metáfase II na ovulação (Eppig et al., 1992).

No período final do desenvolvimento folicular antral ocorrem o recrutamento, seleção e dominância. Driancourt (2001) define como recrutamento, ou emergência, o crescimento de um grupo de folículos dependentes de gonadotrofinas. Esses são recrutados sempre após um rápido aumento nas concentrações de FSH e quando apresentam diâmetros médios de 2 mm. Após o recrutamento ocorre a fase de seleção ou divergência. Nesse momento, um folículo continua a crescer, sendo denominado de folículo dominante, e os demais atingem um platô e depois reduzem suas taxas de crescimento, tornando-se subordinados. Esse fenômeno se dá em bovinos quando o maior folículo apresenta em média 8,5 mm (Beg et al., 2002). A aquisição de receptores para LH nas células da granulosa é o fator diferencial do folículo que se tornará dominante em relação aos demais folículos em crescimento (Bao et al., 1997). Os folículos sensíveis ao FSH respondem ao aumento das concentrações de FSH plasmático, que é um estímulo para o recrutamento folicular. Após o recrutamento, apenas um folículo é selecionado e passa a exercer a dominância sobre os demais ao longo da onda folicular (Fair, 2003).

O folículo dominante continua a crescer por poucos dias após a seleção sob o estímulo de uma maior concentração de LH. Na ausência de um pico de LH, o folículo começa a regredir e estimula o recrutamento de uma nova onda de crescimento folicular. Se houver um pico de LH, a meiose é retomada e ocorre a quebra da membrana nuclear. Os cromossomos se condensam e progridem através dos estágios finais da meiose I, que coincide com a ovulação, e são retidos pela segunda vez na metáfase da meiose II (Hyttel et al., 1986, 1989, 1997; de Loos et al., 1991) até a fecundação, quando é completada a segunda divisão meiótica. No citoplasma do ovócito ocorre um aumento do conteúdo de lipídio, reorganização das mitocôndrias e redução do complexo de Golgi (Fair et al., 1997a). Os grânulos corticais

são alinhados ao redor da membrana do ovócito neste estágio de desenvolvimento. Há um aumento no número de vesículas e os retículos endoplasmáticos liso e rugoso são observados em número reduzido (Fair et al., 1997a). A maturação também é caracterizada pela expansão das células do cumulus e rompimento do contato entre as células da corona radiata e o citoplasma do ovócito (Gilchrist & Thompson, 2007).

O término da maturação meiótica do ovócito é dependente da penetração do espermatozóide durante a fecundação. A penetração espermática faz com que o ovócito retome sua atividade metabólica e conclua a segunda divisão meiótica, com a expulsão do segundo corpúsculo polar (Palma, 2001). Segue-se então, a descondensação da cromatina haplóide dos gametas feminino e masculino, ocorrendo a formação e aposição dos pronúcleos masculino e feminino. Posteriormente, ocorre a dissolução da membrana nuclear, descondensação dos cromossomos e ordenamento em um plano equatorial, que corresponde a singamia (Palma, 2001), com formação de um núcleo diplóide no zigoto, que originará um novo indivíduo.

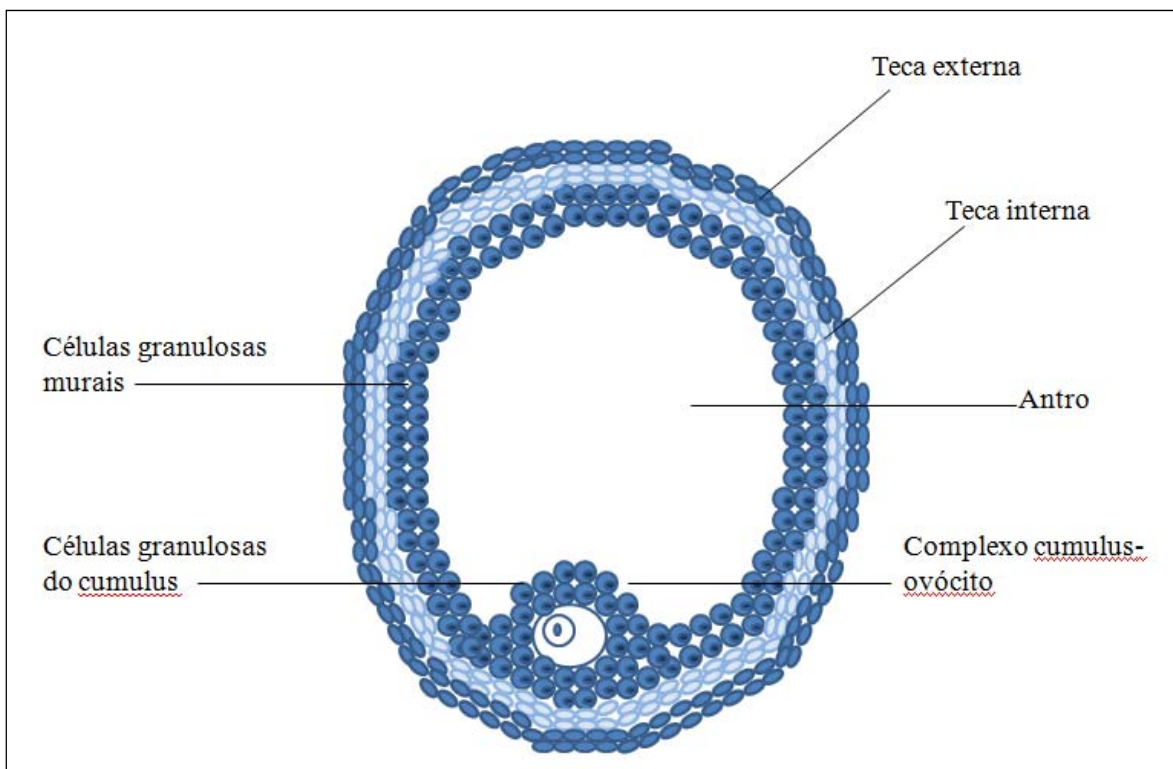


Figura 1.1 - Morfologia de um folículo terciário ou De Graaf.

2.2 Maturação e competência ovocitária

A maturação ovocitária é um longo processo durante o qual os ovócitos se preparam para serem fecundados e suportarem os estágios subseqüentes do desenvolvimento. Esse processo envolve eventos nucleares e citoplasmáticos (Ferreira et al., 2009).

A maturação nuclear se refere à retomada e término da segunda divisão meiótica. Ou seja, o ovócito progride do estágio de prófase da primeira divisão meiótica até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (Tesfaye et al., 2009). A retomada da meiose é estimulada *in vivo* por um pico pré-ovulatório de LH e *in vitro* pela remoção do ovócito do folículo ovariano. Essa estimulação resulta na quebra do envelope nuclear e condensação da cromatina, bem como em mudanças citoplasmáticas simultâneas (Masui & Clarke, 1979). Durante a maturação meiótica nuclear *in vitro* em bovinos, a presença e a fosforilação de proteínas específicas do ovócito são requeridas inicialmente para que possa ocorrer a quebra da vesícula germinativa, que é a membrana nuclear do ovócito (Hunter & Moor, 1987; Sirard et al., 1989; Kastrop et al., 1991).

O controle da maturação é realizado, em parte, por alterações de fosforilação de proteínas, por alterações dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e dos níveis de cálcio. É bem estabelecido que os níveis de AMPc exercem um importante papel na manutenção da retenção da meiose no estágio de diplóteno (Mehlmann, 2005). Por muito tempo manteve-se a hipótese da transferência contínua de AMPc das células do cumulus para o ovócito através das junções *gap* era a única fonte de AMPc que mantinha a retenção da meiose (Dekel et al., 1981; Wassarman & Albertini, 1994; Webb et al., 2002). Entretanto, recentemente tem sido demonstrado que o AMPc produzido pelo ovócito é também essencial para a manutenção da retenção da meiose no estágio de diplóteno em ovócitos de camundongo (Vaccari et al., 2008). A retomada da meiose pode ser modulada por uma diminuição transiente do nível de AMPc, o qual é um passo necessário para a ativação do MPF na indução da maturação (Bilodeau et al., 1993).

Além do AMPc, o monofosfato de guanosina 3'5' cíclico (GMPc) também age como um importante sinal inibitório e mantém a retenção da meiose em ovócitos de mamíferos. O GMPc é transferido das células do cumulus para o ovócito através das junções *gap*, onde inibe a hidrólise do AMPc. Esta inibição mantém a alta concentração de AMPc intra-ovócito o que bloqueia a progressão da meiose (Norris et al., 2009; Sun et al., 2009).

Esse controle inclui também uma proteína chamada de fator promotor de fase M (MPF), que é responsável pela retomada da meiose, sendo que a sua ativação precede a quebra da vesícula germinativa (GVBD). O MPF é um complexo formado pela ciclina B, que é a subunidade regulatória, e pela cinase p34Cdc2, que é a subunidade catalítica (van den Hurk & Zhao, 2005). A ativação do MPF requer inicialmente a formação do complexo p34Cdc2/ciclina B e, posteriormente a fosforilação e desfosforilação de p34Cdc2. É proposto que a modificação das ciclinas pela sinalização de Ca^{+2} é requerida para a completa ativação do MPF na presença de cinases dependentes de ciclinas, o que resulta na GVBD (Meyer et al., 1992).

Portanto, a GVBD em ovócitos bovinos ocorre em resposta à ativação do MPF (Kubelka et al., 2000; Mermillod et al., 2000) e uma complexa cascata de eventos de fosforilação e desfosforilação de proteínas que está envolvida na regulação da retomada da meiose. Além do MPF, as proteínas cinsases ativadas mitogenicamente (MAPKs) são também conhecidas por estarem envolvidas na maturação do ovócito e sua atividade é requerida para manutenção da atividade do MPF, assim como, o fator citostático (CSF) que também é conhecido por agir na estabilização do MPF (Tripathi et al., 2010).

A maturação citoplasmática está associada com as mudanças celulares que ocorrem concomitante à maturação nuclear (Sirard, 2001). Na maturação citoplasmática, ocorre a reprogramação na síntese protéica, mudança na atividade da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do fator promotor da maturação (MPF), desenvolvimento dos mecanismos de liberação de Ca^{+2} e aquisição da capacidade de descondensar a cabeça do espermatozóide (Salamone et al., 2001). Ainda durante esse período, ocorrem mudanças na organização citoplasmática, tais como um contínuo desenvolvimento dos estoques de lipídios, redução do aparelho de Golgi, aparecimento de vários ribossomos, rearranjo das mitocôndrias e alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana plasmática (Dieleman et al., 2002).

Durante o processo de maturação, também ocorrem significativas alterações nas células somáticas que circundam o ovócito, - as células especializadas da granulosa, do complexo cumulus ovócito (COCs), - iniciam um processo de expansão, tornando-se suspensas em uma matriz gelatinosa, permanecendo separadas em consequência do acúmulo da secreção de ácido hialurônico (Gonçalves et al., 2002). A presença do complexo cumulus-ovócito é de fundamental importância para o sucesso da maturação do ovócito. As CCs bloqueiam a retomada da meiose do ovócito favorecendo uma correta maturação

citoplasmática, possuem um papel essencial nas primeiras horas de maturação (Merton et al., 2003), através do fornecimento de carboidratos, aminoácidos e nucleotídeos (Rodriguez & Farin, 2004; Nagano et al., 2006) e protegem o ovócito do estresse oxidativo induzido pela apoptose de célula da granulosa durante o processo da maturação *in vitro* (Yuan et al., 2005).

Desse modo, quando um ovócito imaturo é removido dos folículos, ele deve ser capaz de sofrer não só a maturação nuclear, mas também a maturação citoplasmática (Sirard, 2001). Portanto, ovócitos bovinos que completaram o seu crescimento, extraídos de folículos maiores que 2 mm são capazes de retomar a meiose *in vitro*, passarem pela maturação e serem fecundados (Sirard et al., 1998).

Outro aspecto importante para que a maturação ocorra com sucesso, envolve o acúmulo de mRNA necessário para o desenvolvimento inicial. As instruções moleculares acumuladas durante o crescimento e capacitação do ovócito controlam ambas as progressões nuclear e citoplasmática. Esse processo é denominado por alguns autores como maturação molecular (Sirard, 2001).

No que se refere a maturação *in vitro*, a eficiência é ainda reduzida comparada com ovócitos maturados *in vivo* (Assidi et al., 2008). Portanto, pode-se supor que o baixo desenvolvimento embrionário se deve a deficiência do ovócito, seja na maturação nuclear, citoplasmática, ou na molecular. Portanto, dentre os fatores que podem afetar o sucesso da maturação ovocitária, pode-se citar a morfologia do complexo cumulus-ovócito (COC), as condições de maturação e principalmente a competência do ovócito (Dode et al., 2006).

A competência ovocitária é progressivamente adquirida nos estágios finais da foliculogênese, por meio de várias mudanças celulares e moleculares, e se refere a capacidade do ovócito de completar a divisão meiótica, garantir uma fecundação monospermica, descondensar a cabeça do espermatozóide, transpor a transição materno-zigótica e prosseguir o seu desenvolvimento (Coticchio et al., 2004). Isto é, durante a fase de ovogênese o ovócito adquire a maquinaria molecular e citoplasmática que é requerida para suportar o desenvolvimento embrionário (Brevini-Grandolfi & Grandolfi, 2001; Sirard et al., 2006).

Vários critérios têm sido utilizados para avaliar a competência do ovócito. A avaliação morfológica tem sido rotineiramente utilizada como critério para selecionar ovócitos de melhor qualidade (de Witt et al., 2000; Stojkovic et al., 2001; Lonergan et al., 2003). Em particular, o número de camadas das células do cumulus, seu grau de expansão

e/ou apoptose, o diâmetro do ovócito e homogeneidade do citoplasma são utilizados na seleção de COC's (Blondin & Sirard, 1995; Patel et al., 2007). Entretanto, é conhecido que a avaliação morfológica por si só é insuficiente para distinguir ovócitos competentes que têm habilidade de levar uma gestação à termo (Lonergan et al., 2003; Coticchio et al., 2004).

Outros parâmetros que têm sido utilizados para selecionar ovócitos com diferentes habilidades para o desenvolvimento incluem o tempo da primeira clivagem (Fair et al., 2004; Dode et al., 2006), a idade da doadora (Patel et al., 2007; Bettegowda et al., 2008) e o tamanho do folículo (Donnison & Pfeffer 2004; Lequarre *et al.* 2005; Mourot *et al.* 2006; Caixeta et al., 2009). A existência da correlação entre o momento da primeira clivagem após a inseminação e a capacidade de desenvolvimento embrionário em bovinos é um indicativo da competência (Holm et al., 1998; Lonergan et al., 2000), pois aqueles ovócitos que clivam mais cedo após a fecundação têm maior capacidade de atingir o estágio de blastocisto que aqueles que clivam mais tarde (Lonergan et al., 1999; Dode 2006). No que se refere a idade da doadora, tem sido relatado que ovócitos de animais pré-púberes são menos competentes para o desenvolvimento comparado com ovócitos de fêmeas adultas (Revel et al., 1995; Presicce et al., 1997; Salamone et al., 2001; Pujol et al., 2004).

Existe uma clara relação entre o tamanho do folículo e a competência do ovócito, sendo que ovócitos obtidos de folículos maiores são mais competentes *in vitro* que ovócitos obtidos de folículos menores (Pavlok et al., 1992; Lonergan et al., 1994; Hagemann et al., 1999; Machatkova et al., 2004; Kauffold et al., 2005; Lequarre et al., 2005, Caixeta et al., 2009). Ovócitos bovinos coletados a partir de folículos de 2-3 mm de diâmetro apresentaram menores taxas de blastocisto comparadas a ovócitos oriundos de folículos > 6 mm de diâmetro (Pavlok et al., 1992; Lonergan et al., 1994; Hagemann et al., 1999; Machatkova et al., 2004; Kauffold et al., 2005; Lequarre et al., 2005; Caixeta et al., 2009). Essa transição de ovócito menos para mais competente coincide com a emergência, FSH-dependente, de um grupo de folículos de 3-5 mm no início da onda folicular (Mihm, et al, 2002), quando os ovócitos bovinos completam sua fase de crescimento em um folículo de aproximadamente 3 mm (Fair et al., 1995). Entretanto, os mecanismos moleculares que sustentam esta progressão da competência são desconhecidos. Presumivelmente, essas mudanças envolvem a síntese, degradação e modificação de mRNA e proteínas, as quais capacitam o ovócito com os necessários estoques moleculares para conduzir o desenvolvimento a partir da maturação meiótica e fecundação até o momento da ativação genômica embrionária no estágio de 8 a 16 células (Donnison & Pfeffer, 2004).

A transcrição diminui marcadamente uma vez que o folículo ovariano atinge 3 mm (Crozet et al., 1986; Fair et al., 1995) e após este estágio, o ovócito permanece transcricionalmente quiescente (De Souza et al., 1998). A diminuição da maior parte da atividade de transcrição no ovócito em um determinado tamanho de folículo e sua relação com o baixo potencial de desenvolvimento sugere que ovócitos oriundos de folículos antrais menores que 3 mm ainda não tenham acumulado o estoque total de RNA requerido para o desenvolvimento posterior (Donnison & Pfeffer, 2004).

Conseqüentemente, existe uma concordância geral que a competência do ovócito possa estar relacionada com a abundância de transcritos específicos no *pool* de mRNA que é acumulado durante o crescimento do ovócito e as fases finais da foliculogênese (De Sousa et al., 1998; Robert et al., 2000; Brevini-Gandolfi & Gandolfi 2001; Maddox-Hyttel et al., 2005; Sirard et al., 2006). Isso tem conduzido à hipótese de que diferenças entre ovócitos competentes e incompetentes possam depender do padrão de expressão diferencial de genes, e embora alguns desses genes tenham sido identificados como sendo relativos à competência do ovócito (Donnison & Pfeffer 2004; Fair et al., 2004; Dode et al., 2006; Mourot et al., 2006; Racedo et al., 2008), os mecanismos envolvidos na aquisição da competência não são bem conhecidos. Portanto, COCs isolados de folículos de diferentes tamanhos podem servir como um modelo para avaliar ovócitos e as células do cumulus correspondentes, com diferentes graus de competência e os possíveis fatores envolvidos na aquisição da competência para o desenvolvimento.

O padrão de expressão de genes tem emergido como uma ferramenta útil para determinar os fatores que afetam a qualidade dos ovócitos e embriões. Numerosos estudos têm demonstrado a próxima relação entre qualidade do ovócito/embrião e a abundância de vários transcritos (Brevini-Gandolfi et al., 1999; Robert et al., 2000, 2002; Brevini et al., 2002; Wrenzycki et al., 2003; Baran et al., 2004; Donnison & Pfeffer, 2004; Fair et al., 2004; Gutierrez-Adan et al., 2004; Lequarre et al., 2005; Dode et al., 2006; Mourot et al., 2006; Nemcova et al., 2006). Esses estudos também têm contribuído para uma melhor elucidação dos mecanismos da competência ovocitária.

Métodos alternativos já foram sugeridos para definir marcadores moleculares para a competência do ovócito que são expressos por ele mesmo (Lonergan et al., 2003; Paradis et al., 2005) ou nos compartimentos somáticos circundantes (Robker et al., 2000; Ochsner et al., 2003; McKenzie et al., 2004; Assidi et al., 2008; Hamel et al., 2008). A associação íntima entre células do cumulus e ovócito é um requisito básico para o crescimento folicular normal e aquisição da competência, assim como para coordenação da maturação

nuclear e citoplasmática (Vozzi et al., 2001). A investigação de vias moleculares da competência por meio da identificação de potenciais genes candidatos expressos nas células do cumulus e associados com a qualidade do ovócito é um passo chave para elucidar a complexa via de maturação final do ovócito e aquisição de competência (Assidi et al., 2010).

2.3 Importância das células do cumulus na aquisição da competência ovocitária

Os ovócitos de mamíferos crescem e se desenvolvem em uma relação íntima e mutuamente dependente com as células somáticas adjacentes. A maior parte do crescimento do ovócito ocorre durante o estágio de folículo pré-antral, onde o ovócito está muito próximo às células da granulosa (CG) relativamente indiferenciadas. Na formação do antro folicular, as células da granulosa se diferenciam em duas linhagens distintas anatômica e funcionalmente: as células da granulosa murais que se aderem à parede do folículo e que tem um papel principal na esteroidogênese e as células do cumulus (CCs), as quais formam uma íntima associação com o ovócito. As CCs possuem projeções citoplasmáticas trans-zonais altamente especializadas que penetram através da zona pelúcida e formam as junções *gap* no contato com o ovócito, formando uma elaborada estrutura chamada de complexo-cumulus ovócito (COC) (Albertini et al., 2001).

A interação entre células do cumulus e ovócito envolve ambas as junções *gap* e a sinalização parácrina. As junções *gap* permitem a transferência de pequenas moléculas e facilitam as trocas de metabólitos de glicose e íons entre as CCs e os ovócitos (Tanghe et al., 2002; Gilchrist et al., 2004).

As comunicações bi-direcionais entre ovócitos e as CCs ocorrem durante o desenvolvimento folicular (Buccione et al., 1990; Eppig et al., 2002; Senbon et al., 2003; Gilchrist et al., 2004; Makabe et al., 2006; Sirard et al., 2006) e são essenciais na aquisição da competência em ovócitos mamíferos (de Loos et al., 1991; Webb et al., 2002; Fair, 2003). A completa remoção das CCs antes da maturação *in vitro* inibe a maturação do ovócito (Vozzi et al., 2001). Similarmente, a inibição desse complexo funcional utilizando-se inibidores das junções *gap* reduz significativamente a maturação do ovócito, fecundação (Motilik et al., 1989; Sirard et al., 1989, Kastrop et al., 1991; Tatemoto & Terada 1995; Vozzi et al., 2001) e

a competência para o desenvolvimento (Atef et al., 2005). Isto é normalmente devido à falta de transferência de sinais moleculares específicos que coordenam a maturação final dos ovócitos (Gilchrist et al., 2004; Lodde et al., 2007).

Tem sido demonstrado que o ovócito é um regulador central da função celular do folículo em mamíferos, secretando fatores de crescimento solúveis, chamados de fatores secretados pelo ovócito (OFS), os quais agem nas células foliculares vizinhas para regular uma variedade de funções nas células do cumulus e da granulosa (CG), incluindo a proliferação (Li et al., 2000; Gilchrist et al., 2001; 2003; 2004; 2008), apoptose (Hussein et al., 2005), luteinização (Eppig et al., 1997; Li et al., 2000) e metabolismo (Eppig et al., 2005). Entre esses fatores estão o fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF9) e a proteína morfogenética de osso 15 (BMP15) (Buccione et al., 1990; Vanderhyden et al., 1990). Estudos têm demonstrado que a ausência desses dois OFSs, GDF9 e BMP15, causa a esterilidade em camundongos (Dong et al., 1996) e em ovelhas (Galloway et al., 2000). Ambos GDF9 e BMP15 são da superfamília do fator de crescimento transformante beta (TGF β) e são expressos de modo específico no ovócito a partir do estágio inicial e exercem papéis chaves na promoção do crescimento folicular durante o estágio de folículo primário (Knight & Glister, 2006).

Além disso, os ovócitos também influenciam a expressão de marcadores bioquímicos específicos do cumulus que podem ser cruciais para a expansão do cumulus permitindo a maturação e desenvolvimento eficientes (Buccione et al., 1990; Vanderhyden et al., 1990; Lucidi et al., 2003). Os ovócitos em crescimento são capazes de estimular as células da granulosa em folículos pré-antrais a produzir o kit ligante (KL), um fator parácrino que é conhecido por promover o crescimento do ovócito (Gilchrist et al., 2004). Camundongos deficientes em KL, ou seu receptor, c-kit, exibem desenvolvimento anormal na ovogênese e foliculogênese o que leva à infertilidade (Joyce et al., 2000; Otsuka & Shimasaki, 2002), demonstrando que a comunicação parácrina CG-ovócito é indispensável (Driancourt et al., 2000).

O início da expansão das CCs é dependente de dois eventos de sinalização: a estimulação por gonadotrofinas ou peptídeos semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e por sinais parácrinos secretados pelo ovócito. Entre esses sinais, encontra-se o fator capacitante da expansão do cumulus (CEEF), o qual age sobre as CCs capacitando-as para responder à sinalização de gonadotrofinas/EGF para sintetizar as moléculas da matriz extracelular (Gilchrist et al., 2008).

In vivo, a expansão das CC é induzida por uma cascata pré-ovulatória iniciada pelo pico de LH e pela sinalização do AMPc, que estimulam uma massiva produção de proteínas de matriz extracelular mucóides pelas CCs, criando uma grande massa de células do cumulus expandidas. *In vitro*, a expansão das CCs requer um sinal de AMPc, o que é rapidamente induzido pelo tratamento com FSH. Para a expansão de CCs em camundongos, existe um absoluto requerimento de CEEF para facilitar ou ativar a expansão induzida pelo FSH (Buccione et al., 1990; Salustri et al., 1990). É provável que o CEEF exerça um importante papel na formação e estabilização das moléculas da matriz extracelular (Salustri et al., 1990). A regulação da expansão do cumulus pela ação dos fatores parácrinos do ovócito pode ser reproduzida *in vitro* por um número de fatores de crescimento incluindo TGF β 1, GDF9, BMP15 e activinas e possivelmente, algumas combinações desses fatores de crescimento são componentes dos CEEFs (Gilchrit et al., 2008).

A competência para se submeter a expansão é a única característica de diferenciação das CCs (Diaz et al., 2006), a qual tem sido mostrada ser crítica para o desenvolvimento normal do ovócito, ovulação e fecundação (Elvin et al., 1999; Chang et al., 2002; Vanderhyden et al., 2003). As CCs sintetizam e compactam uma matriz extracelular altamente viscoelástica, na qual a hialurona é o principal componente (Salustri et al., 1989). Além da hialurona, estão presentes a proteína alfa-induzida do fator de necrose tumoral seis (TNFAIP6), a pentraxina (PTX3) e a versicana, que é uma proteoglicana (Russell & Salustri, 2006).

As células do cumulus completamente desenvolvidas exercem três importantes funções biológicas. Antes da ovulação, as CCs suportam a maturação do ovócito, durante a ovulação elas conduzem o ovócito para dentro do oviduto e rapidamente após a ovulação, elas participam do complexo mecanismo que controla o acesso do espermatozóide ao ovócito. Desta forma, durante a maturação as CCs exercem um importante papel por manter o ovócito retido em meiose, por participar na indução da retomada da meiose e por suportar a maturação citoplasmática. Estas funções chaves da CCs durante a maturação ovocitária são atribuídas a sua elaborada rede de junções *gap* e a sua capacidade metabolizante específica (Tanghe et al., 2002). É bem conhecido que o AMPc intra-ovocitário exerce um importante papel na manutenção da retenção da meiose no estágio diplóteno (Mehlmann, 2005). As CCs agem claramente no controle da meiose, desde que um elevado nível de AMPc intracelular iniba ou retarde a retomada da meiose em COC (Bilodeau et al., 1993), uma vez que o AMPc produzido pelas CCs é transferido para o ovócito via junções *gap* (Tripathi et al., 2010). A

manutenção de um nível ótimo da concentração de AMPc, em combinação com a retenção da meiose, pode ser necessária para uma completa maturação citoplasmática (Motlik et al., 2000).

Existem evidências que as CCs exercem positivos efeitos durante a maturação por fornecer substâncias essenciais ao ovócito (Tanghe et al., 2002). Outro papel metabólico importante das CCs na maturação do ovócito é o de proteção. As CCs reduzem cistina em cisteína e promovem a captação de cisteína em ovócitos bovinos durante a maturação (Takahashi et al., 1993). Como resultado, os COC tem um conteúdo intracelular mais alto de glutathione (de Matos et al., 1997; Geshi et al., 2000), que exerce um importante papel na manutenção do estado reduzido das células e as protegem contra os efeitos nocivos do stress oxidativo induzido pela apoptose (Lim et al., 1996; Tatemoto et al., 2000; Fatehi et al., 2005). Um nível estável de glutathione em ovócitos maturados resulta no aumento do número de ovócitos fecundados e que se desenvolvem ao estágio de blastocisto. Além disso, as CCs metabolizam a glicose em piruvato ou intermediários do ciclo de Krebs que podem ser transferidos para o ovócito. Tem sido demonstrado que o COC utiliza glicose para muitos processos metabólicos essenciais, tais como produção de energia, síntese de purinas e ácidos nucléicos, mucificação e homeostase celular (Sutton et al., 2003). Entretanto, com relação à glicose, o ovócito tem uma capacidade relativamente baixa para utilizar este metabólito (Biggers et al., 1967; Sutton-McDowall et al., 2010). As CCs são conhecidas por metabolizar a maior parte da glicose consumida pelo COC, suprindo metabólitos intermediários como piruvato, principalmente via glicólise, para o ovócito (Sutton-McDowall et al., 2010). Outros substratos de baixa massa molecular tais como aminoácidos e ácidos nucléicos são transportados para o ovócito para o seu crescimento e síntese das suas próprias macromoléculas, bem como mRNA e rRNA das CCs e células da granulosa (Johnson, 2007).

Além disso, a capacidade do ovócito para formar o pró-núcleo masculino após a fecundação depende fortemente da presença das CCs durante a maturação (Vanderhyden & Armstrong, 1989; Fukui, 1990; Moor et al., 1990) e fecundação (Tajik et al., 1993; Zhang et al., 1995; Suzuki et al., 2000). A fecundação e desenvolvimento de um blastocisto saudável são limitados pela qualidade do ovócito (Eppig et al., 1993) e as CCs exercem um papel crítico na determinação do potencial de desenvolvimento do ovócito antes e após a ovulação (Tanghe et al., 2002).

2.4 Estudos da expressão de genes associados à competência ovocitária

Muitos modelos de estudo da competência de desenvolvimento do ovócito bovino têm sido descritos. Tais modelos incluem o tempo da primeira clivagem (Fair et al., 2004; Dode et al., 2006), a idade da doadora (Patel et al., 2007; Bettegowda et al., 2008) e o tamanho do folículo (Donnison & Pfeffer 2004; Lequarre et al., 2005; Mourot et al., 2006; Caixeta et al., 2009). Mais recentemente esses modelos têm sido utilizados para os estudos de expressão gênica associados à competência, empregando uma combinação da análise de microarranjos e PCR quantitativo para investigar o padrão de transcritos em ovócitos e células do cumulus.

A reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) é utilizada para amplificar e simultaneamente quantificar uma molécula alvo de DNA. A qPCR consiste de uma técnica variante da reação de polimerase em cadeia (PCR) que é comumente utilizada em biologia molecular para gerar várias cópias de uma seqüência de DNA em um processo chamado de amplificação. A característica chave da qPCR é que o DNA amplificado é detectado a cada ciclo, durante a progressão da reação em tempo real, o que é um avanço comparado à PCR convencional, onde o produto da reação é detectado somente no final das etapas de amplificação. A amplificação exponencial via qPCR consiste de uma técnica de alta sensibilidade, na qual um número de cópias muito pequeno de moléculas de RNA pode ser detectado (Nolan et al., 2006; Dhanasekaran et al., 2010).

No que se refere ao microarranjo de DNA, este consiste de sondas pré-sintetizadas de cDNA ou oligonucleotídeos, que são impressas sobre um suporte (Hager, 2006). A primeira geração de microarranjo usou cDNA como sondas sobre lâminas de vidro (Schena et al., 1995). As sondas para os microarranjos de cDNA são geralmente produtos de PCR gerados de bibliotecas de cDNA ou de coleções de clones que são fixados sobre lâminas de vidro ou membranas de nylon como *spots* em locais definidos (Schulze & Downward, 2001). Na maioria das lâminas de microarranjo, os genes são fixados em duplicata ou triplicata, onde o cDNA em cada *spot* é geralmente um gene inteiro ou seqüências tag expressas (EST), pequenos fragmentos da seqüência de cDNA, de aproximadamente 300-800 nucleotídeos de comprimento (Bryant et al., 2004). No caso dos *chips* de segunda geração como o da Affymetrix (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) são utilizados oligonucleotídeos que são sintetizados no próprio *chip* de sílica como sondas e que permite

uma densidade muito maior de sondas fixadas conferindo alta sensibilidade e reprodutibilidade (Evans et al., 2008).

O estudo do perfil do transcrito por meio da tecnologia do microarranjo é uma ferramenta amplamente utilizada para examinar a expressão de múltiplos genes simultaneamente (centenas a milhares) em diversos estágios e condições (Rodriguez-Zas et al., 2008) e tem se tornado altamente comum na identificação de genes diferencialmente expressos em diferentes modelos biológicos (Yao et al., 2004).

Muitos dos estudos iniciais de análise de transcrito na área de reprodução animal foram focados na identificação de genes em ovócitos. De acordo com Fair e colaboradores (2007), a análise global da expressão de genes utilizando microarranjo permite o estabelecimento de um esquema molecular do transcrito durante a maturação de ovócitos para melhor entendimento da ovogênese e foliculogênese (Yao et al., 2004; Misirlioglu et al., 2006). Além disso, a capacidade de ovócitos completamente crescidos para sustentar a reprogramação genômica e o desenvolvimento embrionário está associada a um complexo padrão de expressão de genes e isso desencadeou muitos estudos do transcrito de ovócitos em camundongos (Sharov et al., 2003; Hamatani et al., 2004), humanos (Kacobas et al., 2006) e em bovinos (Misirlioglu et al., 2006).

O conhecimento das mudanças temporais e específicas na expressão de genes das células foliculares durante o crescimento dos folículos está longe de se completar em animais e humanos (Hamel et al., 2008). Intensos estudos em células do cumulus buscam o entendimento da aquisição da competência ovocitária e a identificação de novos marcadores da qualidade do ovócito durante o desenvolvimento folicular. Devido às interações próximas entre células do cumulus e ovócito, e por dividirem o mesmo microambiente, essas células podem refletir as condições foliculares experimentadas pelo ovócito (Patrizio et al., 2007). Com métodos apropriados, pode ser possível detectar e decodificar as alterações moleculares nas CCs que revelam informações prognosticamente importantes concernentes aos ovócitos (Huang & Wells, 2010). De fato, utilizando-se qPCR e/ou microarranjos de DNA, muitos estudos têm fornecido evidências de que os genes expressos nas CCs representam biomarcadores potenciais para predição da qualidade do embrião e sucesso da gestação. Apesar de alguns estudos de análise do transcrito terem sido realizados em células do cumulus de camundongos (Hernandez-Gonzalez et al., 2006; Kawamura et al., 2009; Ye et al., 2009), bovinas (Patel et al., 2007; Assidi et al., 2008; 2010; Bettgowda et al., 2008; Regassa et al., 2011) e humanas (McKenzie et al., 2004; Zhang et al., 2005; Assou et al.,

2006; 2010; Hamel et al., 2008; Huang & Weels 2010; Assidi et al., 2011), a relação da expressão específica de genes durante o crescimento folicular e sua habilidade para determinar a qualidade do embrião está ainda por ser investigada.

Uma abordagem que tem sido utilizada na investigação desses mecanismos é a comparação de complexos-cumulus ovócitos com diferentes níveis de competência, utilizando-se os modelos de diferentes tamanhos de folículos e da idade da doadora, conforme mencionado anteriormente.

Além dos estudos desenvolvidos com ovócitos de diferentes tamanhos de folículos (Donnison & Pfeffer, 2004; Mourot et al., 2006; Nemvoca et al., 2006; Racedo et al., 2008; Fagundes et al., 2011), outros têm sido focados também na busca de marcadores para a competência ovocitária nas células do cumulus, visto a comprovada interação cumulus-ovócito. Um recente trabalho, realizado por Caixeta e colaboradores (2009), avaliou o efeito do tamanho do folículo sobre a expressão de mRNA nas células do cumulus e ovócitos bovinos na tentativa de identificar genes marcadores para a competência ovocitária. Nesse trabalho foram quantificados por meio de qPCR, transcritos para os genes candidatos em ovócitos e células do cumulus provenientes de diferentes tamanhos de folículos. Os resultados obtidos mostraram que a taxa de blastocisto foi mais alta para ovócitos coletados de folículos > 6 mm de diâmetro. Em ovócitos, a expressão do transcrito de H2A aumentou gradualmente de acordo com o tamanho do folículo, sendo maior em ovócitos de folículos $\geq 8,1$ mm de diâmetro comparado aos ovócitos de folículos < 6 mm de diâmetro e foi confirmada a importância de H2A para a competência do desenvolvimento. Nas células do cumulus, a expressão de mRNA de FSHR, EGFR e GHR aumentou com o tamanho do folículo, sendo o GHR, o que melhor avalia o potencial de desenvolvimento do ovócito.

Da mesma forma, Ghanem e colaboradores (2007) investigaram a abundância de transcritos em ovócitos e células do cumulus bovinos coletados de folículos de diferentes tamanhos (3-5 mm; 6-8 mm e ≥ 9 mm de diâmetro) nas fases de crescimento (dia 3) e de dominância (dia 7) da primeira onda folicular para identificar genes candidatos relacionado com a competência de desenvolvimento do ovócito utilizando-se microarranjo de DNA e qPCR. A competência de desenvolvimento do ovócito é altamente refletida pela fase da onda folicular ovariana. A análise comparativa da expressão de genes dos ovócitos das fases de crescimento e dominância revelou um *pool* de genes regulados diferencialmente. Desse *pool*, dez genes diferencialmente expressos foram validados (ANXA2, FL396, CKS2, CCNB1,

PTTG1, MSX1, BMP15, S100A10, RPL24, PP) em ovócitos bovinos coletados em ambas as fases foliculares. Dentre os genes validados nas células do cumulus, dois transcritos (MSX1 e FL396) foram mais abundantes na fase de dominância comparados aos da fase de crescimento. Já os transcritos RPL24 e CKS2 foram mais abundantes nas células do cumulus de folículos em fase de crescimento comparados aos da fase de dominância. Nesse estudo, o gene MSX1 foi descrito como mais expresso tanto em ovócitos como em células do cumulus derivados de folículos subordinados, devido à presença do folículo dominante.

Outro modelo bovino bem definido para investigação da competência de desenvolvimento do ovócito são as fêmeas pré-púberes comparadas às vacas adultas. Resultados mostram que ovócitos de fêmeas pré-púberes comparados aos de ovócitos de vacas adultas produzem menor taxa de blastocisto (Revel et al., 1995). Um estudo realizado por Patel e colaboradores (2007) identificou genes com maior abundância de mRNA em ovócitos de fêmeas adultas comparado aos ovócitos de animais pré-púberes. Neste estudo, foi observado que ovócitos de fêmeas adultas possuíam mais transcritos importantes na regulação da secreção hormonal e biossíntese de macromoléculas. A partir da validação desses resultados, confirmou-se a maior abundância de mRNA dos genes folistatina e das subunidades beta A e beta B da inibina/ativina em ovócitos dos animais adultos. Não houve diferença na abundância de mRNA de folistatina nas células do cumulus de ovócitos coletados de animais pré-púberes e adultos, entretanto, a abundância do mRNA da subunidade beta A da inibina/ativina foi mais alta nas células do cumulus de ovócitos de animais adultos. Esses resultados demonstram uma positiva correlação da abundância de transcritos da folistatina com a competência ovocitária nos dois modelos distintos.

De modo semelhante, Bettegowda e colaboradores (2008) identificaram diferenças na abundância de RNA transcritos em células do cumulus bovinas de ovócitos coletados de animais adultos e animais pré-púberes, submetidas à análise de microarranjo. Quatro genes que codificam as catepsinas CTSB, CTSK, CTSS, CTSZ, e que mostraram grande abundância de transcritos nas células do cumulus de ovócitos coletados de animais pré-púberes, foram investigados. A família das catepsinas de proteinases cisteína lisossomais tem atividade catalítica e tem sido relacionada a diversas funções biológicas. A validação desses genes confirmou a abundância dos transcritos nas células do cumulus de ovócitos coletados de animais pré-púberes e adultos. Os resultados desse estudo têm estabelecido que existe uma relação entre a abundância de mRNA de CTSB, CTSS e CTSZ nas células do cumulus e a competência ovocitária.

Outros trabalhos utilizando as metodologias de qPCR e microarranjos avaliaram a expressão de genes em células do cumulus bovinas, na tentativa de identificar marcadores da competência ovocitária. Um estudo realizado por Assidi e colaboradores (2010) em bovinos avaliou a expressão gênica em células do cumulus após o pico de LH em folículos pré-ovulatórios com o objetivo de identificar potenciais marcadores para a competência ovocitária. A partir da análise de transcrito, foi gerada uma lista de genes diferencialmente expressos nas células do cumulus, afetados pelo pico de LH. Os genes foram classificados funcionalmente e sete genes candidatos foram selecionados para validação da expressão gênica. Feita a análise, os genes THBS1, EREG, UBE2N, TNFAIP6, TRIB2 e ERFF11 foram validados como potenciais marcadores para a competência. Segundo os autores, esses estudos constituem um preâmbulo para o entendimento das vias moleculares do LH que disparam os processos de aquisição final da competência ovocitária em bovinos.

Mais recentemente, outro estudo realizado por Assidi e colaboradores (2011) em humanos teve como objetivo identificar biomarcadores da competência ovocitária para o desenvolvimento, expressos em células do cumulus. Dois grupos de CCs foram avaliados, o primeiro, de CCs de pacientes que obtiveram sucesso na gestação e o segundo, de CCs de pacientes sem sucesso na gestação, utilizando-se a análise de microarranjos os genes diferencialmente expressos foram identificados. Dos dezessete genes candidatos submetidos à análise quantitativa, seis dos mais expressos mostraram diferenças significativas na expressão (DPP8, HIST1H4C, UBQLN1, CALM1, NRP1 e PSMD6) e foram identificados como marcadores da qualidade do ovócito e sucesso da gestação e o gene TOM1 foi o único dentre os menos expressos confirmado como marcador negativo em CCs de pacientes sem sucesso na gestação. Esses resultados indicam que tais marcadores genômicos constituem uma poderosa ferramenta para a seleção de ovócitos.

Regassa e colaboradores (2011) analisaram o padrão do transcrito de ovócitos e células do cumulus bovinas na tentativa de identificar transcritos exclusivamente expressos no ovócito ou nas CCs e aqueles expressos quando o ovócito e as CCs foram cultivados juntos. Nesse estudo, os transcritos específicos do ovócito estavam envolvidos na transcrição, tradução e os específicos de CCs incluíram aqueles envolvidos no metabolismo de carboidratos, processos metabólicos protéicos e no processo biossintético de esteróides. De acordo com a validação dos genes, quando ovócitos e CCs formam cultivados juntos, a identificação dos transcritos expressos tanto nos ovócitos quanto nas CCs foram semelhantes, e estavam envolvidos no metabolismo de carboidrato, transporte molecular, metabolismo do

ácido nucléico, na proliferação e crescimento celular, ciclo celular, desenvolvimento celular e expressão gênica. Desse modo, esse estudo poderia fornecer subsídios sobre a função gênica e interações entre diferentes vias que são envolvidas na maturação de ovócitos bovinos.

O conhecimento obtido a partir da análise do transcrito de ovócitos e CCs poderão conduzir a otimização de vários procedimentos usados nas TRAs, em particular dos protocolos de maturação *in vitro*, para os quais o conhecimento das interações ovócito-cumulus é essencial (Huang & Wells, 2010). Portanto, o estudo do perfil do transcrito das CCs oferece a oportunidade, por um método não-invasivo, de prever a competência do ovócito e do embrião devido ao tráfico bidirecional entre CCs e ovócito, o que é muito importante para a aquisição desta competência (Assou et al., 2010).

2.5 Genes selecionados para validação em células do cumulus

O desenvolvimento de folículos ovarianos é regulado por diversos fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos. A sinalização parácrina inclui as interações células do cumulus-ovócitos e interações células da granulosa-teca. Entre as várias famílias de fatores que têm sido implicadas na função das células foliculares, a superfamília de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) é uma das maiores. É bem conhecido que os FGFs alteram a função ovariana, pelo menos em parte pela inibição da secreção dos hormônios esteroides, e afetam a sobrevivência das células da granulosa (Jiang et al., 2010), entretanto, os mecanismos de ação do FGF nas células do folículo ovariano ainda não estão bem caracterizados.

Existem 18 FGFs (FGF1-FGF10 e FGF16-FGF23), os quais são agrupados em seis subfamílias baseadas nas diferenças de homologies de seqüências e filogenia. Os FGFs previamente conhecidos como FGF11-FGF14, que não estão designados entre as subfamílias, são denominados fatores homólogos ao FGF (FHF) ou FGFs intracelulares, têm alta identidade de seqüência com a família FGF, mas não ativam os receptores de FGF (FGFR) e, portanto, não são geralmente considerados membros da família FGF. Os principais alvos dos FHF são os domínios intracelulares dos canais de sódio dependentes de voltagem e proteínas *scaffolding* intracelulares. Mutações feitas nos FHF em camundongos causaram uma variedade de anomalias neurológicas e as mutações de FHF em humanos estão implicadas na ataxia cerebelar (Beeken & Mohammadi, 2009). Por isso, os FHF são uma intrigante área da

pesquisa científica, considerando-se que a família FGF regula uma gama de processos do desenvolvimento, incluindo estruturação do cérebro, morfogênese e desenvolvimento. Devido à inabilidade dos FGFs se ligarem aos FGFRs, a inclusão dos FGFs na família do FGF deveria ser reconsiderada (Zhong et al., 2006; Itoh & Ornitz, 2008; Beeken & Mohammadi, 2009).

A expressão do mRNA de FGF11 foi detectada em células-tronco de trofoblasto de camundongo, em linhagem de células e placenta humanas, em ovócitos e embriões de camundongos em estudo realizado por Zhong e colaboradores (2006). Embora alguns FGFs tenham sido demonstrados afetar a função folicular, os mecanismos predominantes da ação do FGF nas células ovarianas requerem mais estudos. Somente alguns genes alvos do FGF estão sendo investigados no folículo, alguns deles são os genes que codificam as proteínas Sprout, produtos dos genes SPRY (Sprout), os quais foram primeiro identificados como inibidores de FGF (Jiang et al., 2010).

O *sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)* (SPRY1) faz parte de uma família de quatro genes (SPRY1-4) que são induzidos pela sinalização de FGF e serve como um regulador *de feedback* negativo (Faedo et al., 2010). O SPRY foi originalmente descrito em *Drosophila*, como um inibidor da sinalização do FGF durante o desenvolvimento da traquéia. Os membros da família Spry em mamíferos são expressos em padrões altamente restritos no desenvolvimento inicial de embriões e sua expressão mostra uma próxima correlação com os sítios de sinalização do FGF. A sinalização dos fatores de crescimento pelos receptores tirosino cinases (RTK) regula algumas respostas em células alvo, tais como a proliferação e diferenciação. A excessiva ou inapropriada sinalização por RTK tem sido implicada na progressão de câncer e desordens dos processos de desenvolvimento, demonstrando que o comprimento e duração da sinalização devem ser estritamente regulados. SPRY inibe especificamente a sinalização Ras-Erk/MAPK mediada por RTK e devido à atividade inibitória sobre essa via, o SPRY geralmente age como um supressor de tumor (Hanafusa et al., 2002).

Estudos demonstraram que a baixa expressão de SPRY1 endógeno aumenta os processos relativos à angiogênese em células endoteliais. O silenciamento de SPRY1 aumenta notavelmente a proliferação celular, possivelmente devido a modificação da expressão de p21 e ciclina D1, mediada por SPRY1 e/ou inibição da ativação de MAPK. Se o silenciamento do gene SPRY1 aumenta a angiogênese tumoral, a retomada da expressão do gene poderia ser uma interessante via para reduzir o crescimento do tumor. Portanto, tais resultados sugerem

que o SPRY1 seja um inibidor endógeno da angiogênese (Sabatel et al., 2010). Em bovinos, estudos demonstraram que o FGF2 aumentou a abundância de mRNA dos genes SPRY1, 2 e 4 nas células da granulosa (Jiang et al., 2010).

A regulação da expressão de SPRY não tem sido bem caracterizada. Em ovários, o FGF2 induziu a expressão de SPRY2 nas células luteínicas-granulosa de humanos e em células do cumulus de camundongos (Haimov-Kochman et al., 2005; Sugiura et al., 2009). O entendimento da regulação de SPRY2 nas células granulosas foliculares é de grande interesse por duas razões. Primeiro, porque esse gene tem potencial implicação para a fecundação, uma vez que a sinalização cumulus-ovócito pode ser controlada por SPRY2 (Sugiura et al., 2009) e a competência de desenvolvimento é inversamente correlacionada com os níveis de mRNA de SPRY2 nas células da granulosa (Robert et al., 2001). E segundo, por que a maioria dos estudos de sinalização do FGF tem usado linhagens celulares ou tipos de células proliferativas como modelo, uma vez que as células da granulosa em meio de cultivo livre de soro fornecem um excelente modelo de células proliferativas em diferenciação (Gutiérrez et al., 1997; Cao et al., 2006).

Os IGFs são fatores de crescimento semelhantes à insulina ou somatomedinas e são produzidos pela maioria dos tecidos, tendo capacidade para atuar por via endócrina, assim como por mecanismos parácrino e/ou autócrino (Hafez & Hafez, 2004). O sistema IGF exerce um importante papel na regulação do desenvolvimento folicular ovariano (Buratini, 2005) e esteroidogênese (Kwintkiewicz & Giudice, 2009). O sistema IGF é complexo e composto por IGF-I e IGF-II, por dois tipos de receptores (tipo-I e II), por seis proteínas que se ligam ao IGF que são as IGFBP1-6 e por enzimas de inativação (IGFBPase) das IGFBPs. As proteínas ligadoras de baixa massa molecular (IGFBP2, 4 e 5) apresentam maior afinidade pelos IGFs impedindo que estes se liguem aos receptores. A função das IGFBPases é degradar as IGFBPs possibilitando maior biodisponibilidade de IGF (livre) para se ligar aos receptores (Fortune et al., 2004).

No ovário humano, no momento da seleção do folículo dominante, o IGF-II apresenta-se aumentado nas células da granulosa, as IGFBPs são diminuídas e a protease da IGFBP4 é aumentada no folículo antral (Cataldo & Giudice, 1992; Chandrasekher et al., 1995; Conover et al., 2001, Thierry et al., 1996). O resultado em cadeia desse repertório da expressão da família do IGF é aumentar a biodisponibilidade de IGF que age como uma co-gonadotrofina na estimulação da esteroidogênese das células da granulosa (Kwintkiewicz &

Giudice, 2009; Conover et al., 1999). Em contraste, em folículos atrésicos, os níveis de IGF-II são baixos, as IGFBP são aumentadas e a protease de IGFBP4 é quase indetectável (Cataldo & Giudice, 1992; Chandrasekher et al., 1995; Thierry et al., 1996) resultando em uma limitada biodisponibilidade de IGF e a comprometida sobrevivência do folículo (Kwintkiewicz & Giudice, 2009; Giudice, 2001).

A IGFBP4 é a principal IGFBP inibitória no ovário e a protease IGFBP4 ovariana tem sido identificada como proteína plasmática-A associada à gestação (PAPPA) em humanos (Conover et al., 1999; 2001), camundongos (Nyegaard et al., 2010) e em animais domésticos (Mazerboug et al., 2001; Monget et al., 2003). A expressão de PAPPA nas células da granulosa é aumentada pelas gonadotrofinas e a PAPPA ovariana é um marcador de seleção para o desenvolvimento de folículos e do corpo lúteo (Conover et al., 1999; 2001; Hourvitz et al., 2000; 2002).

A expressão gênica da IGFBP2 e 4 foi localizada em células da granulosa e da teca, respectivamente (revisado por Fortune, et al. 2001 e Webb et al., 1999). Níveis reduzidos da IGFBP4 foram encontrados em folículos dominantes bovinos comparados com os dois maiores folículos subordinados apenas 1,5 dias após a emergência da onda (Mihm et al. 2000). Há fortes evidências sugerindo que a redução dos níveis de IGFBP4 no folículo selecionado seja conseqüência de um aumento da degradação proteolítica das IGFBPs pela proteína plasmática associada à gestação (PAPPA), detectada no folículo (Mazerbourg et al., 2001). De fato, a degradação não apenas da IGFBP4, mas também da IGFBP5, foi mais alta no maior folículo antes do momento esperado do desvio folicular (Fortune et al., 2004).

Recentemente, Kwon e colaboradores (2010) investigaram o padrão de expressão de mRNA da família do IGF nas células da granulosa e do cumulus de mulheres com e sem a síndrome de ovários policísticos. De acordo com esse estudo, a expressão de IGFBP3 foi significativamente diferente nas células da granulosa de mulheres com e sem a síndrome, enquanto que a expressão de mRNA de IGFBP4, IGF-II e o receptor IGFR-I foi aumentada nas células da granulosa de folículos imaturos em ambos os grupos de mulheres. O aumento observado na expressão do mRNA de IGFBP4 em células da granulosa de mulheres com a síndrome foi consistente com estudos prévios que demonstraram que o IGFBP4 inibe a síntese de esteróides em células da granulosa e teca (Cataldo & Giudice, 1992; Mason et al., 1998).

A família RHO de pequenas GTPases exerce um importante papel na regulação de muitos aspectos do comportamento celular, incluindo a progressão do ciclo celular, reorganização do citoesqueleto, polaridade celular, migração e invasão (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Ridley, 2001). O gene ARHGAP22 (Rho GTPase activating protein 22) codifica a proteína 22 ativadora de GTPase da família Rho, a qual está envolvida na via de transdução do sinal e regulação da formação das células endoteliais do tubo capilar durante a angiogênese (Katoh & Katoh, 2004). De acordo com a classificação *gene ontology*, as funções do ARHGAP22 estão relacionadas com a angiogênese, regulação da transcrição, diferenciação celular, ativação de GTPase, desenvolvimento do organismo e transdução do sinal (Gene Ontology Annotation, (GOA) Database, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/GOA/>). Além disso, estudos têm sugerido que os níveis de expressão de ARHGAP22 exercem um importante papel na determinação do modo de movimento da célula tumoral (Sanz-Moreno et al., 2008). Mais recentemente, foi demonstrado que ARHGAP22 foi o único gene encontrado por estar associado à retinopatia diabética proliferativa, pelo fato de estar envolvido na angiogênese celular endotelial (Huang et al., 2011). Em humanos, a expressão de ARHGAP22 foi detectada no ovário (RNA Seq Atlas: NM_021226-2749bp, Medicalgenomics) e é possível que este gene tenha ação importante nas comunicações bidirecionais entre ovócitos e células do cumulus para a aquisição da competência ovocitária.

O gene COL18A1 (*collagen, type XVIII, alpha 1*) que codifica o colágeno XVIII foi mapeado no cromossomo 21q22.3 em humanos e no cromossomo 10 em camundongos. O colágeno XVIII é uma proteína de lâmina basal, o qual juntamente com o colágeno XV, forma o subgrupo das multiplexinas (múltiplos domínios tripla-hélice com interrupções) na família do colágeno (Rehn & Pihlajaniemi, 1994; Oh et al., 1994; Saarela et al., 1998). Essas proteínas formam heterodímeros e contém um domínio não colagenoso (NC-11) N-terminal, dez repetições colagenosas alternadas com nove repetições não colagenosas e uma região não-colagenosa C-terminal, NC-1. A região N-terminal apresenta domínios que se ligam às moléculas de sinalização Wnt, as quais estão envolvidas na proliferação celular, polaridade e diferenciação em vários processos de desenvolvimento, podendo inibir *in vitro* a sinalização Wnt/beta-catenina em células cancerosas (Quelard et al., 2008). A região C-terminal, a qual contém um domínio de trimerização e no final 184 resíduos de aminoácidos, pode liberar a endostatina (20 kDa) e fragmentos tipo endostatina. A endostatina foi primeiro identificada como um potente inibidor da proliferação e migração de células endoteliais, capaz de inibir a angiogênese, com habilidade de reduzir o crescimento tumoral e parece

exercer algumas outras funções, como a indução da apoptose (Dhanabal et al., 1999; Dixelius et al., 2000; Schmidt et al., 2004). A maioria das pesquisas sobre o colágeno XVIII foi originalmente focada na endostatina devido seu grande potencial para inibir a angiogênese tumoral. Mas é também conhecido que as glicoproteínas no espaço extracelular exercem um importante papel na sinalização química entre células e elas podem fornecer um reservatório para várias moléculas sinalizadoras tais como membros das famílias Wnt, fator de crescimento tumoral beta (TGF β), FGF e receptores de moléculas de adesão celular (Lin et al., 2001; Aricescu et al., 2002). Além disso, o colágeno XVIII na matriz extracelular pode ser importante para definir a plasticidade de células epiteliais e endoteliais em diferentes órgãos e pode estar envolvido na determinação da polaridade celular, influenciando o metabolismo celular e diferenciação (Lin et al., 2001). Acredita-se também, que o padrão de expressão do colágeno XVIII mude durante o desenvolvimento (Lin et al., 2001), sugerindo que essas moléculas exerçam um importante papel no desenvolvimento.

Tamba e colaboradores (2010) avaliaram o padrão da expressão de genes nas células do cumulus em camundongos com o objetivo de entender o papel da sinalização do receptor de prostaglandinas (Ptger2) durante a ovulação e fecundação, sabendo-se que a prostaglandina E2 (PGE2) é um dos principais mediadores da resposta às gonadotrofinas. Para isso, a expressão de genes foi avaliada em células do cumulus de camundongos normais e com deleção do gene Ptger2^{-/-}, utilizando-se a análise de transcrito. A deficiência de Ptger2 afetou diferencialmente a expressão de muitos genes nas células do cumulus e dentre os genes com maior expressão foram identificados genes da família do colágeno, tais como COL18A1, COL4A1, COL4A2 e COL6A1. Esses resultados indicam que o padrão da expressão de genes nas células do cumulus difere antes e após a ovulação e a sinalização PGE2-Ptger2 exerce um papel crítico na expressão de genes regulados pelo AMPc nas células do cumulus sob condições fisiológicas.

As glicanas (GPCs) são uma família de proteoglicanas sulfato heparan (HSPG) da superfície da célula, caracterizadas por se ligarem à superfície celular por uma âncora, denominada glicosilfosfatidilinositol (De Cat & David, 2001). Em estudos genéticos e embriológicos, as glicanas foram relacionadas à regulação de eventos de sinalização celular durante a morfogênese e fisiologia de organismos adultos (Fico et al., 2011). As glicanas, como outras HSPG, modulam a sinalização mediada por moléculas extracelulares, incluindo Wnts, proteínas morfogenética de osso (BMPs) e FGFs (De Cat & David, 2001; Nybakken & Perrimon, 2002). Embora essas moléculas de sinalização tenham receptores transmembranas

específicos, as HSPGs são necessárias como sítios de ligação acessórias de baixa-afinidade que facilitam ou estabilizam a interação do ligante ao receptor principal de alta-afinidade. A proteína gpc4 tem sido estudada por se ligar a FGF2, portanto, acredita-se que o GPC4 tenha um possível papel na modulação da sinalização do FGF (Hagihara et al., 2000). As glicanas estão entre as mais abundantes HSPGs no desenvolvimento do sistema nervoso e são expressas em células-tronco neurais adultas e embrionárias (De Cat & David, 2001). Manipulações feitas em embriões de *Xenopus* têm demonstrado o papel das glicanas no desenvolvimento do cérebro, sugerindo que mutações nesses genes podem acarretar desordens no sistema nervoso. Portanto, o interesse das glicanas na medicina molecular tem sido a descoberta de mutações nos genes GPC3 e GPC4 em humanos que estão associados com a Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel, cujas manifestações clínicas incluem super crescimento pré e pós-natal e anomalias morfológicas. A função de GPC4, como de outros genes desta família, parece estar associada à regulação da divisão celular (Waterson et al., 2010). Em humanos, um estudo conduzido por van Montfoort e colaboradores (2008) revelou um padrão de expressão diferencial de genes nas células do cumulus como um prognóstico indicador da viabilidade do embrião. Nesse estudo, o GPC4 foi detectado dentre os genes com expressão diferencial e foi demonstrado estar envolvido na sinalização celular.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, 121:647–653, 2001.
- ALLEMEERSCH, J.; DURINCK, S.; VANDERHAEGHEN, R.; et al. Benchmarking the CATMA microarray. A novel tool for arabidopsis transcriptome analysis. **Plant Physiology**, 137: 588–601, 2005.
- ANASTASI, S.; FIORENTINO, L.; FIORINI, M.; et al. Feedback inhibition by RALT controls signal output by the ErbB network. **Oncogene**, 22:4221–4234, 2003.
- ARICESCU, A.R., MCKINNELL, I.W., Halfter, W., Stoker, A.W. Heparan sulfate proteoglycans are ligands for receptor protein tyrosine phosphatase sigma. **Molecular Cell Biology**, 22, 1881–1892, 2002.
- ASSIDI, M., DUFORT, I., ALI, A., HAMEL, M., ALGRIANY, O., DIELEMANN, S., SIRARD, M. A. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with folliclestimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. **Biology of Reproduction**, 79, 209–222, 2008.
- ASSIDI, M.; DIELEMAN, S.J.; SIRARD, M.A. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, Dec;140(6):835-52, Aug 19, 2010.
- ASSIDI, M.; MONTAG, M.; VAN DER VEN, K.; SIRARD, M.A. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Feb; 28(2):173-88, 2011.
- ASSOU, S.; ANAHORY, T.; PANTESCO, V. et al. The human cumulus–oocyte complex gene-expression profile. **Human Reproduction**, 21:1705–1719, 2006.
- ASSOU, S.; HAOUZI, D.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. **Molecular Human Reproduction**, Vol.16, No.8 pp. 531–538, 2010.

ATEF, A.; FRANÇOIS, P.; CHRISTIAN, V.; MARC-ANDRÉ, S. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development**, Jul;71(3):358-67, 2005.

AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. Reproduction in mammals, edited by; Cambridge university Press, London, Vol. 1: **Germ Cells and Fertilization**, 177 pp., 1982.

AUSTIN, E.J., MIHM, M.; EVANS, A.C.; IRELAND, J.L.; IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Effects of oestradiol and progesterone on secretion of gonadotrophins and health of first wave follicles during the oestrous cycle of beef heifers. **Reproduction**. Oct;124(4):531-41, 2002.

BALABAN, B.; URMAN, B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. **Reproductive Biomedicine Online**, 12:608–15, 2006.

BAO, B.; GARVERICK, H.A.; SMITH, M.F. 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, p.1158-1168, 1997.

BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotrophin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, 76, 1466–1473, 1998.

BARAN, V., PAVLOK, A., BJERREGAARD, B., et al. J. Immunolocalization of upstream binding factor and pocket protein p130 during final stages of bovine oocyte growth. **Biology of Reproduction**, 70, 877–886, 2004.

BEENKEN, A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, Mar;8(3):235-53, 2009.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K. et al. Follicle Selection in Cattle: Dynamics of Follicular Fluid Factors During Development of Follicle Dominance. **Biology of Reproduction**, v.66, p.120–126, 2002.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; LEE, K. B. et al. G. W. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. **Biology of Reproduction**, 79, 301–309, 2008.

BETTERIDGE, K.J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R.B.; XU, K.P.; KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.

BIGGERS JD, WHITTINGHAM DG, DONAHUE RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. **Zoology**, 58:560–567, 1967.

BILODEAU S, FORTIER MA, SIRARD MA. Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and cumulus-enclosed bovine oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 97:5-11, 1993.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. May;41(1):54-62, 1995.

BUKOVSKI, A.; CAUDLE, M.R.; SVETLIKOVA, M.; UPADHYAYA, N.B. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p.2-20, 2004.

BREVINI-GANDOLFI, T.A.; FAVETTA, L.A.; MAURI, L. et al. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, 52:427–433, 1999.

BREVINI-GANDOLFI, T. A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, 55, 1255–1276, 2001.

BREVINI, T.A.; LONERGAN, P.; CILLO F. et al. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, 63:510–517, 2002.

BRYANT, P.A.; VENTER, D.; ROBINS-BROWNE, R.; CURTIS, N. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. **Lancet Infectious Diseases**, 4, 100–111, 2004.

BUCCIONE R, VANDERHYDEN BC, CARON PJ, EPPIG JJ.. FSH-induced expansion of themouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. **Developmental Biology**, 138:16–25, 1990.

BURATINI JR, J.; TEIXEIRA, A.B.; COSTA, I.B. et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, 130:343-50, 2005.

CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M.M.; JUNIOR, J.B.; DODE, M.A.N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction Fertility and Development**, 21:655–664, 2009.

CAO, M.; NICOLA, E.; PORTELA, V.M.; PRICE, C.A. Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. **Matrix Biology**, 25:342–354, 2006.

CATALDO, N.A.; GIUDICE, L.C. Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlate with follicular functional status. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 74:821–829, 1992.

CHANDRASEKHER, Y.A.; VAN DESSEL, J.; FAUSER, B.C.; GIUDICE, L.C. Estrogen- but not androgen-dominant human ovarian follicular fluid contains an insulin like growth factor binding protein-4 protease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 80:2734–2739, 1995.

CHANG, H.; BROWN, C.W.; MATZUK, M.M. Genetic analyses of the mammalian transforming growth factor beta superfamily. **Endocrine Reviews**, 23:787–823, 2002.

CONOVER, C.A.; OXVIG, C.; OVERGAARD, M.T.; CHRISTIANSEN, M.; GIUDICE, L.C. Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 84:4742–4745, 1999.

CONOVER, C.A.; FAESSEN, G.F.; ILG, K.E. et al. Pregnancy-associated plasma protein-a is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum. **Endocrinology**, 142:2155, 2001.

CONWAY-CAMPBELL, B.L.; WOOH, J.W.; BROOKS, A.J.; GORDON, D.; BROWN, R.J.; LICHANSKA, A.M. et al. Nuclear targeting of the growth hormone receptor results in dysregulation of cell proliferation and tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 104:13331–6, 2007.

COOKE, F.N.; PENNINGTON, K.A.; YANG, Q.; EALY, A.D. Several fibroblast growth factors are expressed during pre-attachment bovine conceptus development and regulate interferon-tau expression from trophectoderm. **Reproduction**, 137:259–69, 2009.

COTICCHIO, G.; SERENI, E.; SERRAO, L.; MAZZONE, S.; IADAROLA, I.; BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality? **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1034:132–144, 2004.

CROZET, N.; KANKA, J.; MOTLIK, J., FULKA, J. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. **Gamete Research**, 14, 65–73, 1986.

DE CAT, B.; DAVID, G. Developmental roles of the glypicans. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 12:117–125, 2001.

DEKEL, N.; LAWRENCE, T.S.; GILULA, N.B.; BEERS, W.H. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. **Developmental Biology**, 86:356–362, 1981.

DE LOOS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIP, T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, Mar, 28(3):255-9, 1991.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, 57: 1420-1425, 1997.

DE SOUSA, P.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A.; BILODEAU-GOESEELS, S. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. **Molecular Reproduction and Development**, Sep; 51(1):112-21, 1998.

DE WIT, A. A. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, T. A. M. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus–oocyte complex. **Journal of Animal Science**, 78, 1277–1283, 2000.

DHANABAL, M.; RAMCHANDRAN, R.; WATERMAN, M.J.; LU, H.; KNEBELMANN, B.; SEGAL, M.; SUKHATME, V.P. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, 274, 11721–11726, 1999.

DHANASEKARAN, S.; DOHERTY T. M.; KENNETH, J.; TB Trials Study Group. (Mar). "Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification". **Immunology Methods**, 354 (1–2): 34–9, 2010.

DIAZ, F.J.; O'BRIEN, M.J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.J. The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. **Developmental Biology**; 299:91–104, 2006.

DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VIUFF, D. et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, Jan 1; 57(1):5-20, Review, 2002.

DIXELIUS, J.; LARSSON, H.; SASAKI, T. et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. **Blood**, Jun 1; 95(11):3403-11, 2000.

DODE; M.A.N. Aspectos importantes na maturação ovocitária em bovinos. **Workshop de Reprodução Animal**. Palestras e resumos/Embrapa Clima Temperado, Documentos, 181, (2005: Pelotas, RS), ISSN 1516-8840.128 p., 2006.

DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N.; MATZUK, M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, 383:531–535, 1996.

DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of Reproduction**, 71, 1813–1821, 2004.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, 35, 55–68, 1991.

DRIANCOURT, M.A.; REYNAUD, K.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Roles of kit and kit ligand in ovarian function. **Reviews of Reproduction**, 5:143–52, 2000.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**. v.55, p.1211-1239, 2001.

ELVIN, J.A.; CLARK, A.T.; WANG, P.; WOLFMAN, N.M.; MATZUK, M.M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology**, 13:1035–1048, 1999.

EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C.; O'BRIEN, M.J. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. **Journal of Reproduction and Fertility**, May; 95(1):119-27, 1992.

EPPIG, J.J.; TELFER, E.E. Isolation and culture of oocytes. In: Wassarman, P.M., DePamphilis, M.L. (Eds.), **Methods in Enzymology**. Academic Press, San Diego, pp. 77–84, 1993.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of Reproduction**, 56:976–984, 1997.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99:2890–4, 2002.

EPPIG, J.J.; PENDOLA, F.L.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, J.K. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. **Biology of Reproduction**, 73:351–357, 2005.

ETIENNE-MANNEVILLE, S., HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, 420, 629–635, 2002.

EVANS, A.C.O.; FORDE, N.; O'GORMAN, G.M., et al. Use of Microarray Technology to Profile Gene Expression Patterns Important for Reproduction in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, 43 (Suppl. 2), 359–367, 2008.

FAEDO, A.; BORELLO, U.; RUBENSTEIN, J.L. Repression of Fgf signaling by sprouty1-2 regulates cortical patterning in two distinct regions and times. **Journal of Neuroscience**, Mar 17; 30(11):4015-23, 2010.

FAGUNDES, N.S.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A, CAIXETA, E.S.; MACHADO G.M.; RODRIGUES, F.C.; MELO, E.O.; DODE, M.A.N.; FRANCO, M.M. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the IGF2 locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. **Molecular Human Reproduction**, Feb; 17(2):85-91. Epub 2010 Sep 10, 2011.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, 42, 437–442, 1995.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, 43, 503–512, 1996.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTEL, P.; BOLAND, M.; GREVE, T. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, 195, 327–336, 1997a.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTEL, P.; BOLAND, M.; GREVE, T. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, 46, 208–215, 1997b.

FAIR; T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence **Animal Reproduction Science**, 78, 203–216, 2003.

FAIR, T.; MURPHY, M.; RIZOS, D.; MOSS, C.; MARTIN, F.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, 67, 136–144, 2004.

FAIR T, CARTER F, PARK S, EVANS ACO, LONERGAN P. Global gene expression analysis during bovine oocyte invitro maturation. **Theriogenology**, 68(Suppl. 1), S91–S97, 2007.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E. et al. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. **Animal Reproduction Science**, 98: 97–112, 2007.

FATEHI, A.N.; ZEINSTRA, E.C.; KOOIJ, R.V.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. **Theriogenology**, v.57, p.1347-1355, 2002.

FATEHI, A. N.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B. Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, 13 : pp 177-185, 2005.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, 2009 Mar 15; 71(5):836-48. Epub Jan 3, 2009.

FICO, A.; MAINA, F.; DONO, R. Fine-tuning of cell signaling by glypicans. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 68:923–929, 2011.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p.135-163, 2003.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

FUKUI, Y. Effect of follicle cells on acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 26, 40–46, 1990.

GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIDGE, L.M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, 25:279–283, 2000.

GESHI, M.; TAKENOUCI, N.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. **Biology of Reproduction**, 63(6): 1730-1734, 2000.

GHANEM, N.; HÖLKER, M.; RINGS, F.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.A, et al. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. **Developmental Biology**, 7: 1-19, 2007.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Mouse oocyte mitogenic activity is developmentally coordinated throughout folliculogenesis and meiotic maturation. **Developmental Biology**, 240:289–298, 2001.

GILCHRIST, R.B.; MORRISSEY, M.P.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Comparison of oocyte factors and transforming growth factor-beta in the regulation of DNA synthesis in bovine granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 201:87–95, 2003.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, 82–83: 431–446, 2004.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, 67:6–15, 2007.

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, 14:159–177, 2008.

GIUDICE, L.C. Insulin-like growth factor family in Graafian follicle development and function. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, 8:S26–S29, 2001.

GONÇALVES, P.B.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.; MANTAGNER, M.M.; COSTA, L.F. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela. p. 195-226, 2002.

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge, UK: CAB International, Raven Press, p.4349, 1994.

GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T. et al. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 68:441–448, 2004.

GUTIERREZ, C.G.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. 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**, 56:608–616, 1997.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, p. 431-467, 2004.

HAGEMANN, L.J.; BEAUMONT, S.E.; BERG, M.; DONNISON, M.J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A.J. et al. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, 53: 451-8, 1999.

HAGER, J. Making and using spotted DNA microarrays in an academic core laboratory. **Methods in Enzymology**, 410, 135–168, 2006.

HAGIHARA, K.; WATANABE, K.; CHUN, J.; YAMAGUCHI, Y. Glypican-4 is an FGF2-binding heparan sulfate proteoglycan expressed in neural precursor cells. **Developmental Dynamics**, 219:353–367, 2000.

HAIMOV-KOCHMAN, R.; RAVHON, A.; PRUS, D. et al. Expression and regulation of Sprouty-2 in the granulosa-lutein cells of the corpus luteum. **Molecular Human Reproduction**, 11:537–542, 2005.

HAMEL, M.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; GRAVEL, C.; LEVEILLE, M.C.; LEADER, A.; SIRARD, M.A. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. **Human Reproduction**, May;23(5):1118-27, 2008.

HAMATANI, T.; CARTER, M.G.; SHAROV, A. A.; KO, M.S. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. **Developmental Cell**, 6:117-131, 2004.

HANAFUSA, H.; TORII, S.; YASUNAGA, T.; NISHIDA, E. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. **Nature Cell Biology**, Nov;4(11):850-8, 2002.

HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; SHIMADA, M. et al. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? **Molecular Endocrinology**, Jun; 20(6):1300-21, 2006.

HIRSHFIELD; A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v.124, p.43-101, 1991.

HOLM, P.; SHUKRI, N. N.; VAJTA, G.; BOOTH, P.; BENDIXEN, C.; CALLESEN, H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**. Dec; 50(8):1285-99, 1998.

HOURVITZ, A.; WIDGER, A.E.; FILHO, F.L.; CHANG, R.J.; ADASHI, E.Y.; ERICKSON, G.F. Pregnancy-associated plasma protein-A gene expression in human ovaries is restricted to healthy follicles and corpora lutea. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 85:4916–4920, 2000.

- HOURVITZ, A.; KUWAHARA, A.; HENNEBOLD, J.D. et al. The regulated expression of the pregnancy associated plasma protein-A in the rodent ovary: a proposed role in the development of dominant follicles and of corpora lutea. **Endocrinology**, 2002; 143:1833–1844, 2002.
- HUANG, Z.; WELLS, D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. **Molecular Human Reproduction**, Vol.16, No.10 pp. 715–725, 2010.
- HUANG, Y.C.; LIN, J. M.; LIN, H. J. et al. Genome-wide Association Study of Diabetic Retinopathy in a Taiwanese Population. **American Academy of Ophthalmology**, ISSN 0161-6420/11– Published by Elsevier Inc, 2011.
- HULSHOF, S.C.J.; BEVERS, M.M.; VAN DER DONK, H.A.; VAN DEN HURK, R. The isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. In: **Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction**, vol. 1, The Hague, pp. 336–338, 1992.
- HUNTER, A.G.; MOOR, R.M. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. **Journal of Dairy Science**, Aug;70(8):1646-51, 1987.
- HUSSEIN, T.S.; FROILAND, D.A.; AMATO, F.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, 118:5257–5268, 2005.
- HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, 76, 645–656, 1986.
- HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, 38 (Suppl.), 35–47, 1989.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth. **Theriogenology**, 47, 23–32, 1997.
- ITOH, N.; ORNITZ, D.M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends in Genetics**, 20:563–569, 2004.
- JIANG, Z.; RIPAMONTE, P.; BURATINI, J.; PORTELA, V.; PRICE, C. Fibroblast growth factor-2 regulation of sprouty and NR4A genes in bovine ovarian granulosa cells. **Journal of Cellular Physiology**, Nov 10, 1820-1827, 2010.
- JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J.K.; TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, 428:145-50, 2004.
- JOHNSON, M.H. Ovarian Function in the Adult. In: Johnson and Everitt (eds). **Essential Reproduction**, 6th edn. Blackwell Scientific Ltd, Oxford, UK,. 82–91, 2007.

- JOYCE, I.M.; CLARK, A.T.; PENDOLA, F.L.; EPPIG, J.J. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, 63:1669–75, 2000.
- KASTROP, P.M.; HULSHOF, S.C.; BEVERS, M.M.; DESTRÉE, O.H.; KRUIP, T.A. The effects of alpha-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, Mar; 28(3):249-54, 1991.
- KATOH, M.; KATOH, M. Identification and characterization of ARHGAP24 and ARHGAP25 genes in silico. **International Journal of Molecular Medicine**, 14:333– 8, 2004.
- KAUFFOLD, J.; AMER, H. A.; BERGFELD, U.; WEBER, W.; SOBIRAJ, A. The *in vitro* developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. **Journal of Reproduction and Development**, 51, 325–332, 2005.
- KAWAMURA, K.; YE, Y.; LIANG, C.G. , et al. Paracrine regulation of the resumption of oocyte meiosis by endothelin-1. **Developmental Biology**, Mar 1; 327(1):62-70, 2009.
- KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, Review, Aug;132(2):191-206, 2006.
- KOCABAS, A.M.; CROSBY, J.; ROSS, P.J. et al. The transcriptome of human oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103:14027-14032, 2006.
- KUBELKA, M.; MOTLÍK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, Feb; 62(2):292-302, 2000.
- KWINTKIEWICZ, J.; GIUDICE, L.C. The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. **Seminars in Reproductive Medicine**, 27:43–51, 2009.
- KWON, H; CHOI, D.; BAE J., et al. mRNA expression pattern of insulin-like growth factor components of granulosa cells and cumulus cells in women with and without polycystic ovary syndrome according to oocyte maturity. **Fertility and Sterility**, Volume 94, Issue 6, November, Pages 2417-2420, 2010.
- LARSON, R.C.; IGNOTZ, G.G.; CURRIE, W.B. Transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. **Molecular Reproduction and Development**, 33:432–5, 1992.
- LEQUARRE, A. S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F. et al. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, 63, 841–859, 2005.

LI, R.; NORMAN, R.J.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of Reproduction**, 63:839–845, 2000.

LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, Volume 46, Issue 3, August, Pages 429-439, 1996.

LIN, Y.; ZHANG, S.; REHN, M. et al. Induced repatterning of type XVIII collagen expression in ureter bud from kidney to lung type: association with sonic hedgehog and ectopic surfactant protein C. **Development**, 128, 1573–1585, 2001.

LODDE, V.; MODINA, S.; GALBUSERA, C.; FRANCIOSI, F.; LUCIANO, A.M. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, Jun;74(6):740-9, 2007.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 37: 48-53, 1994.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F. et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, 117:159–167, 1999.

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; FUENTE, J.D.; BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 57:146–152, 2000.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animal**, 38:259–267, 2003.

LUCIDI, P.; BERNABÒ, N.; TURRIANI, M.; BARBONI, B.; MATTIOLI, M. Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, May 28; 1:45, 2003.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, 61: 329-35, 2004.

MADDOX-HYTTEL, P.; BJERREGAARD, B; LAURINCIK, J. Meiosis and embryo technology: renaissance of the nucleolus. **Reproduction, Fertility and Development**, 17, 3–14, 2005.

MAKABE, S.; NAGURO, T.; STALLONE, T. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron

microscopy in humans. **Microscopy Research and Technique**, Review, Jun;69(6):436-49, 2006.

MASON, H.D.; CWYFAN-HUGHES, S.; HOLLY, J.M.; FRANKS, S. Potent inhibition of human ovarian steroidogenesis by insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4). **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 83: 284–7, 1998.

MASUI, Y.; CLARKE, H.J. Oocyte maturation. **International Review of Cytology**, 57:185-282. Review, 1979.

MAZERBOURG, S.; OVERGAARD, M.T.; OXVIG, C. 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**, 142:5243–5253, 2001.

MCKENZIE, L.J.; PANGAS, S.A.; CARSON, S.A. et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. **Human Reproduction**, 19:2869–2874, 2004.

MEDICALGENOMICS. **Genetic data and bioinformatics services**. Disponível em: <http://medicalgenomics.org/details_view_limited?db=rna_seq_atlas&gene_id=58504> Acesso em: 21/09/2011.

MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, 130:791–799, 2005.

MEINECKE, B.; MEINECKE-TILLMAN, S. Effects of alpha-amanitin on nuclear maturation of porcine oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, 98:195–201, 1993.

MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K.; GARCIA, S.M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**. Jul;82-83:13-20, 2004.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, Jan;55(1):89-95, 2000.

MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, Jan 15;59(2):651-74, 2003.

MEYER, T.; HANSON, P.I.; STRYER, L.; SCHULMAN, H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. **Science**, 256:1199–202, 1992.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J.; GOOD, T.E.M. et al. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 811-819, 2000.

MISIRLIOGLU, M.; PAGE, G.P.; SAGIRKAYA, H.; KAYA, A.; PARRISH, J.J.; FIRST, N.L.; MEMILI, E. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103:18905-18910, 2006.

MONGET, P.; MAZERBOURG, S.; DELPUECH, T. et al. Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. **Biology of Reproduction**, 68:77–86, 2003.

MOOR, R.M.; MATTIOLI, M.; DING, J.; NAGAI, T. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, 40,197–210, 1990.

MOTLÍK, J.; FULKA, J. JR.; PROCHÁZKA, R.; RIMKEVICOVÁ, Z. et al. RNA and protein synthesis requirements for the resumption of meiosis in rabbit oocytes: the role of cumulus cells. **Reproduction Nutrition Development**, 29(5):601-9, 1989.

MOTLÍK, J.; PAVLOK, A.; LAPATHITIS, G.; KUBELKA, M. Impact of Two-step *in vitro* Culture Systems on Developmental Potency of Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, Volume 35, Issue 6, pages 267–271, December, 2000.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S. AND SIRARD, M. A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, 73, 1367–1379, 2006.

NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. **Zygote**, Feb;14(1):53-61, 2006.

NEIRA, J.A.; TAINTURIER, D.; PENA, M.; MARTAL, J. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, 73:595– 604, 2009.

NEMCOVA, L.; MACHATKOVA, M.; HANZALOVA, K.; HORAKOVA, J.; KANKA, J. Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage. **Theriogenology**, Apr 15;65(7):1254-64, 2006.

NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 8, p. 17-20, 2001.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, 1 (3): 1559–1582. doi:10.1038/nprot.2006.236. PMID 17406449, 2006.

- NORRIS, R.P.; RATZAN, W.J.; FREUDZON, M. et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, 136:1869–1878, 2009.
- NYEGAARD, M.; OVERGAARD, M. T.; SU, Y. et al. Lack of Functional Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPPA) Compromises Mouse Ovarian Steroidogenesis and Female Fertility. **Biology of Reproduction**, 82, 1129–1138, 2010.
- OCHSNER, S.A.; DAY, A.J.; RUGG, M.S.; BREYER, R.M.; GOMER, R.H.; RICHARDS, J.S. Disrupted function of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. **Endocrinology**, Oct;144(10):4376-84. Epub 2003 Jul 17, 2003.
- OH, S.P.; WARMAN, M.L.; SELDIN, M.F. et al. Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type XVIII collagen and localization of the alpha 1(XVIII) collagen gene to mouse chromosome 10 and human chromosome 21. **Genomics**, 19: 494–499, 1994.
- OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99:8060–8065, 2002 .
- PALMA, G. Producción *in vitro* de embriones bovinos In: G Palma (Ed.), **Biotecnología de la Reproducción**, capítulo XIII, Ediciones INTA, Balcarce, Argentina, 225-294, 2001.
- PANGAS, S.A.; MATZUK, M.M. The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. **Biology of Reproduction**, Oct;73(4):582-5, 2005.
- PARADIS, F.; VIGNEAULT, C.; ROBERT, C.; SIRARD, M.A. RNA interference as a tool to study gene function in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, Feb;70(2):111-21, 2005.
- PATEL, O.V.; BETTEGOWDA, A.; IRELAND, J. J.; COUSSENS, P. M.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor development competence of bovine oocytes. **Reproduction**, 133, 95–106, 2007.
- PATRIZIO, P.; FRAGOULI, E.; BIANCHI, V.; BORINI, A.; WELLS, D. Molecular methods for selection of the ideal oocyte. **Reproductive BioMedicine Online**,15:346–353, 2007.
- PAVLOK, A., LUCAS-HAHN, A., AND NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, 31, 63–67, 1992.
- PFARRER, C; WEISE, S.; BERISHA, B. et al. Fibroblast growth factor (FGF)-1, FGF2, FGF7 and FGF receptors are uniformly expressed in trophoblast giant cells during restricted trophoblast invasion in cows. **Placenta**, 27:758 –70, 2006.
- PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 145:27–37, 1998.

- PRESICCE, G.A.; JIANG, S.; SIMKIN, M.; ZHANG, L.; LOONEY, C.R.; GODKE, R.A. et al. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. **Biology of Reproduction**, 56: 386-92, 1997.
- PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M.T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, 61: 735-44, 2004.
- QUELARD, D., LAVERGNE, E., HENDAOU, I., et al. A cryptic frizzled module in cell surface collagen 18 inhibits Wnt/beta-catenin signaling. **Plos One**, 3, e1878, 2008.
- RACEDO, S. E., WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., SALAMONE, D., AND NIEMANN, H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine *in vitro* matured oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 75, 17–25, 2008.
- REGASSA, A.; RINGS, F.; HOELKER, M., et al. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. **BMC Genomics**, Jan 24;12:57, 2011.
- REHN, M.; PIHLAJANIEMI, T. Alpha 1(XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91: 4234–4238, 1994.
- REVEL, F.; MERMILLOD, P.; PEYNOT, N.; RENARD, J.P.; HEYMAN, Y. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **J Reproduction and Fertility**, 103: 115-20, 1995.
- RIDLEY, A. JRho GTPases and cell migration. **Journal of Cell Science**, 114, 2713–2722, 2001.
- ROBERT, C., BARNES, F. L.; HUE, I.; SIRARD, M. A. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 57, 167–175, 2000.
- ROBERT, C.; GAGNE' D, BOUSQUET D, BARNES FL, SIRARD M-A. Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger RNA associated with bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, 64:1812–1820, 2001.
- ROBERT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTTE, L.; PRAVETONI, M.; GANDOLFI, F.; SIRARD, M.A. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, 67:1465–1472, 2002.
- ROBKER, R.L.; RUSSELL, D.L.; ESPEY, L.L.; LYDON, J.P., O'MALLEY, B.W., RICHARDS, J.S. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Apr 25; 97(9):4689-94, 2000.

- RODRIGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. **Theriogenology**, May;61(7-8):1499-511, 2004.
- RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; SCHELLANDER, K.; LEWIN, H. A. Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. **Society for Reproduction and Fertility**, ISSN 1470–1626, 2008.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 77-92, 1983.
- RUSSELL, D.L.; SALUSTRI, A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. **Seminars in Reproductive Medicine**, Sep; 24(4):217-27, 2006.
- SAARELA, J.; YLIKARPPA, R.; REHN, M.; PURMONEN, S.; PIHLAJANIEMI, T. Complete primary structure of two variant forms of human type XVIII collagen and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. **Matrix Biology**, 16: 319–328, 1998.
- SABATEL, C.; CORNET, A.M.; TABRUYN, S.P.; MALVAUX, L.; CASTERMANS, K.; MARTIAL, J.A.; STRUMAN, I. Sprouty1, a new target of the angiostatic agent 16K prolactin, negatively regulates angiogenesis. **Molecular Cancer**, Sep 2; 9:231, 2010.
- SALAMONE, D.F.; DAMIANI, P.; FISSORE, R.A.; ROBL, J.M.; DUBY, R.T. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. **Biology of Reproduction**, 64: 1761–8, 2001.
- SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, M.; HASCALL, V.C. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. **Journal of Biological Chemistry**, Aug 15; 264(23):13840-7, 1989.
- SALUSTRI, A.; ULISSE, S.; YANAGISHITA, M.; HASCALL, V.C. Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor-beta. **Journal of Biological Chemistry**, 265:19517–19523, 1990.
- SANZ-MORENO, V.; GADEA, G.; AHN, J. et al. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. **Cell**, 135:510 –23, 2008.
- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, 270, 467–470, 1995.
- SCHMIDT, A.; ADDICKS, K.; BLOCH, W., Opposite effects of endostatin on different endothelial cells. **Cancer Biology and Therapy**, 3, 1162–1168, 2004.
- SCHULZE, A.; DOWNWARD, J. Navigating gene expression using microarrays – a technology review. **Nature Cell Biology**, 3, 190–195, 2001.
- SENEDA, M. M.; BORDIGNON, V. New concepts on folliculogenesis. **Acta Science Veterinarie**, v. 35, p. 863-868, 2007.

SENBON, S.; HIRAO, Y.; MIYANO, T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from *in vitro* culture. **Journal of Reproduction and Development**, Review, Aug; 49(4):259-69, 2003.

SHAROV, A.A.; PIAO, Y.; MATOBA, R. et al. Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. **Plos Biology**, 1:E7, 2003.

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

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, Jan 15;49(2):483-97. Review, 1998.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, Volume 55, Issue 6, 1 April, Pages 1241-1254, 2001.

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

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v. 3, p.147-160, 2005.

SOYAL, S.M.; AMLEH, A.; DEAN, J. Fig α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development. **Development**, 127:4645–55, 2000.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with orphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, 64, 904–909, 2001.

SUGIURA, K.; SU, Y.Q.; LI, Q.; WIGGLESWORTH, K.; MATZUKM, M.; EPPIG, J.J. Fibroblast growth factors and epidermal growth factor cooperate with oocyte-derived members of the TGFbeta superfamily to regulate Spry2 mRNA levels in mouse cumulus cells. **Biology of Reproduction**, 81:833–841, 2009.

SUN, Q.Y.; MIO, Y.L.; SCHATTEN, H. Towards new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. **Cell Cycle**, 8:2741–2747, 2009.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, 9:35–48, 2003.

SUTTON-MCDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, 139:685–695, 2010.

SUZUKI, K.; ERIKSSON, B.; SHIMIZU, H. et al. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized *in vitro*. **Internacional Journal of Andrology**, 23, 13–21, 2000.

SWANSON, S.M., KOPCHICK, J.J. Nuclear localization of growth hormone receptor: another age of discovery for cytokine action? **Science Signaling**, p. 69, 2007.

TAFT, R.A.; DENEGRE, J.M.; PENDOLA, F.L.; EPPIG, J.J. Identification of genes encoding mouse oocyte secretory and transmembrane proteins by a signal sequence trap. **Biology of Reproduction**, Sep;67(3):953-60, 2002.

TAJIK, P.; NIWA, K.; MURASE, T. Effects of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. **Theriogenology**, 40, 949–958, 1993.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S. et al. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, August 1, vol. 49 no. 2 228-232, 1993.

TAMBA, S.; YODOI, R.; MORIMOTO, K. et al. Expression profiling of cumulus cells reveals functional changes during ovulation and central roles of prostaglandin EP2 receptor in cAMP signaling. **Biochimie**, Jun; 92(6):665-75, 2010.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK. H.; CORYN. M.; DE KRUIF.; A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p. 414-424, 2002.

TATEMOTO, H.; TERADA, T. Time-dependent effects of cycloheximide and alpha-amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, Apr 15;43(6):1107-13, 1995.

TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. Protection of Porcine Oocytes Against Apoptotic Cell Death Caused by Oxidative Stress During In Vitro Maturation: Role of Cumulus Cells. **Biology of Reproduction** , 63, 805–810, 2000.

TESFAYE, D; WORKU, D.; RINGS, F.; PHATSARA, C.; THOLEN, E.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. **Molecular Reproduction and Development**, Jul; 76(7):665-77, 2009.

THIERRY VAN DESSEL, H.J.; CHANDRASEKHER, Y.; YAP, O.W.; LEE, P.D., et al. Serum and follicular fluid levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding protein-1 and -3 during the normal menstrual cycle. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 1996; 81:1224–1231, 1996.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K.V.; CHAUBE, S.K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, Review, Jun; 223(3):592-600., 2010.

VACCARI, S.; HORNER, K.; MEHLMANN L.M.; CONTI, M. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: Endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. **Developmental Biology**, 316:124–134, 2008.

VAN DEN HURK, R., ABIR, R., TELFER, E.E., BEVERS, M.M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, 6:457-74, 2000.

VAN DEN HURK, R., ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, 63:1717-51, 2005.

VAN MONTFOORT, A.P.; GERAEDTS, J.P.; DUMOULIN, J.C. et al. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. **Molecular Human Reproduction**, Mar; 14(3):157-68. Epub Jan 18, 2008.

VANDERHYDEN, B.C.; ARMSTRONG, D.T. Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilisation and subsequent development of rat oocytes. **Biology of Reproduction**, 40:720–728, 1989.

VANDERHYDEN, B.C.; CARON, P.J.; BUCCIONE, R.; EPPIG, J.J. Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. **Developmental Biology**, 140:307–317, 1990.

VANDERHYDEN, B.C.; MACDONALD, E.A.; NAGYOVA, E.; DHAWAN, A. Evaluation of members of the TGF β superfamily for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. **Reproduction. Supplement**, 61:55–70, 2003.

VOZZI, C.; FORMENTON, A.; CHANSON, A. et al. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. **Reproduction**, Oct; 122(4):619-28, 2001.

WANG, Q.T.; PIOTROWSKA, K.; CIEMERYCH, M.A.; MILENKOVIC, L.; SCOTT, M.P.; DAVIS, R.W.; ZERNICKA-GOETZ, M. A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. **Developmental Cell**, 6:133–144, 2004.

WANG, Q.; SUN, Q.Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Developmental**, Review; 19(1):1-12, 2007.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill JD, editors. **The physiology of reproduction**, Vol. 1, 2nd edition. Raven Press, NY, pp 79–122, 1994.

WATERSON, J.; STOCKLEY, T.L.; SEGAL, S.; GOLABI, M. Novel duplication in glypican-4 as an apparent cause of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, Dec;152A(12):3179-81, 2010.

WEBB, R.; CAMPBELL, B.K.; GARVERICK, H.A.; GONG, J.G.; GUTIERREZ, C.G.; ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, Review, 54:33-48, 1999.

WEBB, R.J.; MARSHALL, F.; SWANN, K.; CARROLL, J. Follicular-stimulating hormone induces gap junction-dependent dynamic changes in [cAMP] and protein kinase A in mammalian oocytes. **Developmental Biology**, 246: 441–454, 2002.

WILLIAMS, B.A.; GWIRTZ, R.M.; WOLD, B.J. Genomic DNA as a cohybridization standard for mammalian microarray measurements. **Nucleic Acids Research**, 32: e81, 2004.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Timing of blastocyst expansion affects spatial messenger RNA expression patterns of genes in bovine blastocysts produced in vitro. **Biology of Reproduction**, 2003 Jun; 68(6):2073-80. Epub Jan 8, 2003.

XU, Z.Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNQUIST, R.S. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, 53, 951–957, 1995.

YAO, J.; REN, X.; IRELAND, J.J.; COUSSENS, P.M.; SMITH, T. P.L; SMITH, G.W. Generation of bovine oocyte cDNA library and microarray: resources for identification of genes important for follicular development and early embryogenesis. **Physiological Genomics**, 19 84–92, 2004.

YE, Y.; KAWAMURA, K.; SASAKI, M. et al. Leptin and ObRa/MEK signalling in mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development. **Reproductive Biomedicine Online**, Aug; 19(2):181-90, 2009.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J.L. et al. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, May;63(8):2147-63, 2005.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P.J. et al. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, Volume 40, Issue 3, pages 338–344, March, 1995.

ZHANG, X.; JAFARI, N.; BARNES, R.B.; CONFINO, E.; MILAD, M.; KAZER, R.R. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. **Fertility and Sterility**, 83(Suppl. 1): 1169–1179, 2005.

ZHONG, W.; WANG, Q.T.; SUN, T. et al. FGF ligand family mRNA expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem cells. **Molecular Reproduction and Development**, 73:540–550, 2006.

**CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE CÉLULAS DO CUMULUS
BOVINAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE GENES MARCADORES DA COMPETÊNCIA
OVOCITÁRIA**

1 RESUMO

As camadas de células do cumulus que circundam o ovócito são essenciais para a maturação ovocitária, ovulação, bem como a fecundação. Desta forma, mensagens estocadas nessas células podem ser indicadoras diretas do status de desenvolvimento do ovócito. Portanto, o estudo da expressão de genes nas células do cumulus pode auxiliar no melhor entendimento da aquisição da competência, além de permitir a identificação de marcadores para o potencial de desenvolvimento embrionário. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão global de genes utilizando-se a análise de microarranjo para identificação de genes marcadores da competência ovocitária nas células do cumulus bovina de ovócitos de diferentes níveis de competência. Para a realização do microarranjo, o RNA total foi extraído a partir de três *pools* de células do cumulus, provenientes em média de 26 a 30 folículos de cada categoria (1-3 e $\geq 8,1$ mm de diâmetro). Após a amplificação do RNA, foi realizada a hibridação nas lâminas do microarranjo, leitura e análises dos resultados. A partir dessa análise, foram identificados 4.178 genes diferencialmente expressos ($P < 0,05$) dos quais 2.297 genes tiveram menor expressão e 1.881 genes maior expressão nas células do cumulus bovinas de folículos $\geq 8,1$ mm comparado aos de 1-3 mm de diâmetro. Dentre os genes diferencialmente expressos utilizou-se um critério de corte adicional em que somente aqueles com $2,5x$ *fold* para mais ou menos foram considerados. Foi, então, gerada uma lista de 143 genes mais expressos, 80 genes menos expressos em CCs obtidas de ovócitos competentes em relação aos incompetentes. Esses genes foram investigados de acordo com suas respectivas funções celulares e moleculares e a maioria deles foram classificados como relacionados às funções do ciclo celular, ovulação e inflamação, reparo de DNA, metabolismo de energia, metabolismo de aminoácidos, sinalização celular e meiose. Três vias moleculares envolvendo esses genes foram discutidas. Apesar dos vários genes identificados e do estudo funcional realizado, mais estudos são necessários para a validação dos genes para confirmar ou não o seu potencial de marcadores da qualidade do ovócito.

Palavras Chave: expressão gênica, transcrito, células do cumulus, ovócito

2 ABSTRACT

The cumulus cells layers surrounding the oocyte are essential for oocyte maturation, ovulation and fertilization. Then the messages stored in cumulus cells may be direct indicators of oocyte developmental status. Therefore, studies of gene expression in cumulus cells may help to better understand the acquisition of competence, and allow the identification of potential markers for embryonic development. The aim of this study was to evaluate global gene expression using microarray analysis to identify molecular markers of oocyte competence in bovine cumulus cells with different levels of competence. To perform the microarray, total RNA was isolated from three pools of cumulus cells, obtained from an average of 26 to 30 follicles of each category, 1-3 and ≥ 8.1 mm in diameter, respectively. After RNA amplification, hybridization was performed on microarray slides, followed by scanning and analysis of results. From this analysis, we identified 4,178 genes differentially expressed ($P < 0.05$) in which 2,297 genes were down regulated and 1,881 were up regulated in cumulus cells of bovine follicles ≥ 8 mm compared to 1-3mm diameter. In the differentially expressed genes, an additional cut-off value of 2.5x fold up or down was used. Then, a list was generated with 143 up and 80 down regulated genes in CCs of competent oocytes in relation to incompetent. These genes were investigated according to their molecular and cellular functions and most of them were classified as related to cell cycle, ovulation and inflammation, DNA repair, energy metabolism, amino acids metabolism, cell signaling and meiosis. Three molecular pathways involving these genes were discussed. Although the genes identified were classified according to their function, the validation of those genes to confirm their role as their potential biomarkers of oocyte quality is needed.

Key words: gene expression, transcriptome, cumulus cells, oocyte

3 INTRODUÇÃO

Parâmetros morfológicos, tais como a forma, homogeneidade do citoplasma, presença do corpúsculo polar e compactação das células do cumulus têm sido rotineiramente utilizados para selecionar ovócitos com o intuito de aumentar a produção de embriões (Armstrong, 2001; Lonergan et al., 2003; Coticchio et al., 2004; Krisher, 2004). Entretanto, é bem conhecido que os critérios morfológicos isolados são insuficientes para distinguir ovócitos mais competentes dos menos competentes (Lonergan et al., 2003; Coticchio et al., 2004; Krisher 2004). Por essas razões, apesar de todo o conhecimento já adquirido nessa área, torna-se fundamental a busca de outros parâmetros indicativos da qualidade ovocitária, de modo a viabilizar uma seleção mais acurada para aplicação nas técnicas de reprodução assistida (TRAs) em animais e humanos.

Várias tentativas têm sido feitas para buscar marcadores da competência em ovócitos (de Witt et al., 2000; Stojkovic et al., 2001; Lonergan et al., 2003). Entretanto, todas essas abordagens são invasivas e inviabilizam a utilização posterior do ovócito. Desse modo, existe a necessidade de se buscar outras alternativas que permitam a seleção de ovócitos mais competentes para o desenvolvimento sem que os mesmos sejam danificados.

É bem conhecido que as comunicações bi-direcionais entre ovócitos e as células do cumulus ocorrem durante o desenvolvimento folicular (Buccione et al., 1990; Eppig et al., 2002; Senbon et al., 2003; Gilchrist et al., 2004; Makabe et al., 2006; Sirard et al., 2006) e são essenciais no desenvolvimento e aquisição da competência em ovócitos mamíferos (de Loos et al., 1991; Webb et al., 2002; Fair, 2003). Esse diálogo entre ovócito e células do cumulus é mediado principalmente através de junções intercelular do tipo *gap* (Herlands & Schultz, 1984) que são estabelecidas no início da ovogênese e que permanecem funcionais até o rompimento da vesícula germinativa durante a maturação ovocitária. (Hashimoto et al., 1998). Estudos prévios têm mostrado que a completa remoção das CC

antes da maturação *in vitro* ou o bloqueio das junções *gap* inibem a maturação do ovócito, (Vozzi et al., 2001), a fecundação (Motilik et al., 1989; Sirard et al., 1989; Kastrop et al., 1991; Tatemoto & Terada 1995; Vozzi et al., 2001) e o desenvolvimento embrionário posterior (Atef et al., 2005). Além de sua função no crescimento e competência do ovócito, as células do cumulus também exercem um papel importante na utilização de substratos e energia pelo ovócito (Sutton-McDowall et al., 2004), na prevenção contra o stress oxidativo induzido pela apoptose (Tatemoto et al., 2000; Fatehi et al., 2005) e na estimulação da síntese de glutathione (de Matos et al., 1997; de Matos et al., 2002) durante a maturação *in vitro* (Vanderhyden & Armstrong, 1989; Fukui, 1990; Moor et al., 1990).

Portanto, as mensagens estocadas nas células do cumulus podem ser indicadoras do *status* de desenvolvimento do ovócito. Desta forma, o estudo da expressão de genes nessas células pode auxiliar na elucidação dos sinais envolvidos no *cross-talk* entre ovócito e células do cumulus durante a foliculogênese. Além disso, pode auxiliar na identificação de marcadores para a qualidade embrionária que poderiam ser utilizados nas TRAs, sem afetar a viabilidade do ovócito.

Vários estudos têm sido realizados para a identificação de marcadores moleculares, utilizando a expressão de genes candidatos individualmente o que, apesar de ser um procedimento válido, pode ser muito demorado e caro. Entretanto, com o desenvolvimento de tecnologias que permitem a análise de genes em larga escala, tais como os microarranjos de DNA, torna-se possível a avaliação de centenas a milhares de genes simultaneamente (Rodriguez-Zas et al., 2008; Evans et al., 2008), o que torna possível identificar de forma mais rápida e mais precisa os candidatos a serem testados.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a expressão global de genes utilizando-se a técnica de microarranjo para identificação de genes marcadores da competência ovocitária nas células do cumulus bovinas obtidas de ovócitos de diferentes níveis de competência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Este experimento visou a identificação de marcadores para a competência ovocitária que são expressos pelas células do cumulus. Para isso foram utilizadas células do cumulus de COC provenientes de folículos de 1-3 mm e $\geq 8,1$ mm de diâmetro. Esses tamanhos foram selecionados considerando que, em estudos prévios, foi demonstrado que os ovócitos obtidos desses folículos podem ser considerados como incompetentes e competentes, respectivamente (Caixeta et al., 2009). As células do cumulus dessas duas categorias foram hibridadas em lâminas de microarranjo e a partir dos resultados foi gerada uma lista contendo os genes diferencialmente expressos entre as duas categorias. A lista de genes gerada foi submetida à análise de anotação funcional dos genes e processos biológicos em que estão envolvidos.

4.2 Recuperação e seleção dos complexos cumulus-ovócitos

Ovários de vacas mestiças foram coletados em abatedouro local e transportados até o laboratório em solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de antibióticos (penicilina G – 100 UI/ml e estreptomicina – 100ug/ml – Sigma, Sto Louis MO, USA), à temperatura de 35 a 37°C.

Os folículos foram dissecados do córtex ovariano em temperatura ambiente, com auxílio de tesoura, bisturi e pinças e foram mantidos em meio de lavagem (TCM-199

com sais de Hank's suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino ([SFB] – Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) sobre placa aquecedora durante todo o processo de dissecação. Posteriormente os folículos foram mensurados utilizando-se uma ocular graduada (*micrometer eyepiece* OSM-4® Olympus, Tokyo, Japan), classificados morfológicamente e selecionados de acordo com o diâmetro em folículos de 1-3 mm e $\geq 8,1$ mm. Além do tamanho, os critérios utilizados para a seleção dos folículos foram a presença de uma vascularização extensiva e fina e um aspecto translúcido e brilhante de forma homogênea. Esses tamanhos de folículos foram selecionados por conterem ovócitos competentes e incompetentes para maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário, conforme descrito por Caixeta e colaboradores (2009). Após a ruptura do folículo foram observadas, e também utilizadas para a seleção, a presença de células do cumulus com um aspecto regular e saudável (Blondin & Sirard, 1995) e ausência de partículas flutuantes no fluido folicular (de Wit et al., 2000). Cada COC liberado pela ruptura dos folículos, foi classificado de acordo com o aspecto e distribuição das células do cumulus e uniformidade do citoplasma (Figura 2.1). Somente as células do cumulus de ovócitos classificados como Grau 1 (COCs com citoplasma homogêneo e granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus) e Grau 2 (COCs com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares e cumulus compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos cinco camadas completas) foram utilizados neste experimento.

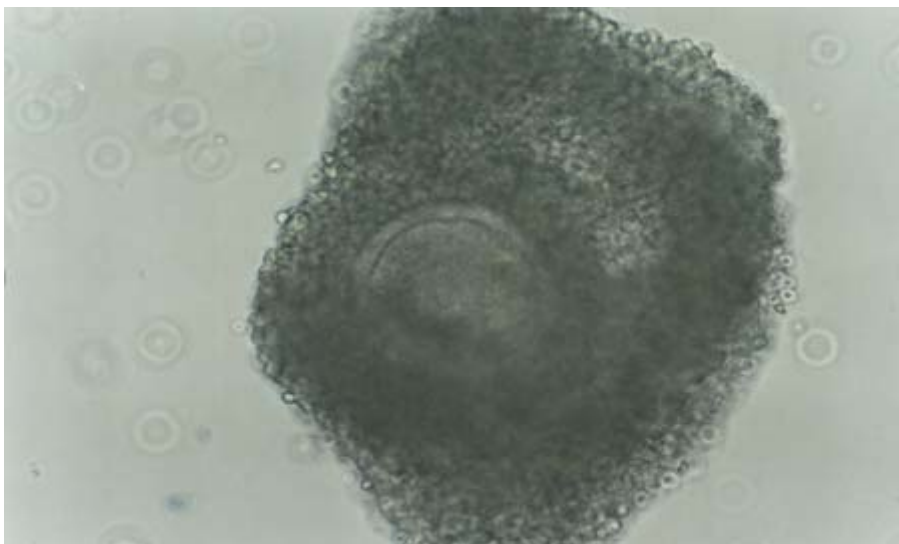


Figura 2.1 - Complexo cumulus-ovócito (COC) bovino.

4.3 Armazenamento das células do cumulus

Para a remoção das células do cumulus, os COCs classificados como Grau 1 e 2 foram transferidos para uma gota de 50 μ l de solução salina em tampão fosfato (PBS) onde foram desnudados por meio de sucessivas pipetagens até a completa remoção das mesmas. Após a remoção, a gota de 50 μ l de PBS com as células do cumulus foi transferida para um tubo de 0,2 ml e centrifugada duas vezes por 2 minutos a 700 x g para lavagem com PBS. O sobrenadante foi retirado, sendo adicionados 2 μ l de PBS ao pellet formado.

Ao final do procedimento, todos os tubos de células do cumulus foram armazenados a -80°C até o momento da extração de RNA. Para cada categoria de folículo foram estocados 3 *pools*, sendo cada um, correspondente às células do cumulus de 26-30 ovócitos.

4.4 Análise de microarranjo

4.4.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de 3 *pools* de células do cumulus, separadamente, provenientes em média de 26 a 30 folículos para cada categoria de COC, incompetente e competentes. A extração foi realizada utilizando-se o kit RNeasy Micro® (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante e o RNA foi eluído em 10 μ l de água livre de RNase. Após a extração, as amostras de RNA total foram submetidas à análise de qualidade, concentração e integridade utilizando-se o Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, USA) de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 2.1).

4.4.2 Amplificação de RNA total, síntese do cDNA e hibridação dos microarranjos

Todo processo de síntese do cDNA, amplificação e marcação dos transcritos com biotina, hibridação dos chips e análise dos microarranjos utilizando o RNA das células do cumulus oriundas de ovócitos competentes e incompetentes foi realizado pela empresa AFIP-Molecular Core (Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa. <http://www.afip.com.br/principal.asp>). O GeneChip® Bovine Genome Array (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) utilizado para essa análise contém 24.027 sondas correspondendo a aproximadamente 23.000 transcritos dos quais 19.000 são UniGene Cluster.

A quantidade de 100 ng de RNA total foi submetido à amplificação linear utilizando-se o kit GeneChip® 3' IVT Express aRNA amplification (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa para sintetizar a primeira fita de cDNA foi realizada com primer T7 oligo (dT) para a síntese de cDNA contendo uma sequência do promotor T7. A síntese da segunda fita de cDNA converte a fita-única de cDNA em um molde de DNA fita dupla para amplificação, seguido de transcrição. A reação utiliza DNA polimerase para o processo de síntese. Nova transcrição *in vitro* foi realizada para sintetizar o RNA antisense (RNAa) marcado com biotina utilizando-se o IVT Labeling Master Mix, o que gera múltiplas cópias de RNAa marcado com biotina a partir das duplas fitas de cDNA, no processo de amplificação. Em seguida, foi feita a purificação do RNAa, para remoção de nucleotídeos incorporados, sais, enzimas e fosfato inorgânico e melhorar a estabilidade do RNAa marcado com biotina. Ao final, o RNAa marcado foi fragmentado para hibridação no GeneChip® 3' expression arrays. A quantidade de 1 a 2 µg de RNAa foi hibridada ao GeneChip® Bovine Genome Array para cada réplica por 16 horas a 45°C. No total, foram hibridados 6 chips, sendo 3 réplicas biológicas para cada tratamento, ou seja, células de cumulus de folículos incompetentes e competentes (Tabela 2.1). Ao final, os arranjos foram processados de acordo com o protocolo do fabricante.

4.4.3 Análises dos resultados dos microarranjos, função molecular dos genes diferencialmente expressos e correlação de processos biológicos

As imagens foram adquiridas pelo Gene Chip Operating Software (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), provenientes dos dados brutos gerados no Scanner 7G 3000 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA).

O controle de qualidade e pré-processamento dos dados (transformações, correção de background, sumarização) foram realizados utilizando-se as ferramentas: os softwares R/AFFY e R/AFFYQCREPORT, complementadas com estatísticas geradas pelo RMA (*Robust Multichip Average*)/EXPRESS [RLE - Log Expressão Relativa (*Relative Log Expression*) e NUSE - Erros-padrão não-escalados normalizados (*Normalized Unscaled Standard Errors*)]. Foram considerados critérios de qualidade a porcentagem de sondas hibridadas, nível de *background*, fatores de escala para normalizar os dados, genes de controle interno (β -actina e GAPDH), degradação de RNA. As estatísticas geradas pelo RMA/EXPRESS, baseadas no software R foram usadas para julgar objetivamente a qualidade dos arranjos (Brettschneider et al., 2008). Somente foram listadas as sondas que apresentaram diferenças significativas de expressão com $P < 0,05$. O teste foi ajustado de forma que um valor positivo (> 1) de \log_2 (*fold change*) indica aumento da expressão gênica nas células do cumulus de folículo $\geq 8,1$ mm em relação ao folículo de 1-3 mm (Tabelas 2.2 e 2.3).

A classificação funcional dos genes diferencialmente expressos foi realizada utilizando-se a plataforma KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) de processamento de dados, disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html>, por meio da ferramenta de anotação funcional DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*).

A anotação funcional genômica, incluindo os mapas de vias metabólicas e processos biológicos dos genes menos e mais expressos de folículos incompetentes e competentes, foi realizada utilizando-se o software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA, v 8.7; Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com 2010) em interface com o DAVID, disponível *on line* em: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>. Cada via é composta de genes selecionados a partir da lista de genes diferencialmente expressos, obtida da análise de microarranjos, e agrupados em vias metabólicas ou processos biológicos de acordo com as análises do Ingenuity e DAVID. O uso da análise IPA e DAVID tem como objetivo a descoberta de algumas vias de genes e

explorar as possíveis interações entre os possíveis biomarcadores genômicos diferencialmente expressos em células do cumulus associados à qualidade do ovócito. Para os genes diferencialmente expressos utilizou-se um critério de corte que somente aqueles com $2,5x$ fold para mais ou menos foram considerados em relação a expressão nas células do cumulus provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados as de 1-3 mm.

4.5 Análise estatística

Os dados do microarranjos foram analisados em separado usando o procedimento R/ANOVA. As análises consistiram em:

1) Aplicar um modelo linear misto em dois estágios (Wolfinger et al., 2001):

$$Y_{ijkl} = m + T_i + A_{j(i)} + G_k + TG_{ik} + e_{ijk}$$

Y_{ijkl} é o valor normalizado da intensidade; m , mediana geral; A , T e G representam os efeitos principais de arranjo, tratamento e gene, respectivamente; TG é o efeito de interação entre gene e tratamento; e_{ijk} é o erro aleatório; i , intensidade de *spot* para o gene; k , arranjo;

$E(e_{ijk}) = 0$ e $Var(e_{ijk}) = \sigma^2_{e(k)}$, variâncias do erro heterogêneas para cada gene;

2) Testes F_S (ou t_S), como neste caso que há somente dois níveis no fator de interesse) combinando a informação específica de cada gene e global do experimento usando um fator de Shrinkage (Cui et al., 2003);

3) Permutações para obter valores críticos e p-valores para esses testes;

4) FDR (*False Discovery Rate*) para ajustar a taxa de falso-positivo, que foi fixada em 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise de dados do microarranjo

5.1.1 Extração de RNA

Os resultados da análise de qualidade do RNA total extraído das amostras de células do cumulus de folículos de 1-3 mm e $\geq 8,1$ mm para o experimento de microarranjos, utilizando-se o Agilent 2100 Bioanalyzer® estão demonstrados na tabela 2.1. O resultado da análise das amostras de RNA demonstrou que o RIN (*RNA Integrity Number*) variou entre 9,2 a 10, de acordo com a classificação da integridade do RNA (Schroeder et al., 2006), na qual dez categorias de RIN foram definidas de 1 (RNA totalmente degradado) a 10 (RNA completamente intacto).

Tabela 2.1. Análise de qualidade de RNA total extraído das amostras

Réplicas	Pools de CC (N)	Bioanalyzer (RIN)
Réplica 1		
1-3 mm	30	9,5
$\geq 8,1$ mm	27	10
Réplica 2		
1-3 mm	26	9,4
$\geq 8,1$ mm	26	9,6
Réplica 3		
1-3mm	26	9,2
$\geq 8,1$ mm	27	9,2

CC – células do cumulus; N – Número; RIN – *RNA Integrity Number*

5.1.2 Análise de dados do microarranjo

A análise dos arranjos foi considerada dentro dos padrões desejáveis com porcentagens de sondas hibridadas acima de 56% e um baixo nível de *background* ao redor de 35-44 pontos. Para todos os arranjos o fator de escala para normalização dos dados foi de 38, o que é considerado dentro dos padrões aceitáveis. O RMA Express apresentou limites de qualidade entre 95 e 99% tanto para a mediana quanto para a amplitude entre quartis (IQR) para os valores de RLE e NUSE, no qual as estimativas do erro padrão de todos os arranjos analisados estavam dentro dos padrões desejáveis de qualidade (Figura 2.2). Quando todas as amostras foram analisadas juntas, considerando RLE e NUSE, foi determinado que nenhum arranjo deveria ser descartado da análise estatística.

A partir da análise dos microarranjos foram identificados um total de 4.178 genes diferencialmente expressos ($P < 0,05$), dos quais 2.298 genes tiveram menor expressão e 1.880 genes com maior expressão nas células do cumulus bovinas de folículos ≥ 8 mm de diâmetro comparados aos de 1-3mm de diâmetro (Figura 2.3). As diferenças de expressão dos genes foram plotadas em gráfico (volcano), no qual se observa a dispersão dos transcritos expressos em folículos de 1-3 e $\geq 8,1$ mm de diâmetro, testados em relação à significância [$-\log_{10}$ (valor de P)] e as diferenças de expressão entre os folículos de diferentes tamanhos [Log_2 (*fold change*)]. Sendo que, quanto maior o valor de P, mais significativa a expressão e quanto mais se afasta de zero maior a mudança na expressão. Mais de 4.000 transcritos foram significativos pelo teste F_s que combina a informação específica de cada gene e a expressão global do experimento usando um fator de Shrinkage (Cui et al., 2003) e são apresentados em vermelho no gráfico (Figura 2.4).

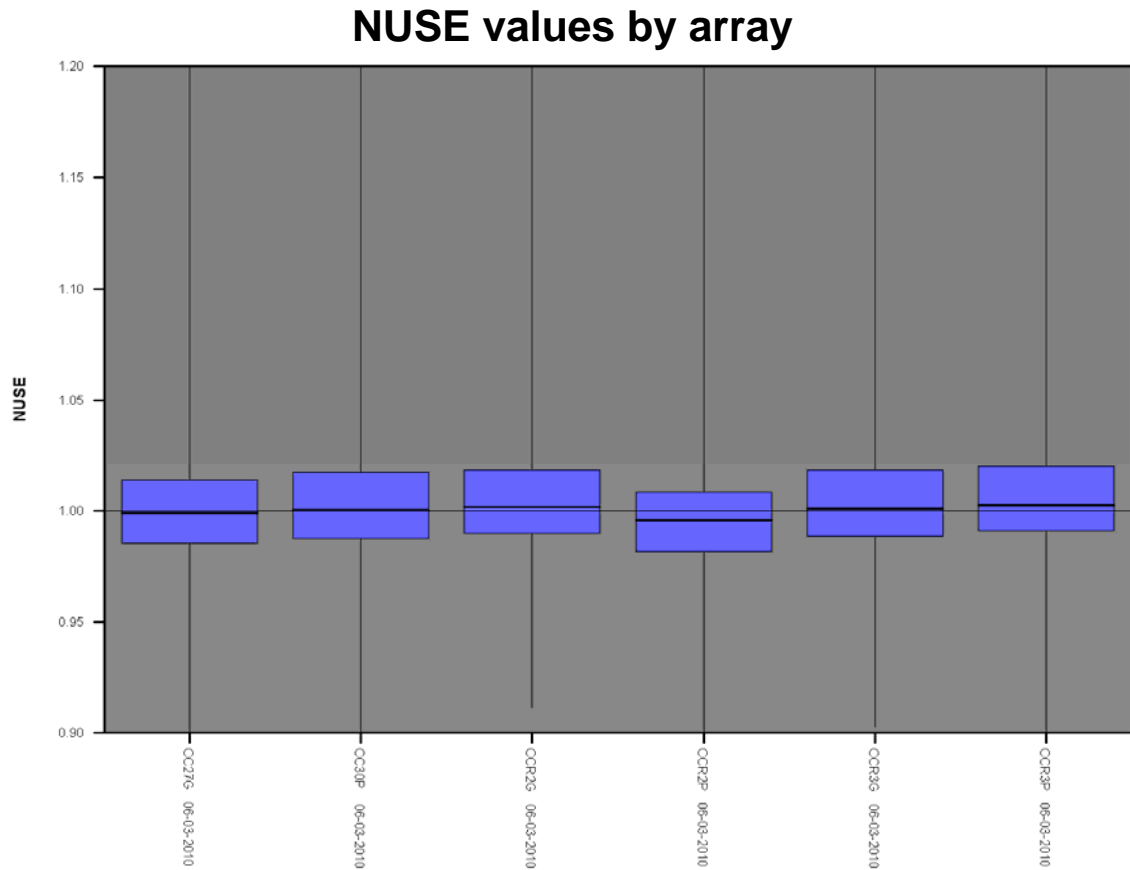


Figura 2.2 - NUSE - Erros-padrão não-escalados normalizados (*Normalized Unscaled Standard Errors*). Estimativas do erro padrão obtidas para cada gene em cada arranjo pelo modelo de sumarização (RMA).

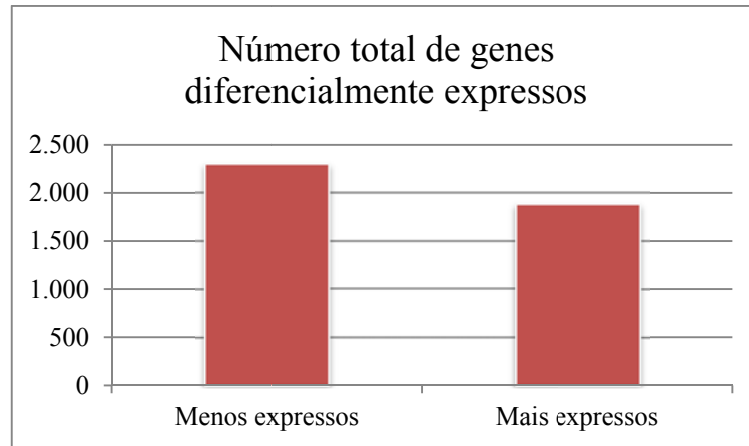


Figura 2.3 - Número total de genes menos e mais expressos em células do cumulus bovinas isoladas a partir de *pools* de COCs obtidos de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de folículos de 1-3 mm de diâmetro ($P < 0,05$), submetidas à análise de microarranjo.

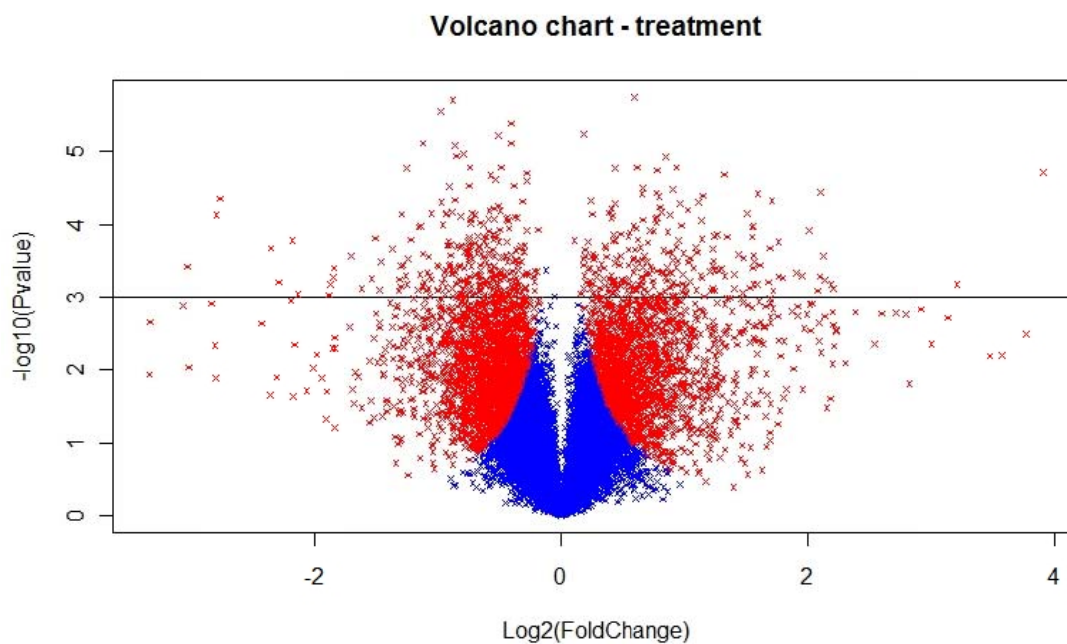


Figura .2.4 - Plotagem da dispersão dos transcritos de células do cumulus bovinas testados em relação à significância, $-\log_{10}$ (valor de P), e as diferenças de expressão gênica entre os folículos de 1-3 mm e $\geq 8,1$ mm, Log_2 (*fold change*). Quanto maior valor de P, mais significativa a expressão e quanto mais se afasta de zero maior a mudança na expressão. Os genes diferencialmente expressos que foram significativos pelo teste F_S aparecem em vermelho no gráfico.

5.2 Anotação funcional dos genes e processos biológicos envolvidos

Todos os genes diferencialmente expressos foram classificados funcionalmente baseados nos critérios de classificação da plataforma KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), e sua distribuição, estão apresentadas na Figura 2.5. De acordo com esta classificação, os genes menos expressos foram distribuídos em diversas categorias funcionais tais como: ciclo celular (20%), metabolismo de aminoácido (13%), sinalização celular (12%), reparo de DNA (10%), metabolismo de energia (9%) e meiose (9%). Da mesma forma, os genes mais expressos foram classificados funcionalmente em diversas categorias: ciclo celular (28%), ovulação e inflamação (23%), metabolismo de energia (18%) e sinalização celular (11%). Pode-se observar que a maioria dos genes mais e menos expressos em células do cumulus de ovócitos competentes se refere ao ciclo celular. Entretanto, os genes envolvidos na ovulação e inflamação foram somente aqueles com maior expressão em células do cumulus de ovócitos mais competentes oriundos de folículos de maior tamanho. Dentre os genes mais e menos expressos em células do cumulus de ovócitos mais competentes 20% e 27%, respectivamente, foram identificados como sem anotação e, portanto não pertencem a nenhuma categoria funcional. Uma relação de exemplares dos genes diferencialmente expressos em células do cumulus bovinas distribuídos de acordo com a classificação funcional é apresentada no anexo A.

Dentre os genes diferencialmente expressos utilizou-se um critério de corte que somente aqueles com $2,5x$ *fold* para mais ou menos foram considerados em relação a expressão nas células do cumulus provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados as de 1-3 mm. A partir desses resultados foi gerada uma lista de genes diferencialmente expressos, mais ($\geq 2,5$ *fold change*) e menos ($\leq 2,5$ *fold change*) expressos em células do cumulus de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, juntamente com a anotação funcional dos genes (Tabelas 2.2 e 2.3). Dentre os genes listados, 143 deles apresentaram expressão $\geq 2,5x$ (mais expressos) e 80 apresentaram expressão $\leq 2,5x$ (menos expressos) em células do cumulus de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, com uma variação de *fold change* de $2,5x$ a $14,9x$ e $0,4x$ a $0,1x$ respectivamente. Dentre esses genes diferencialmente expressos, 56 deles constituem sondas sem anotação.

A análise genômica funcional investigou as principais funções celulares e moleculares relativas aos genes listados, utilizando-se o software IPA em interface com o

DAVID. Nessa análise, dez vias moleculares, onde estão relacionados os genes menos e mais expressos em células do cumulus de ovócitos incompetentes e competentes foram selecionadas. As vias metabólicas 1 e 2 (VM1 e VM2) e a sinalização do interferon (Figuras 2.6, 2.7 e 2. 8) foram escolhidas para discussão e as demais vias estão apresentadas no anexo B (Figuras 2.B.9 a 2.B.15).

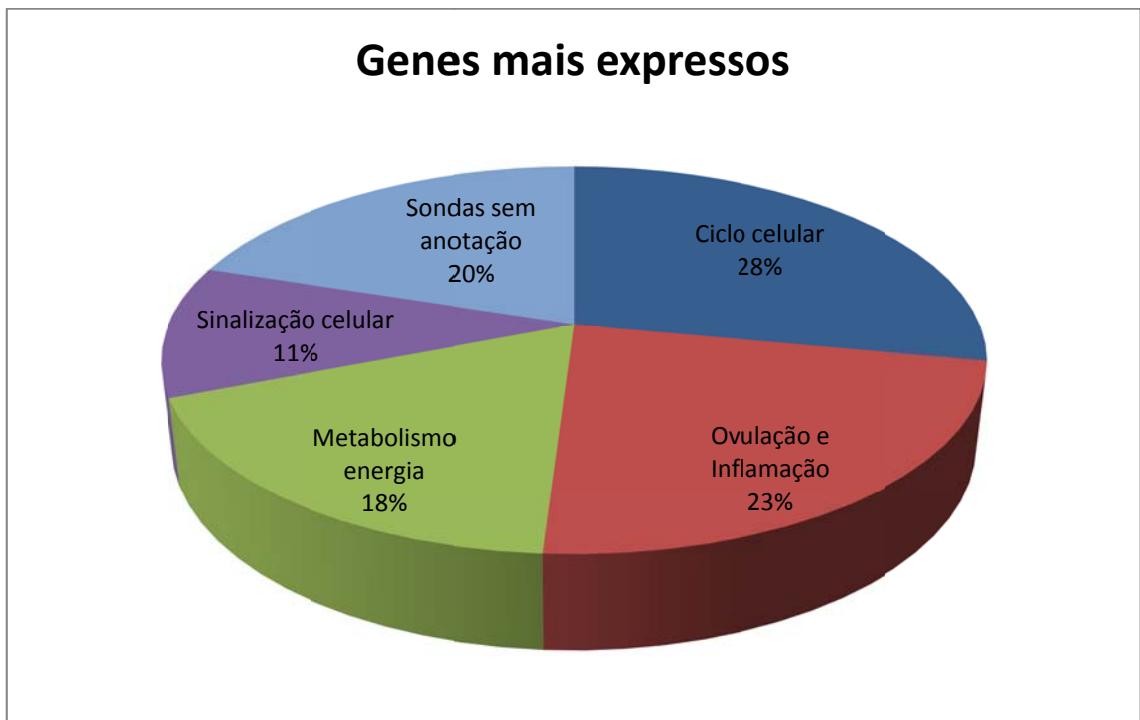
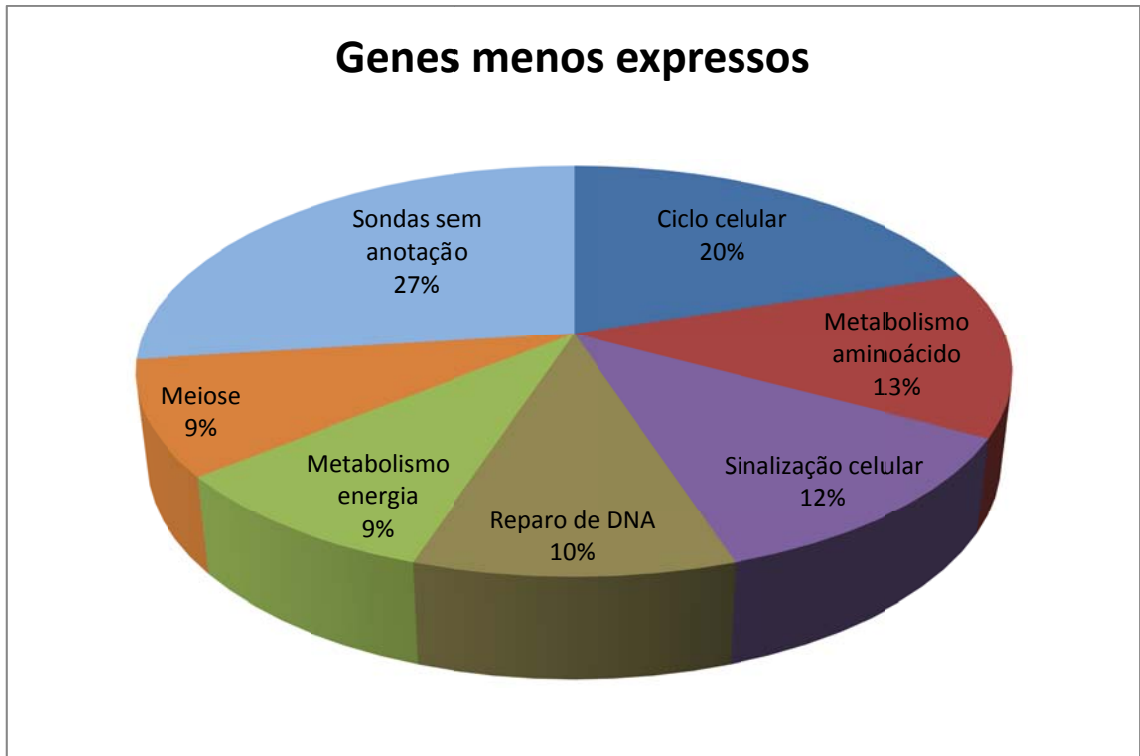


Figura 2.5 - Classificação funcional de todos os genes menos e mais expressos em células do cumulus bovinas de folículos $\geq 8,1$ mm de diâmetro comparados aos folículos de 1-3 mm, de acordo com KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

Tabela 2.2 - Lista de genes com expressão aumentada em células do cumulus bovinas provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm de diâmetro comparado aos folículos de 1-3 mm de diâmetro.

	NOME DO GENE	FOLD CHANGE	NOME COMPLETO DO GENE
1	SA	14,98	Sonda sem anotação
2	DLC1	13,60	<i>Bos taurus deleted in liver cancer 1</i>
3	PPP1R3C	11,90	<i>Bos taurus protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C</i>
4	ANKRD1	9,27	<i>Bos taurus ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)</i>
5	SPOCK2	8,79	<i>Bos taurus sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2</i>
6	SA	8,03	Sonda sem anotação
7	APOD	7,56	<i>Bos taurus apolipoprotein D</i>
8	BLA-DQB	7,07	<i>Bos taurus MHC class II antigen</i>
9	EGLN3	6,94	<i>PREDICTED: Bos taurus egl nine homolog 3 (C. elegans)</i>
10	NDRG1	6,53	<i>Bos taurus N-myc downstream regulated 1</i>
11	SA	5,81	Sonda sem anotação
12	LOC787239	5,22	<i>PREDICTED: Bos taurus similar to Synaptotagmin-1 (Synaptotagmin I) (SytI) (p65)</i>
13	SA	4,94	Sonda sem anotação
14	SLC39A8	4,63	<i>Bos taurus solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8</i>
15	FGF11	4,62	<i>Bos taurus fibroblast growth factor 11</i>
16	LOC525199	4,62	<i>PREDICTED: Bos taurus similar to GDNF-inducible zinc finger protein 1</i>
17	SA	4,59	Sonda sem anotação
18	BNIP3	4,59	<i>Bos taurus BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>
19	SLC2A1	4,55	<i>Bos taurus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1</i>
20	ISG15	4,55	<i>Bos taurus ISG15 ubiquitin-like modifier</i>
21	SLC2A3	4,45	<i>Bos taurus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3</i>
22	LOC539246	4,40	<i>PREDICTED: Bos taurus similar to C1orf51 protein</i>
23	CYP19	4,40	<i>Bos taurus cytochrome P450, family XIX (conversion of androgen to estrogen), aromatase</i>
24	SA	4,36	Sonda sem anotação
25	CDKN1A	4,28	<i>Bos taurus cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>
26	PRSS23	4,27	<i>Bos taurus protease, serine, 23</i>
27	GRK5	4,26	<i>Bos taurus G protein-coupled receptor kinase 5</i>
28	ARHGAP18	4,25	<i>Bos taurus Rho GTPase activating protein 18</i>
29	SA	4,22	Sonda sem anotação
30	SA	4,10	Sonda sem anotação
31	NDUFA4L2	4,06	<i>Bos taurus NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2</i>
32	LOC507426	4,05	<i>PREDICTED: Bos taurus similar to poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3</i>
33	DUSP7	4,02	<i>Bos taurus dual specificity phosphatase 7</i>
34	SA	3,97	Sonda sem anotação

35	PADI1	3,88	<i>Bos taurus</i> peptidyl arginine deiminase, type I
36	SEMA6D	3,86	<i>Bos taurus</i> sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
37	LOC790811	3,79	<i>Bos taurus</i> MHC class I antigen
38	SPRY1	3,78	<i>Bos taurus</i> sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (<i>Drosophila</i>)
39	MXI1	3,78	<i>Bos taurus</i> MAX interactor 1
40	KRT18	3,75	<i>Bos taurus</i> keratin 18
41	SA	3,69	Sonda sem anotação
42	PPP1R3B	3,66	<i>Bos taurus</i> protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B
43	CDKN1C	3,55	<i>Bos taurus</i> cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
44	MGC148992	3,50	<i>Bos taurus</i> similar to RGC-32
45	OAS1	3,48	<i>Bos taurus</i> 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
46	IGFBP4	3,47	<i>Bos taurus</i> insulin-like growth factor binding protein 4
47	SA	3,44	Sonda sem anotação
48	SA	3,40	Sonda sem anotação
49	SLC25A33	3,39	<i>Bos taurus</i> solute carrier family 25, member 33
59	MGC128424	3,39	PREDICTED: <i>Bos taurus</i> hypothetical protein MGC128424
51	IFI6	3,38	<i>Bos taurus</i> interferon, alpha-inducible protein 6
52	NT5E	3,29	<i>Bos taurus</i> 5'-nucleotidase, ecto (CD73)
53	CYP11A1	3,29	<i>Bos taurus</i> cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
54	ANKRD34A	3,27	<i>Bos taurus</i> ankyrin repeat domain 34A
55	TDRD6	3,24	<i>Bos taurus</i> tudor domain containing 6
56	SA	3,23	Sonda sem anotação
57	SA	3,23	Sonda sem anotação
58	ISG12(A)	3,22	PREDICTED: <i>Bos taurus</i> similar to putative ISG12(a) protein
59	LOC614107	3,22	PREDICTED: <i>Bos taurus</i> similar to Hexokinase-2 (Hexokinase type II) (HK II)
60	SA	3,22	Sonda sem anotação
61	SA	3,19	Sonda sem anotação
62	TAGLN	3,18	<i>Bos taurus</i> transgelin
63	BHLHB2	3,16	<i>Bos taurus</i> basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2
64	FABP4	3,16	<i>Bos taurus</i> fatty acid binding protein 4, adipocyte
65	MYLIP	3,15	<i>Bos taurus</i> myosin regulatory light chain interacting protein
66	MRAP	3,14	<i>Bos taurus</i> melanocortin 2 receptor accessory protein
67	SLC5A11	3,12	<i>Bos taurus</i> solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11
68	CPNE8	3,12	<i>Bos taurus</i> copine VIII
69	RGS1	3,09	<i>Bos taurus</i> regulator of G-protein signaling 1
70	TIPARP	3,06	<i>Bos taurus</i> TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase
71	F3	3,06	<i>Bos taurus</i> coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)
72	SA	3,06	Sonda sem anotação
73	SA	3,05	Sonda sem anotação
74	SA	3,03	Sonda sem anotação
75	HEG1	3,02	PREDICTED: <i>Bos taurus</i> HEG homolog 1 (zebrafish)
76	IL4R	3,02	<i>Bos taurus</i> interleukin 4 receptor
77	IFI30	3,00	<i>Bos taurus</i> gamma-inducible protein 30

78	HIVEP2	2,99	<i>Bos taurus human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2</i>
79	RASGRP1	2,99	<i>Bos taurus RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)</i>
80	PROX1	2,96	<i>Bos taurus prospero homeobox 1</i>
81	IRF9	2,96	<i>Bos taurus interferon regulatory factor 9</i>
82	SNAPC1	2,96	<i>Bos taurus small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43kDa</i>
83	TIMP1	2,95	<i>Bos taurus TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>
84	SRXN1	2,94	<i>Bos taurus sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)</i> <i>Bos taurus tuftelin 1</i>
85	TUFT1	2,94	
86	EIF4EBP1	2,94	<i>Bos taurus eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
87	ARRDC2	2,94	<i>Bos taurus arrestin domain containing 2</i>
88	ADFP	2,93	<i>Bos taurus adipose differentiation-related protein</i>
89	ERO1L	2,92	<i>Bos taurus ERO1-like</i>
90	SA	2,92	Sonda sem anotação
91	SLC16A3	2,91	<i>Bos taurus solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)</i>
92	HBM	2,91	<i>Bos taurus hemoglobin, mu</i>
93	RCAN3	2,89	<i>Bos taurus RCAN family member 3</i>
94	SA	2,88	Sonda sem anotação
95	SA	2,88	Sonda sem anotação
96	CDH8	2,85	<i>Bos taurus cadherin 8, type 2</i>
97	TFR2	2,85	<i>Bos taurus transferrin receptor 2</i>
98	SA	2,85	Sonda sem anotação
99	SA	2,84	Sonda sem anotação
100	EPHB6	2,84	<i>Bos taurus EPH receptor B6</i>
101	LOC100137875	2,80	<i>similar to MGC127538 protein</i>
102	SA	2,80	Sonda sem anotação
103	PIK3IP1	2,80	<i>phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1</i>
104	TIPARP	2,79	<i>Bos taurus TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase</i>
105	LOC541088	2,77	<i>Bos taurus similar to BCL-6 interacting corepressor</i>
106	CEBPD	2,77	<i>Bos taurus CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>
107	FOSL2	2,77	<i>Bos taurus FOS-like antigen 2</i>
108	LOC286871	2,75	<i>Bos taurus uterine milk protein</i>
109	INPP1	2,75	<i>Bos taurus inositol polyphosphate-1-phosphatase</i>
110	TNFAIP6	2,74	<i>Bos taurus tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6</i>
111	SA	2,73	Sonda sem anotação
112	UCN3	2,71	<i>Bos taurus urocortin 3 (stresscopin)</i>
113	BNIP3	2,70	<i>Bos taurus BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>
114	LOC100126815	2,69	<i>Bos taurus MHC class I-like family A1</i>
115	PDK4	2,68	<i>Bos taurus pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4</i>
116	SERPINE1	2,68	<i>Bos taurus serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</i>
117	NC	2,67	Sonda sem anotação
118	XAF1	2,67	<i>Bos taurus XIAP associated factor 1</i>
119	IFITM1	2,67	<i>Bos taurus interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)</i>
120	LGALS3	2,66	<i>Bos taurus lectin, galactoside-binding, soluble, 3</i>

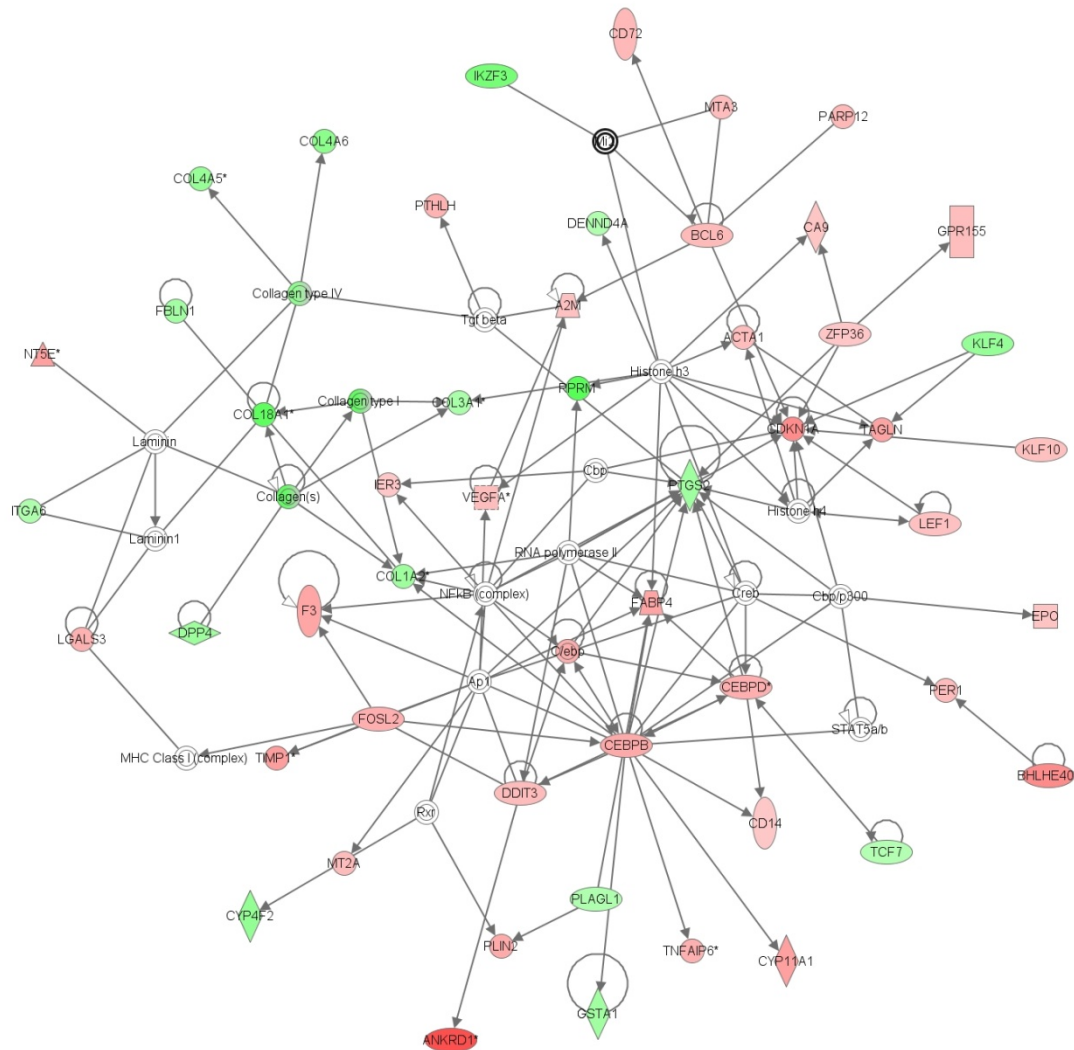
121	SA	2,65	Sonda sem anotação
122	LOC513548	2,64	<i>PREDICTED: Bos taurus similar to retinoic acid early transcript 1E</i>
123	LRP8	2,64	<i>Bos taurus low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor</i>
124	PLA2G7	2,64	<i>Bos taurus phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)</i>
125	PTHLH	2,64	<i>parathyroid hormone-like hormone</i>
126	SYNE1	2,63	<i>Bos taurus spectrin repeat containing, nuclear envelope 1</i>
127	MYH8	2,63	<i>Bos taurus myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal</i>
128	TMIGD1	2,61	<i>Bos taurus transmembrane and immunoglobulin domain containing 1</i>
129	STC1	2,59	<i>Bos taurus stanniocalcin 1</i>
130	SA	2,59	Sonda sem anotação
131	PCOLCE	2,58	<i>Bos taurus procollagen C-endopeptidase enhancer</i>
132	PFKP	2,56	<i>Bos taurus phosphofructokinase, platelet</i>
133	SA	2,55	Sonda sem anotação
134	GHR	2,55	<i>Bos taurus growth hormone receptor</i>
135	SA	2,54	Sonda sem anotação
136	RNF19B	2,54	<i>Bos taurus ring finger protein 19B</i>
137	ERRFI1	2,53	<i>Bos taurus ERBB receptor feedback inhibitor 1</i>
138	SA	2,52	Sonda sem anotação
139	STK38L	2,51	<i>PREDICTED: Bos taurus serine/threonine kinase 38 like</i>
140	PLN	2,51	<i>Bos taurus phospholamban</i>
141	TMEM88	2,51	<i>Bos taurus transmembrane protein 88</i>
142	CRABP2	2,50	<i>Bos taurus cellular retinoic acid binding protein 2</i>
143	SLC27A3	2,50	<i>Bos taurus solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3</i>

Tabela 2.3 - Lista de genes com expressão diminuída em células do cumulus bovinas provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm de diâmetro comparados aos folículos de 1-3 mm de diâmetro.

	NOME DO GENE	FOLD CHANGE	NOME COMPLETO DO GENE
1	DPP4	0,40	<i>Bos taurus dipeptidyl-peptidase 4</i>
2	SA	0,40	Sonda sem anotação
3	NSA	0,40	Sonda sem anotação
4	NUDT11	0,40	<i>Bos taurus nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 11</i>
5	SA	0,40	Sonda sem anotação
6	ACTN4	0,40	<i>Bos taurus actinin, alpha 4</i>
7	SA	0,40	Sonda sem anotação
8	SA	0,40	Sonda sem anotação
9	CYTL1	0,40	<i>Bos taurus cytokine-like 1</i>
10	SA	0,40	Sonda sem anotação
11	DSG2	0,40	<i>Bos taurus desmoglein 2</i>
12	ASS1	0,40	<i>Bos taurus argininosuccinate synthetase 1</i>
13	ACSM2A	0,40	<i>Bos taurus acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2A</i>
14	HOXA5	0,39	<i>Bos taurus homeobox A5</i>
15	C10H14orf37	0,39	<i>Bos taurus chromosome 14 open reading frame 37 ortholog</i>
16	LOC506812	0,39	<i>PREDICTED: Bos taurus similar to carnitine palmitoyltransferase 1C</i>
17	ABAT	0,39	<i>Bos taurus 4-aminobutyrate aminotransferase</i>
18	HAPLN3	0,39	<i>Bos taurus hyaluronan and proteoglycan link protein 3</i>
19	SA	0,39	Sonda sem anotação
20	SA	0,39	Sonda sem anotação
21	SA	0,38	Sonda sem anotação
22	COL4A5	0,38	<i>Bos taurus collagen, type IV, alpha 5</i>
23	KLF4	0,38	<i>Bos taurus Kruppel-like factor 4 (gut)</i>
24	CKAP2	0,37	<i>Bos taurus cytoskeleton associated protein 2</i>
25	CTSB	0,37	<i>Bos taurus cathepsin B</i>
26	KIT	0,37	<i>PREDICTED: Bos taurus v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
27	SA	0,37	Sonda sem anotação
28	LOC532603	0,37	<i>Bos taurus hypothetical protein LOC532603</i>
29	SPARCL1	0,37	<i>Bos taurus SPARC-like 1 (hevin)</i>
30	CYP4F2	0,37	<i>Bos taurus cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2</i>
31	SA	0,37	Sonda sem anotação
32	PCDH19	0,36	<i>Bos taurus protocadherin 19</i>
33	SA	0,36	Sonda sem anotação
34	MAT2A	0,36	<i>Bos taurus methionine adenosyltransferase II, alpha</i>
35	LRRC17	0,36	<i>Bos taurus leucine rich repeat containing 17</i>
36	LOC786672	0,36	<i>Bos taurus similar to tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2</i>
37	LTF	0,35	<i>Bos taurus lactotransferrin</i>
38	ACSS1	0,35	<i>Bos taurus acyl-CoA synthetase short-chain family member 1</i>

39	SA	0,35	Sonda sem anotação
40	ZFAND2A	0,35	<i>Bos taurus zinc finger, AN1-type domain 2A</i>
41	HOPX	0,35	<i>Bos taurus HOP homeobox</i>
42	COL4A6	0,34	<i>Bos taurus collagen, type IV, alpha 6</i>
43	SA	0,34	Sonda sem anotação
44	NNAT	0,34	<i>Bos taurus neuronatin</i>
45	SA	0,33	Sonda sem anotação
46	FBN1	0,33	<i>Bos taurus fibrillin 1</i>
47	SDPR	0,32	<i>Bos taurus serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)</i>
48	SA	0,32	Sonda sem anotação
49	CAPN6	0,31	<i>Bos taurus calpain 6</i>
50	ANG	0,31	<i>Bos taurus angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5</i>
51	SA	0,31	Sonda sem anotação
52	GPC4	0,31	<i>Bos taurus glypican 4</i>
53	SA	0,28	Sonda sem anotação
54	SA	0,28	Sonda sem anotação
55	SA	0,28	Sonda sem anotação
56	IKZF3	0,28	<i>Bos taurus IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)</i>
57	ASB15	0,28	<i>Bos taurus ankyrin repeat and SOCS box-containing 15</i>
58	MEST	0,27	<i>Bos taurus mesoderm specific transcript homolog (mouse)</i>
59	ARHGAP22	0,27	<i>Bos taurus Rho GTPase activating protein 22</i>
60	MUC13	0,27	<i>Bos taurus mucin 13, cell surface associated</i>
61	PXDN	0,27	<i>Bos taurus peroxidasin homolog (Drosophila)</i>
62	SA	0,26	Sonda sem anotação
63	JAKMIP1	0,25	<i>Bos taurus janus kinase and microtubule interacting protein 1</i>
64	GPM6B	0,25	<i>Bos taurus glycoprotein M6B</i>
65	SVOPL	0,24	<i>PREDICTED: Bos taurus SVOP-like</i>
66	SA	0,23	Sonda sem anotação
67	COL18A1	0,22	<i>Bos taurus collagen, type XVIII, alpha 1</i>
68	LOC782069	0,22	<i>PREDICTED: Bos taurus similar to G protein-coupled receptor</i>
69	ABCC8	0,22	<i>Bos taurus ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8</i>
70	RPRM	0,21	<i>Bos taurus reprimin, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate</i>
71	HSPA1A	0,20	<i>Bos taurus heat shock 70kDa protein 1A</i>
72	RGS2	0,20	<i>Bos taurus regulator of G-protein signaling 2, 24kDa</i>
73	CD99	0,19	<i>Bos taurus CD99 molecule</i>
74	MEST	0,15	<i>PREDICTED: Bos taurus mesoderm specific transcript homolog (mouse)</i>
75	DNAJB1	0,15	<i>Bos taurus DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1</i>
76	SA	0,14	Sonda sem anotação
77	SHISA2	0,14	<i>PREDICTED: Bos taurus shisa homolog 2 (Xenopus laevis)</i>
78	HIST3H2A	0,12	<i>Bos taurus histone cluster 3, H2a</i>
79	SA	0,10	Sonda sem anotação
80	SEPT4	0,10	<i>Bos taurus septin 4</i>

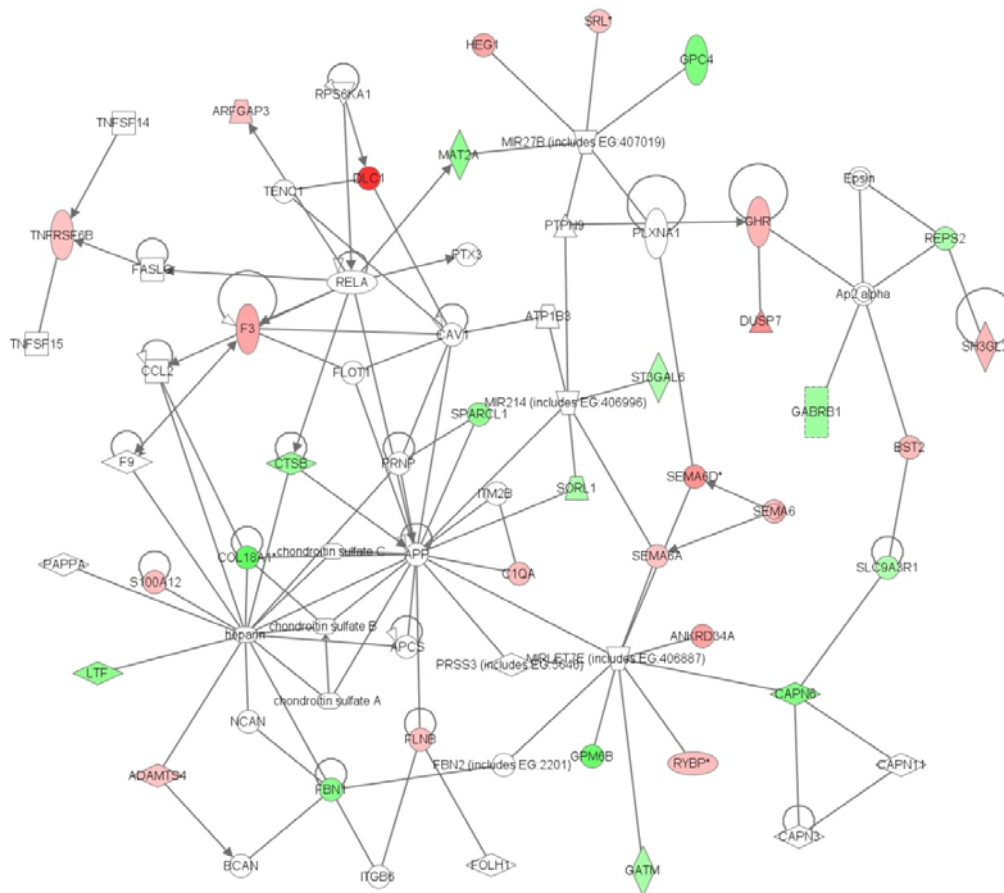
Network 1 : IPA566DEGs - 2010-09-29 08:11 PM : IPA566DEGs.xls : IPA566DEGs - 2010-09-29 08:11 PM



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 2.6 - Via metabólica 1 (VM1) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovinas provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (*Ingenuity Pathways Analysis*). Os genes mais expressos (vermelho) desta via são: COL4A5, PTHLH, NT5E, LGALS3, F3, FOSL2, TIMP1, ANKRD1, FAPB4, CEBPB, CEBPD, TNFAIP6, CYP11A1, CDKN1A. Os genes menos expressos (verde) são: COL4A6, IKZF3, COL4, COL18A1, RPRM, DPP4, CYP4F2, KLF4. Os genes diferencialmente expressos estão relacionados ao ciclo celular (CDKN1A, KLF4, CEBPB, CEBPD, RPRM, LGALS3, PTHLH, DPP4, ILR4); crescimento e proliferação celular (DLC1, F3, GPC4, SEMA6D, COL18A1, FBLN1, IZFK3, TNAIP6, FAPB4, CDKN1A, LEGALS3, KLF4, ANKRD1, TIMP1, DPP4, CEBPB, CEBBP); desordens da morfogênese, organogênese e doenças (COL18A1, CEBPB, CEBBP, PTHLH, CDKN1A) e resposta inflamação (F3, FBLN1, TNAIP6, FAPB4, CDKN1A, ANKRD1, DPP4, CEBPB, CEBBP).

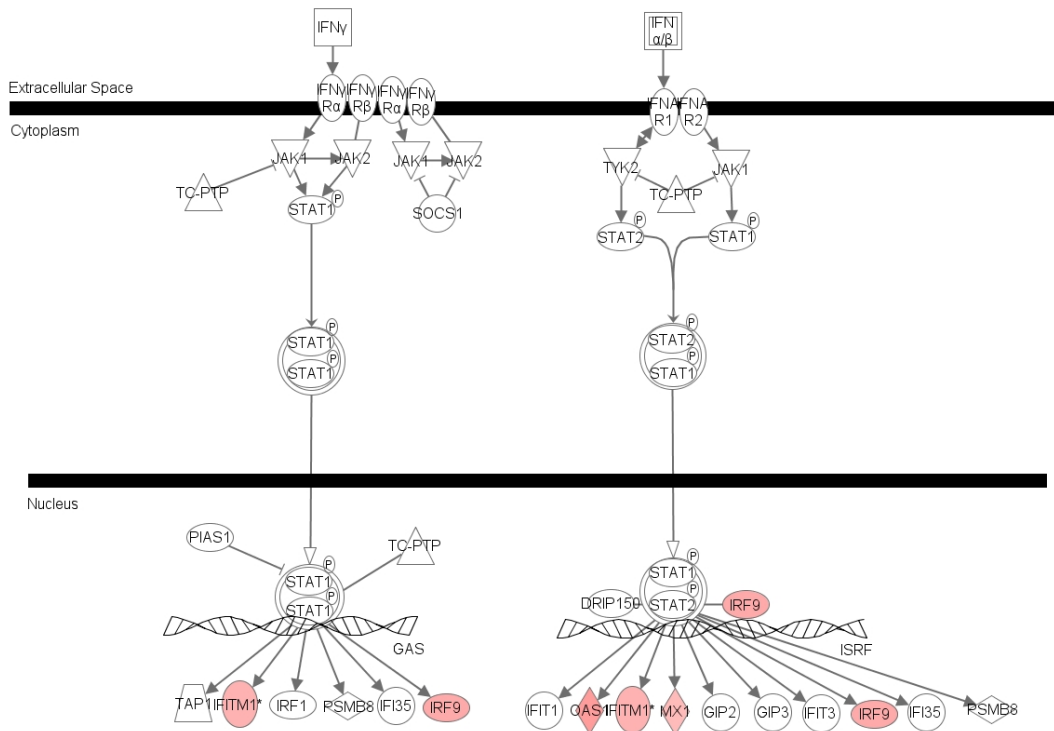
Network 5: IPA566DEGs - 2010-09-29 08:11 PM : IPA566DEGs.xls : IPA566DEGs - 2010-09-29 08:11 PM



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 2.7 - Via metabólica 2 (VM 2) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (*Ingenuity Pathways Analysis*). Os genes mais expressos (vermelho) são: HEG1, DLC1, GHR, DUSP7, F3 e ANKRD34A. Os genes menos expressos (verde) são: GPC4, MAT2A, SPARCL1, SEMA6D, COL18A1, CAPN6, FBN1 e GPM6B. Os genes diferencialmente expressos estão envolvidos com ciclo celular (GHR); crescimento e proliferação celular (GHR, DLC1, F3, GPC4, SEMA6D, COL18A1, FBN1, MAT2A) e desordens da morfogênese, organogênese e doenças (GHR, COL18A1).

Interferon Signaling



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 2.9 - Via molecular de sinalização de interferon gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (*Ingenuity Pathways Analysis*). Os genes mais expressos (vermelho) identificados são: IFITM1, IRF9, OAS1 e MX1 e estão relacionados com a resposta imune e anti-inflamatória, mediante ativação do interferon (Wolf et al., 2003; Bauersachs et al., 2008; Asirvatham et al., 2009).

6 DISCUSSÃO

Durante a foliculogênese, o ovócito inicialmente adquire primeiro a competência meiótica e posteriormente a competência para o desenvolvimento, que é conduzida, pelo menos em parte, pelas células somáticas circundantes (Tanghe et al., 2002). As células do cumulus mantêm cooperação metabólica com o ovócito, com fatores parácrinos e moléculas de baixo peso molecular mediando o diálogo entre os dois tipos celulares. Esta comunicação bidirecional é um fator determinante para a completa maturação do ovócito (Gandolfi et al., 2005). Portanto, a análise destas células pode fornecer importante informação a respeito do metabolismo envolvido na aquisição da competência do ovócito. Além disso, as células do cumulus são uma fonte promissora de marcadores moleculares para a predição da qualidade do ovócito (Cillo et al., 2007; Feuerstein et al., 2007; Assidi et al., 2008; Bettegowda et al., 2008).

Considerando essas informações, o presente trabalho foi o primeiro estudo realizado, visando à análise da expressão diferencial de genes em células do cumulus bovinas oriundas de complexos-cumulus ovócitos com diferentes graus de competências, utilizando-se o *Affymetrix GeneChip Genome Bovine Array*. Para a obtenção de células do cumulus de ovócitos de diferentes competências foi utilizado o modelo do tamanho do folículo, previamente estabelecido (Caixeta et al., 2009), o qual define que ovócitos de folículos maiores são mais competentes do que os de folículos menores. Portanto, foram utilizados dois grupos de células de cumulus sendo, um obtido de folículos de 1-3 mm e outro de folículos $\geq 8,1$ mm de diâmetro (grupo referência).

Para assegurar a qualidade das amostras biológicas utilizadas neste estudo, o RNA extraído das células do cumulus das duas categorias de folículos foi analisado quanto a sua integridade utilizando-se o Bioanalyzer. Os resultados demonstraram que as amostras de RNA estavam dentro dos padrões recomendados de qualidade (Schroeder et al., 2006), o que é um pré-requisito fundamental para a condução de experimentos de expressão gênica, como a análise de microarranjo de DNA. Além disso, todas as hibridações realizadas apresentaram

limites de qualidade entre 95 e 99% e as estimativas do erro padrão de todos os arranjos analisados estavam dentro dos padrões desejáveis de qualidade obtidas para cada gene em cada lâmina hibridizada.

Dos 4.178 genes diferencialmente expressos, a maioria (54%) foi menos expressa em células do cumulus bovinas de folículos $\geq 8,1$ mm de diâmetro (grupo referência) comparado aos de 1-3 mm de diâmetro. Os dados obtidos estão de acordo com outros estudos em que se avaliou a expressão diferencial de genes em células do cumulus de bovinos (van Montfoort et al., 2008; Assidi et al., 2010), nos quais também foi observado um maior número de genes menos expressos em folículos maiores. Provavelmente, por se tratar de um folículo grande e já formado, pode ser que uma menor expressão de genes seja requerida nesta fase, considerando-se que muitos transcritos já tenham sido traduzidos e estejam sendo utilizados nos eventos da maturação final do folículo ou mesmo terem sido rapidamente degradados, considerando-se que uma das características distinguíveis dos mRNAs é a sua alta taxa de degradação (Telford et al., 1990; Meyer et al., 2004).

Todos os genes diferencialmente expressos nas células do cumulus bovinas foram classificados funcionalmente de acordo com a KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). A partir da classificação, os genes menos expressos nas células do cumulus de ovócitos competentes apresentaram-se envolvidos em um maior número de funções celulares distintas (ciclo celular, metabolismo de aminoácido, sinalização celular, reparo de DNA, metabolismo de energia e meiose. Isso se deve, provavelmente, à identificação de um maior número de genes menos expressos e por isso uma maior diversidade funcional.

Dentre as principais categorias funcionais identificadas nos genes diferencialmente expressos nas células do cumulus, 20% dos genes menos expressos e 28% dos genes mais expressos em folículos $\geq 8,1$ mm estão envolvidos em processos do ciclo celular. Durante a foliculogênese, o crescimento dos folículos se dá pelo crescimento do ovócito em diâmetro, pela divisão das células somáticas e formação do fluido folicular a partir da fase antral (Monniaux et al., 1997). A identificação de uma grande quantidade de genes relacionados ao ciclo celular é esperada uma vez que se trata de folículos em estágios diferentes de crescimento. É conhecido que durante o crescimento do folículo existe a proliferação simultânea das células do cumulus ao redor do ovócito para formar o COC e, que posteriormente essas células mantêm um fenótipo proliferativo (ciclo celular e funções de crescimento celular) que parece ser um pré-requisito para a sua rápida expansão e suporte para a aquisição da competência (Assidi et al., 2010).

Durante o ciclo celular, a seqüência de DNA pode ser alterada como resultado de erros de cópia introduzidos pelas DNAs polimerases no processo de replicação. Portanto, o reparo de seqüências erradas de DNA é de suma importância para a sobrevivência das espécies (Lodish et al., 1999). Em consistência com este conhecimento, 10% dos genes menos expressos em células do cumulus bovinas de folículos maiores estão relacionados aos mecanismos de reparo de DNA. Considerando-se que as divisões celulares são mais vigorosas nos folículos em crescimento que nos folículos grandes, que crescem mais pelo o acúmulo de líquido no espaço antral que pela multiplicação das células somáticas, os resultados observados indicam que as vias de reparo do DNA encontram-se mais expressas no grupo de folículos menores.

Nos folículos $\geq 8,1$ mm de diâmetro, a segunda maior categoria de genes diferencialmente mais expressos foi aquela envolvida no processo de ovulação e inflamação (23%). Durante o crescimento e desenvolvimento folicular, o COC está sendo preparado para o processo de ovulação, o qual é marcado pela ruptura do epitélio ovariano e liberação do COC para ser captado pela tuba uterina (Hunter, 2003). A ovulação é um processo semelhante à inflamação, altamente regulado nas células do cumulus (Hernandez-Gonzalez et al., 2006; Richards, 2007; Russell & Robker, 2007), o que justificaria a expressão aumentada de genes relativos a esses processos nos folículos maiores. É importante ressaltar que essa categoria funcional foi somente identificada nos genes mais expressos em folículos grandes, o que é esperado, considerando-se que neste estágio o folículo já se aproxima do momento da ovulação.

As células do cumulus são reconhecidas por expressar muito genes que são indispensáveis à resposta semelhante à inflamação que ocorre antes da ovulação para permitir a ruptura do folículo (Hernandez-Gonzalez et al., 2006; Tatemoto et al., 2000). Além disso, em resposta ao processo de inflamação, várias células e moléculas mediadoras imunes aparecem no ovário e no fluido folicular dos animais domésticos, no momento da ovulação e durante a luteólise (Terranova, 1997; Ramadan et al., 2001; Orsi et al., 2007). As células imunes e suas citocinas secretadas têm um importante papel na regulação da função dos órgãos sexuais femininos (Brännström et al., 1995; Gérard et al., 2004). Neste estudo, foram identificados genes relacionados à resposta imune nas células do cumulus bovinas dos folículos maiores (Figura 2.8).

Outra categoria funcional em que os genes mais e menos expressos em folículos $\geq 8,1$ mm estão envolvidos é o metabolismo de energia. Durante a maturação, o COC também se prepara para uma dramática modificação de seu ambiente e do metabolismo de energia para os processos de ovulação e fecundação (Brison, 2000). Substratos de energia e aminoácidos fornecem suporte para a aquisição da competência de desenvolvimento de COCs durante a maturação (Rose-Hellekant et al., 1998). Com relação ao metabolismo de energia, 18% dos genes com maior expressão e 9% com menor expressão nas células do cumulus de folículos grandes estão envolvidos neste processo. O metabolismo de aminoácido foi outra categoria funcional identificada que representou 13% dos genes com expressão menor nas células do cumulus de folículos grandes. Estudos têm mostrado que o metabolismo de energia parece ser essencial para a aquisição da competência de desenvolvimento (Thompson et al., 2007; Su et al., 2008) e que a diferenciação das células do cumulus é marcada por uma fina regulação da síntese protéica e do metabolismo de aminoácidos (Hernandez-Gonzales et al., 2006). Estudos mostram que as células do cumulus exercem um papel importante na utilização de substratos e energia pelo ovócito (Sutton-McDowall et al., 2004), previne o ovócito contra o stress oxidativo induzido pela apoptose (Fatehi et al., 2005; Tatemoto et al., 2000) e estimula a síntese de glutathiona durante a maturação *in vitro* (de Matos et al., 1997; 2002).

Tem sido demonstrado que as células do cumulus representam uma interface de sinalização entre o ovócito e seu ambiente circundante. Este processo de sinalização celular é demonstrado por exercer um papel chave na aquisição da competência do ovócito por meio de uma cascata de sinalização funcional em ambos os compartimentos germinativo e somático do folículo (Sirard et al., 2007). Neste experimento, 12% dos genes menos expressos e 11% dos mais expressos foram classificados como relacionados à sinalização celular nas células do cumulus de folículos grandes. É possível que a expressão desses genes seja importante tanto para as comunicações entre as células do cumulus quanto para as comunicações bidirecionais entre cumulus e ovócito necessárias para a aquisição da competência. A exemplo das junções gap, que são realizadas via extensão citoplasmática das células da corona radiata que passam através da zona pelúcida e permutam com o ovócito durante todo o processo de maturação (Allworth & Albertini, 1993).

A maturação de ovócitos bovinos envolve a retomada e término da primeira divisão meiótica a partir do estágio de vesícula germinativa para o estágio de metáfase II com correspondente maturação citoplasmática (Fair et al., 2007). Os genes relacionados aos

eventos da meiose neste estudo representaram uma proporção de 9% dos genes menos expressos nos folículos grandes. O estímulo que induz a retomada da meiose é essencial para a formação de um ovócito haplóide para a fecundação, e é liberado pelas células foliculares. A identificação desses transcritos nos folículos maiores é condizente com o estágio de maturação do folículo que se prepara para a ovulação. Esses genes com menor expressão em folículos grandes podem estar envolvidos na indução da retomada da meiose e é possível que, pelos folículos grandes estarem mais próximos da ovulação, os transcritos desses genes provavelmente estejam sendo traduzidos ou degradados.

A análise de microarranjo do presente trabalho confirma a expressão diferencial em células do cumulus bovinas de vários genes descritos em trabalhos prévios, tais como o FSHR, EGFR e GHR (Caixeta et al., 2009); CTSB (Bettegowda et al., 2008), dos genes TNFAIP6, TRIB2 e ERRF11 (Assidi et al., 2010) e DPP8 (Assidi et al., 2011), o que contribui para a corroboração dos resultados do atual experimento.

Para reduzir a lista de genes obtida na análise do microarranjo, além do valor de P, foi utilizado um valor arbitrário de corte $\geq 2,5$ vezes o valor de expressão para mais e para menos. A utilização desse valor de corte arbitrário na expressão dos genes implica no risco de perda de genes relevantes nos quais as pequenas mudanças de expressão podem ter profundos efeitos. Entretanto, mesmo diante da perda de algumas informações, o presente estudo ainda foi capaz de identificar mais de duas centenas de genes que foram diferencialmente expressos em células do cumulus com possível envolvimento com a competência ovocitária e os genes diferencialmente expressos com menos que *2,5 fold* não devem ser descartados nem subestimados. Como o microarranjo permite identificar centenas a milhares de genes simultaneamente (Rodriguez-Zas et al., 2008; Evans et al., 2008), a aplicação de um valor de corte torna-se um critério que facilita a seleção e agrupamento de genes para um maior aprofundamento dos estudos funcionais.

Com o objetivo de se identificar as principais vias metabólicas representadas pelos genes diferencialmente expressos caracterizados em nosso estudo, dez importantes vias metabólicas funcionais foram classificadas de acordo com os softwares IPA/DAVID (*Ingenuity Pathways Analysis/Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) e três delas foram selecionadas para discussão. De um modo geral, as vias metabólicas discutidas representam a interação dos genes diferencialmente expressos nas células do cumulus de acordo com a classificação funcional realizada neste estudo. É possível

observar que as vias metabólicas representam a funções vitais presentes nas células do cumulus durante o desenvolvimento folicular e podem estar envolvidas com a competência ovocitária.

Vários genes diferencialmente expressos em células do cumulus de folículos competentes comparados aos incompetentes estão relacionados ao ciclo celular, crescimento e proliferação celular, o que pode ser evidenciado nas vias metabólicas VM1 e VM2 (Figura 2.6 e 2.7). Alguns dos genes representados, principalmente na via VM1, estão relacionados com as funções de desenvolvimento do sistema reprodutivo (PTHLH, CEBPB, TIMP1, CEBPD, CDKN1A), resposta à inflamação em células do cumulus (ANKRD1, CEBPD, TNFAIP6, FABP4, DPP4, RGS2, CEBPB, F3, CDKN1A), como também os envolvidos com a sinalização celular (LGALS3, PTHLH, TIMP1, KIT, COL18A1, SERPINE1, TNFRSF6B, DPP4, F3, CDKN1A, TNFAIP6). De acordo com a análise funcional IPA, muitos genes das vias VM1 e 2 estão relacionados com desordens da morfogênese (CEBPB, CEBPD, CDKN1A, KLF4, PTHLH, TNFAIP6, FOSL2, LGALS3, IKZF3, COL18A1, GHR, F3), organogênese (TIMP1, PTHLH, CEBPB, CEBPD, CDKN1A, COL18A1, FBN1, GHR) e o desenvolvimento de doenças, incluindo as do sistema reprodutivo (TIMP1, CEBPB, CEBPD, CYP11A1, CDKN1A, KLF4, DCL1, GHR, F3, COL18A1, CAPN6, FBN1). Essas vias metabólicas representam um rico material para aprofundar o conhecimento das inter-relações gênicas que acontecem nas células do cumulus e suas repercussões na aquisição da competência do ovócito.

Outra via que está relacionada ao processo de desenvolvimento do folículo em preparação para a ovulação é a via de sinalização do interferon. Recentemente, foi demonstrado que o interferon alfa, está envolvido na diferenciação de folículos pré-ovulatórios em ratos (Lee et al., 2009). Na via de sinalização do interferon apresentada (Figura 2.8), a ação dos interferons alfa e beta induziu a expressão de genes nas células do cumulus bovinas. Os interferons alfa e beta são conhecidos por ter funções regulatória antivirais, antitumorais e imunes. Nos processos de inflamação, ambos os tipos de interferons possuem funções pro e anti-inflamatórias (Axtell et al., 2011). Nesta via de sinalização, todos os genes com maior expressão (IRF9, OAS1, IFITM1, MX1) estão relacionados com a resposta imune e anti-inflamatória, mediante ativação do interferon (Wolf et al., 2003; Bauersachs et al., 2008; Asirvatham et al., 2009). A expressão desses genes em resposta ao interferon é esperada, devido ao processo de inflamação que ocorre durante a fase final de desenvolvimento dos folículos para a ovulação.

As vias apresentadas demonstram a interação de vários genes diferencialmente expressos nas células do cumulus de folículos grandes, os quais evidenciam a ocorrência dos eventos de ciclo celular para a proliferação das células foliculares, crescimento do folículo e resposta imune nos folículos que se aproximam do momento da ovulação.

De acordo com o presente estudo, a análise da expressão global de genes utilizando-se microarranjo permitiu o estabelecimento de uma lista de genes diferencialmente expressos em células do cumulus bovina de folículos com diferentes níveis de competência. Pore meio dessa análise, muitos genes poderão ser apontados como biomarcadores da qualidade do ovócito o que constitui uma ferramenta para os estudos da ovogênese, foliculogênese e dos eventos críticos que conferem a competência do ovócito para o desenvolvimento. Entretanto, cabe ressaltar que apesar dos vários genes identificados e da categorização funcional realizado no presente trabalho, mais estudos são necessários para a compreensão global do papel de cada gene em particular dentro da complexa via de interação entre células do cumulus e ovócito para a aquisição da competência. Para isto, torna-se necessário a validação dos genes para a confirmação ou não quanto ao seu potencial de biomarcadores da qualidade do ovócito.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo fornece evidência de que a qualidade do ovócito é reflexo da expressão diferencial de genes nas células do cumulus. Os genes diferencialmente expressos identificados em células do cumulus bovinas de folículos competentes e incompetentes pela análise de microarranjo estão relacionados com diversas funções (ciclo celular, metabolismo de aminoácido, sinalização celular, reparo de DNA, metabolismo de energia e meiose) e vias metabólicas importantes e, podem representar potenciais marcadores da qualidade do ovócito. Os genes aqui identificados constituem-se como candidatos para estudos futuros relativos à qualidade e competência do ovócito para o melhor entendimento dos eventos moleculares que conferem a competência para o desenvolvimento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLWORTH, A.E.; ALBERTINI, D.F. Meiotic maturation in cultured 713 bovine oocytes is 714 accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. **Developmental Biology**, 158 101-715 112, 1993.
- ARMSTRONG, D.T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, Review. Apr 1;55(6):1303-22, 2001.
- ASSIDI, M.; DUFORT, I.; ALI, A.; HAMEL, M.; ALGRIANY, O.; DIELEMANN, S.; SIRARD, M. A. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. **Biology of Reproduction**, 79, 209–222, 2008.
- ASSIDI, M.; DIELEMAN, S.J.; SIRARD, M.A. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, Dec; 140(6):835-52, Aug 19, 2010.
- ASIRVATHAM, A.J.; ANANTHI, J.; MAGNER, W.J.; TOMASI, T.B. miRNA regulation of cytokine genes. **Cytokine**, Volume 45, Issue 2, February, Pages 58-69, 2009.
- ATEF, A.; FRANÇOIS, P.; CHRISTIAN, V.; MARC-ANDRÉ, S. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development**, Jul; 71(3):358-67, 2005.
- BAUERSACHS, S., MITKO, K.; ULBRICH S. E.; BLUM, H.; WOLF, E. Transcriptome Studies of Bovine Endometrium Reveal Molecular Profiles Characteristic for Specific Stages of Estrous Cycle and Early Pregnancy. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 116(7): 371-384, 2008.
- BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; LEE, K. B. et al. G. W. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. **Biology of Reproduction**, 79, 301–309, 2008.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. May;41(1):54-62, 1995.

BRANNSTROM, M., BONELLO, N., NORMAN, R.J.; ROBERTSON, S.R. Reduction of ovulation rate in the rat by administration of a neutrophil-depleting monoclonal antibody. **Journal of Reproductive Immunology**, 29, 265-270, 1995.

BRETTSCHEIDER, J.; COLLIN, F.; BOLSTAD, B. M.; SPEED, T.P. Quality assessment for short oligonucleotide microarray data. **Technometrics**. August 1, 50(3): 241-264, 2008.

BRISON, D.R. Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: regulation by survival factors. **Human Fertility** (Cambridge), 3(1):36-47, 2000.

BUCCIONE, R.; VANDERHYDEN, B.C.; CARON, P.J.; EPPIG, J.J. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. **Developmental Biology**, 138:16-25, 1990.

CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M.M.; JUNIOR, J.B.; DODE, M.A.N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction Fertility and Development**, 21:655-664, 2009.

CILLO, F.; BREVINI, T. A. L.; ANTONINI, S. et al. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. **Reproduction**, 134, 645-650, 2007.

COTICCHIO, G.; SERENI, E.; SERRAO, L.; MAZZONE, S. IADAROLA, I.; BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality? **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1034, 132-144, 2004.

CUI, X.; CHURCHILL, G. A. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. **Genome Biology**, 4, 2003.

DE LOOS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIP, T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, Mar; 28(3):255-9, 1991.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, 57: 1420-1425, 1997.

DE MATOS, D.G., GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, Mar 15;57(5):1443-51, 2002.

DE WIT, A. A. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, T. A. M. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal of Animal Science**, 78, 1277-1283, 2000.

EVANS, A., FORDE, N.; O'GORMAN, G.M.; ZIELAK, A.; LONERGAN, P.; AND FAIR, T. Use of Microarray Technology to Profile Gene Expression Patterns Important for Reproduction in Cattle. **Reproduction in Domestic Animal**, 43 (Suppl. 2), 359-367, 2008.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F. L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **Proceedings National Academy of Science, USA**;99:2890–4, 2002.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal. Reproduction. Science**, 78, 203–216, 2003.

FAIR T, CARTER F, PARK S, EVANS ACO, LONERGAN P. Global gene expression analysis during bovine oocyte invitro maturation. **Theriogenology**, 68(Suppl. 1), S91–S97, 2007.

FATEHI, A.N.; ZEINSTRA, E.C.; KOOIJ, R.V. et al. Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. **Theriogenology**. Mar 1;57(4):1347-55, 2002.

FEUERSTEIN, P.; CADORET, V.; DALBIES-TRAN, R. et al. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. **Human. Reproduction**, 22, 3069–3077, 2007.

FUKUI, Y. Effect of follicle cells on acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 26, 40–46, 1990.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T. A. L.; CILLO, F.; ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. **Revue Scientifique et Technique**, 24,413–423, 2005.

GÉRARD, N.; CAILLAUD, M.; MARTORIATI, A.; GOUDET, G.; LALMANACH, A.C. The interleukin-1 system and female reproduction. **Journal of Endocrinology**, Review, Feb;180(2):203-12., 2004.

GILCHRIST, R.B., RITTER, L.J.; ARMSTRONG D.T. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, 82–83:431–46, 2004.

HASHIMOTO, S.; SAEKI, K.; NAGAO, Y. et al. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, Jun;49(8):1451-63, 1998.

HERLANDS. R.L.; SCHULTZ, R.M. Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. **Journal of Experimental Zoology**, 229:317–325, 1984.

HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; SHIMADA, M. et al. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? **Molecular Endocrinology**, Jun; 20(6):1300-21, 2006.

HUANG, A.M.; RUDELIUS, M.; SHARAN, S. et al. The Cebpd (C/EBPd) Gene Is Induced by Luteinizing Hormones in Ovarian Theca and Interstitial Cells But Is Not Essential for Mouse Ovary Function. **Plos One**; 2(12): e1334, 2007.

HUNTER, R.H.F. **Physiology of the graafian follicle and ovulation**, ed Cambridge University Press. Cambridge University; 2003.

KASTROP, P.M.; HULSHOF, S.C.; BEVERS, M.M.; DESTRÉE, O.H.; KRUIP, T.A. The effects of alpha-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, Mar; 28(3):249-54, 1991.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, 82, 14–23, 2004.

LEE, D. L.; KIM, S.H.; KIM, E.; CHUN, S.Y.; KIM, T.S. Interferon-alpha is involved in the luteinizing hormone-induced differentiation of rat preovulatory granulosa cells. **J Interferon Cytokine Research**, 29 801-808, 2009.

LODISH, H.; BERK, A. ZIPURSKY, S. L. et al. **Molecular Cell Biology, 4th edition**. New York: W. H. Freeman; ISBN-10: 0-7167-3136, 2000.

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., BOLAND, M. POocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, 38, 259–267, 2003.

MAKABE, S.; NAGURO, T.; STALLONE, T. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. **Microscopy Research and Technique**, Review, Jun;69(6):436-49, 2006.

MEYER, S.; TEMME, C.; WAHLE, E. Messenger RNA Turnover in Eukaryotes: Pathways and Enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 39:197–216, 2004.

MONNIAUX, D.; HUET, C.; BESNARD, N.; CLÉMENT, F.; BOSCH, M.; PISSELET, C.; MONGET, P.; MARIANA, J. C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 3-23, 1997.

MOOR, R.M.; MATTIOLI, M.; DING, J.; NAGAI, T. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, 40,197–210, 1990.

MOTLÍK, J.; FULKA, J. JR.; PROCHÁZKA, R.; RIMKEVICOVÁ, Z. et al. RNA and protein synthesis requirements for the resumption of meiosis in rabbit oocytes: the role of cumulus cells. **Reproduction Nutrition Development**, 29(5):601-9, 1989.

ORSI, N.M.; EKBOTE, U.V., WALKER, J.J.; GOPICHANDRAN, N. Uterine and serum cytokine arrays in the mouse during estrus. **Animal Reproduction Science**, 100 301–310, 2007.

- PAYTON, R.R. **Direct Effects of Heat Stress During Meiotic Maturation on Bovine Oocyte and Cumulus RNA.** PhD diss., University of Tennessee. http://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/628, 2009.
- RAMADAN, A.A.; SELIM, S.A.; HASSAN, H.M.; WAHBA, M.A. Immune regulation of ovarian function in buffaloes (*Bubalus bubalus*). **Theriogenology**, Jan 15;55(2):661-9, 2001.
- RICHARDS, J.S. Genetics of ovulation. **Seminars in Reproductive Medicine**, 25 235-242, 2007.
- ROBERT, C. A.; CHANDER, R.; STEINMAN, L. Interferon- γ exacerbates Th17-mediated inflammatory disease. **Trends in Immunology** June, Vol. 32, No. 6, 2011.
- RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; SCHELLANDER, K.; LEWIN, H. A. Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. **Society for Reproduction and Fertility**, ISSN 1470–1626, 2008.
- ROSE-HELLEKANT, T.A.; LIBERSKY-WILLIAMSON, E.A.; BAVISTER, B.D. Energy substrates and amino acids provided during in vitro maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. **Zygote**. Nov;6 (4):285-94, 1998.
- RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L. Molecular mechanisms of ovulation: Coordination through the cumulus complex. **Human Reproduction Update**. 13:289–312, 2007.
- SALHAB, M.; PAPILLIER, P.; PERREAU, P.; GUYADER-JOLY, C.; DUPONT, J.; MERMILLOD, P.; UZBEKOVA, S. Thymosins beta-4 and beta-10 are expressed in bovine ovarian follicles and upregulated in cumulus cells during meiotic maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, 2010.
- SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S. et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, Jan 31;7:3, 2006.
- SIOBHAN, W. W.; MEHTA, J. P. et al. University College Dublin, Differences in Gene Expression in Preovulatory Follicles after the LH Surge in Dairy Heifers Versus Lactating Cows. Dublin, Ireland; University of Glasgow, Glasgow, UK. **SSR 2011 Annual Meeting Abstracts** 601-788 www.ssr.org/Documents/2011-07-25Abstracts601-788.pdf. July, Allen Press, Inc. Page 141, 2011.
- SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, 40:1257–63, 1989.
- SIRARD, M. A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, 65, 126–136, 2006.
- SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, 2007.

STERNECK, E.; JOHNSON, P.F. Expression and Function of CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs) in the Ovary. In: Adashi e, ed. **Ovulation: Evolving Scientific and Clinical Concepts**: Springer-Verlag new York Inc. pp 277–291, 2000.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, 64, 904–909, 2001.

SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K. et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse 1089 cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in 1090 cumulus cells. **Development**, 135, 111-121, 2008.

SUTTON-MCDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus–oocyte complexes during *in vitro* maturation: the influence of glucosamine and folliclestimulating hormone. **Reproduction**, 128 313–319, 2004.

TANGHE, S., VAN SOOM, A., NAUWYNCK, H., CORYN, M., AND DE KRUIF, A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, 61, 414–424, 2002.

TATEMOTO, H.; TERADA, T. Time-dependent effects of cycloheximide and alpha-amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, Apr 15;43(6):1107-13, 1995.

TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction** , 63, 805–810, 2000.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, 2690-100, 1990.

TERRANOVA, P.F.; RICE, V.M. Review: cytokine involvement in ovarian processes. **American Journal of Reproductive Immunology**, Review Jan;37(1):50-63, 1997.

THOMPSON, J.G.; LANE, M.; GILCHRIST, R.B. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. **Society for Reproduction and Fertility. Supplement**, 64 179-190, 2007.

VANDERHYDEN, B.C.; ARMSTRONG, D.T. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes. **Biology of Reproduction**, 40:720–728, 1989.

VAN MONTFOORT, A.P.; GERAEDTS, J.P.; DUMOULIN, J.C. et al. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. **Molecular Human Reproduction**, Mar; 14(3):157-68. Epub Jan 18, 2008.

VOZZI, C.; FORMENTON, A.; CHANSON, A. et al. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. **Reproduction**, Oct; 122(4):619-28, 2001.

WEBB, R.J.; MARSHALL, F.; SWANN, K.; CARROLL, J. Follicular-stimulating hormone induces gap junction-dependent dynamic changes in [cAMP] and protein kinase A in mammalian oocytes. **Developmental Biology**, 246: 441–454, 2002.

WOLF, E.; ARNOLD, G.J.; BAUERSACHS, S. et al. Embryo-Maternal Communication in Bovine – Strategies for Deciphering a Complex Cross-Talk. **Reproduction in Domestic Animals**, 38, 276–289, 2003.

WOLFINGER, R.D.; GIBSON, G.; WOLFINGER, E.D. et al. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. **Journal of Computational Biology**, 8(6):625-37, 2001.

**CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DE GENES EM CÉLULAS DO CUMULUS BOVINAS:
POTENCIAIS MARCADORES DA COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA**

1 RESUMO

É conhecido que somente ovócitos competentes podem sofrer maturação completa e ter desenvolvimento embrionário normal. Portanto, o sucesso das tecnologias de reprodução assistida (TRAs) depende da disponibilidade de ovócitos competentes para serem utilizados para a produção de embriões. Vários critérios têm sido utilizados para selecionar ovócitos com habilidade para o desenvolvimento, entretanto a maioria deles inviabilizam a utilização posterior dessas células. Portanto, as células do cumulus representam um alvo potencial não invasivo para a identificação de marcadores moleculares da qualidade do ovócito. Com o objetivo de identificar genes associados com a competência ovocitária foi avaliada a expressão de seis genes (FGF11, IGFBP4, SPRY1, ARHGAP22, COL18A1 e GPC4) identificados pela análise de microarranjo como diferencialmente expressos em células do cumulus bovinas obtidas de ovócitos com diferentes competências. Para a quantificação desses genes, por qPCR, o RNA total foi extraído de quatro *pools* de células do cumulus correspondentes a 20 ovócitos de folículos de três categorias 1-3, 6-8 e $\geq 8,1$ mm de diâmetro. Os resultados do qPCR foram submetidos à análise estatística e dos seis genes quantificados nas células do cumulus, três deles (COL18A1, GPC4 e IGFBP4) (50,0%), apresentaram expressão diferente ($P < 0,05$) entre os grupos. Entretanto, somente o GPC4 apresentou expressão diferencial entre as CCs de folículos mais competentes, 6-8 e $\geq 8,1$ mm, comparadas as de folículos menos competentes, de 1-3 mm. O GPC4 é o que melhor refletiu a qualidade do ovócito e seu grau de competência, podendo ser utilizado como marcador de qualidade do ovócito em bovinos.

Palavras Chave: expressão gênica, células do cumulus, ovócito, bovino

2 ABSTRACT

It is well known that only competent oocytes can undergo complete maturation and normal embryonic development. Therefore, the success of assisted reproductive technologies (ART) depends on the availability of competent oocytes to be used for embryo production. Several criteria have been used to select oocytes with development ability, however the majority of those are detrimental for the oocyte. Therefore, cumulus cells are a noninvasive potential target for identification of molecular markers for oocyte quality. In order to identify genes associated with oocyte competence, the expression of six genes (FGF11, IGFBP4, SPRY1, ARHGAP22, COL18A1 and GPC4), identified by microarray analysis as differentially expressed in cumulus cells obtained from bovine oocytes with different competences were evaluated. For the quantification of gene expression by qPCR, total RNA was extracted from four pools of cumulus cells corresponding to 20 oocytes of three follicles categories 1-3, 6-8 and ≥ 8.1 mm in diameter. The qPCR results were submitted to statistical analysis and among the six candidate genes quantified in cumulus cells, three of them (COL18A1, GPC4 and IGFBP4) (50.0%) had differential expression ($P < 0.05$) among groups. However, only GPC4 showed differential expression between competent follicles, 6-8 and ≥ 8.1 mm, compared with those less competent, 1-3 mm. The expression pattern of GPC4 reflected better the oocyte competence. Therefore, it can be used as a marker for bovine oocyte quality.

Key words: gene expression, cumulus cells, oocytes, bovine

3 INTRODUÇÃO

Somente ovócitos competentes podem sofrer maturação completa e ter desenvolvimento embrionário normal (Dode, 2006). Portanto, o sucesso das tecnologias da reprodução assistida (TRAs) depende da disponibilidade de ovócitos competentes para serem utilizados na produção de embriões. Entretanto, não é possível diferenciar morfológicamente um ovócito competente de um incompetente, o que torna necessário o estabelecimento de critérios que possam prever a qualidade do ovócito. Desta forma, a caracterização molecular se torna uma ferramenta importante para a identificação de marcadores para estimar a competência ovocitária.

Embora vários estudos tenham sido conduzidos com esse objetivo, ainda não foi identificado um marcador que possa ser utilizado rotineiramente nas práticas de reprodução assistida, sem que inviabilize a utilização posterior do ovócito. Considerando que as células do cumulus têm um papel fundamental no crescimento e maturação do ovócito elas podem refletir o status de desenvolvimento ovocitário. Desse modo, a identificação de transcritos expressos nessas células poderia aumentar o entendimento das moléculas e processos biológicos que estão envolvidos no diálogo ovócito-células do cumulus para a aquisição da competência ovocitária. Além disso, as células do cumulus representam uma alternativa para a identificação de marcadores da competência do ovócito de modo não-invasivo.

Na tentativa de identificar genes associados com a competência do ovócito foi avaliada a expressão de seis genes - FGF11, IGFBP4, SPRY1, ARHGAP22, COL18A1 e GPC4 - identificados nas células do cumulus bovinas. A seleção desses genes foi baseada em resultados prévios da análise de transcrito de células do cumulus obtidas de ovócitos com diferentes graus de competência e nas suas possíveis funções relacionadas à competência ovocitária.

A expressão de FGF11 foi identificada em células-tronco de trofoblasto de camundongo, em linhagem de células e placenta humanas, ovócito e embriões de camundongos em estudo realizado por Zhong e colaboradores (2006). Os FGFs alteram a função ovariana, pelo menos em parte pela inibição da secreção dos hormônios esteróides e afetam a sobrevivência das células da granulosa (Jiang et al., 2010), entretanto, os mecanismos de ação do FGF nas células do folículo ovariano ainda não estão bem caracterizados. O IGFBP4 é a principal IGFBP inibitória no ovário (Conover et al., 1999), a qual inibe a síntese de esteróides em células da granulosa e teca (Cataldo & Giudice, 1992; Mason et al., 1998; Kwon et al., 2010). É conhecido que sistema IGF exerce um importante papel na regulação do desenvolvimento folicular ovariano e esteroidogênese (Kwintkiewicz & Giudice, 2009). SPRY1 é um gene induzido pela sinalização de FGF e serve como um regulador *de feedback* negativo (Faedo et al., 2010). Os membros da família SPRY em mamíferos são expressos em padrões altamente restritos no desenvolvimento inicial de embriões e sua expressão mostra uma próxima correlação com os sítios de sinalização do FGF (Hanafusa et al., 2002). As funções do ARHGAP22 estão relacionadas com a angiogênese, regulação da transcrição, diferenciação celular, ativação de GTPase e desenvolvimento do organismo (*Gene Ontology Annotation, (GOA) Database*). O gene COL18A1 que codifica o colágeno XVIII está envolvido na proliferação celular, polaridade e diferenciação em vários processos de desenvolvimento (Quelard et al., 2008). O colágeno XVIII é conhecido pelo seu grande potencial para inibir a angiogênese tumoral e sua expressão já foi descrita nas células do cumulus de camundongos (Tamba et al., 2010). As glicanas foram relacionadas à regulação de eventos de sinalização celular durante a morfogênese e fisiologia de organismos adultos (Fico et al., 2011). O gene GPC4 foi diferencialmente expresso nas células do cumulus em humanos e mostrou-se envolvido na comunicação celular dessas células (van Montfoort et al. 2008). A função de GPC4, como de outros genes desta família, parece estar associada na regulação da divisão celular (Waterson et al., 2010).

Todos esses genes foram identificados como sendo diferencialmente expressos em células do cumulus e representam candidatos para serem validados por outras técnicas de avaliação molecular. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a abundância de transcritos dos genes selecionados na tentativa de identificar marcadores da competência ovocitária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Este experimento visou à identificação de marcadores para a competência ovocitária nas células do cumulus de ovócitos bovinos. Para isso foram utilizadas células do cumulus de COC provenientes de folículos de 1-3 mm, 6-8mm e $\geq 8,1$ mm de diâmetro. Esses tamanhos foram selecionados considerando que em estudos prévios foi demonstrado que os ovócitos obtidos desses folículos podem ser considerados como incompetentes e competentes, respectivamente. Os genes avaliados foram selecionados a partir de uma lista de genes gerada pela análise de microarranjo e seis genes diferencialmente expressos, candidatos a marcadores para a competência ovocitária foram quantificados. A seleção dos genes candidatos foi baseada na significância (*fold change*) e na sua função biológica. Para a quantificação dos genes candidatos selecionados foram utilizados 4 *pools* de células do cumulus de 20 COC's para cada categoria de folículos acima referidos, sendo a sua expressão quantificada por PCR em tempo real.

4.2 Recuperação e seleção dos complexos cumulus-ovócitos

Os ovários de vacas mestiças foram coletados em abatedouro local e transportados até o laboratório em solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de antibióticos (penicilina G – 100 UI/ml e estreptomicina – 100ug/ml – Sigma, Sto Louis MO, USA), à temperatura de 35 a 37°C.

Os folículos foram dissecados do córtex ovariano em temperatura ambiente, com auxílio de tesoura, bisturi e pinças e foram mantidos em meio de lavagem (TCM-199 com sais de Hank's suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino ([SFB] – Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) sobre placa aquecedora durante todo o processo de dissecação. Posteriormente os folículos foram mensurados utilizando-se uma ocular graduada (*micrometer eyepiece* OSM-4® Olympus, Tokyo, Japan), classificados morfológicamente e selecionados de acordo com o diâmetro em folículos de 1-3 mm, 6-8 mm e ≥ 8 mm. Além do tamanho, os critérios utilizados para a seleção dos folículos foram a presença de uma vascularização extensiva e fina e um aspecto translúcido e brilhante de forma homogênea. Esses tamanhos de folículos foram selecionados por conterem ovócitos competentes e incompetentes para maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário, conforme descrito por Caixeta e colaboradores (2009). Após a ruptura do folículo foram observadas e também utilizadas para a seleção a presença de células do cumulus com um aspecto regular e saudável (Blondin & Sirard, 1995) e ausência de partículas flutuantes no fluido folicular (de Wit et al., 2000). Cada COC liberado pela ruptura dos folículos, foi classificado de acordo com o aspecto e distribuição das células do cumulus e uniformidade do citoplasma. Somente as células do cumulus de ovócitos classificados como Grau 1 (COC's com citoplasma homogêneo e granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus) e Grau 2 (ovócito com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares e cumulus compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos cinco camadas completas) foram utilizados neste experimento.

4.3 Armazenamento das células do cumulus

Para a remoção das células do cumulus, os ovócitos classificados como Grau 1 e 2 foram transferidos para uma gota de 50 μ l de solução salina em tampão fosfato (PBS) onde foram desnudados por meio de sucessivas pipetagens até a completa remoção das mesmas. Após a remoção dos ovócitos desnudados, a gota de 50 μ l de PBS com as células do cumulus foi transferida para um tubo de 0,2 ml e centrifugada duas vezes por 2 minutos a 700

x g para lavagem com PBS. O sobrenadante foi retirado, sendo adicionado 2 µl de RNA later® Soln (Ambion, **Applied Biosystems, USA**) ao pellet formado.

Ao final do procedimento, todos os tubos de células do cumulus foram armazenados a -20°C até o momento da extração de RNA. Para cada categoria de folículo foram estocados 4 *pools*, sendo cada um, correspondente às células do cumulus de 20 ovócitos.

4.4 Validação dos genes através de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

4.4.1 Extração de RNA total e transcrição reversa

O RNA total para realização do qPCR foi extraído de *pools* de células do cumulus correspondentes a 20 complexo-cumulus ovócitos (COC) utilizando-se o kit RNeasy®Plus Micro Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante e eluído em 14 µl de água livre de RNase. Após a extração, o RNA total foi quantificado por espectrofotômetro NanoDrop® ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), visto que o número de células do cumulus pode ser variável entre os *pools*. Todas as amostras de RNA foram diluídas para a concentração final de 37,7 ng/µl de RNA, em função da quantidade de amostras disponíveis.

O RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) contendo 200 U de *SuperScript III* (Invitrogen), 0,5 µg de *primer Oligo-dT* (Invitrogen), 2,0 mM total de dNTPs (Invitrogen), 0,1M de DTT (Invitrogen), 40 U de RNaseOUT® *Recombinat Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen) em tampão de reação 1X, com um volume final de 22 µl de reação. As reações foram realizadas nos seguintes passos: 1º Passo: 65°C por 5 minutos; 2º Passo: 50°C por 2 minutos, seguido da adição de *SuperScript III* (Invitrogen); 3º Passo: 50°C por 58 minutos e 4º Passo: 70°C por 15 minutos.

4.4.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para a análise da expressão gênica foi utilizado qPCR usando o protocolo de amplificação do kit *Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, USA)*. As reações foram realizadas com um volume final de 10 µl e as condições para a amplificação dos genes foram: desnaturação inicial a 95°C por 20 segundos, 50 ciclos (desnaturação a 95°C por 3 segundos; anelamento a 60°C por 30 segundos), seguido de curva de dissociação padrão. A seqüência dos *primers*, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento para cada gene estão apresentados na Tabela 3.1. As concentrações dos *primers* utilizados foram: 0,2 µM de ARHGAP 22; 0,3 µM de COL18A1; 0,2 µM de FGF11; 0,3 µM de GPC4; 0,3µM de IGF1; 0,3µM de SPRY1 e 0,15 µM de GAPDH. Os dados da fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciarem máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi analisada em triplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente.

O gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como controle endógeno e os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão desse gene constitutivo. A expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método do $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência (Pfaffl, 2001) (Figura 3.1). A eficiência de amplificação para cada iniciador foi calculada baseada na amplificação de uma curva padrão utilizando-se o *7500 Software, Version 2.0.3 (Applied Biosystems, USA)*.

Tabela 3.1. Sequência de *primers* específicos dos genes selecionados para validação, tamanho do fragmento em pb (pares de base), temperatura de anelamento e concentração

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Concentração (μ M)
GAPDH	F 5'-GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA-3' R 5'-CCCTCCACGATGCCAAAGT-3'	119	60	0,15
<i>Mais expressos</i>				
FGF11	F 5'- TTCACCCACTTCAACCTGATCCCT-3' R 5'- AGACGCACTCCTTAAAGCGCACT-3'	148	60	0,2
IGFBP4	F 5'- TGTGTGCGTGTGTGTTAATGAGCC-3' R 5'- TTGGAAACATACCAGGGCTCTCCT-3'	108	60	0,3
SPRY1	F 5'- CATGTGCTTGGTCAAGGGCATCTT-3' R 5'- TGTGACTGTGAACAGGAGCAAGGA-3'	93	60	0,3
<i>Menos expressos</i>				
ARHGAP22	F 5'- AGCAGAGAAGCATCATGAAGGGCT-3' R 5'- ACCTGGGTCCCTTGCAGAGAAATA-3'	127	60	0,2
COL18A1	F 5'- ACAGCAACGCATTTGTGGACTCTG-3' R 5'- ACGTCTCCTTTGTCACCCTTGAGT-3'	94	60	0,3
GPC4	F 5'- TGGTGAATCCCACAACCCAGTGTA-3' R 5'- TCTCAGCCACCATCAGCATAGCAT-3'	192	60	0,3

F= *primer forward*; R= *primer reverse*

$$\text{Razão} = \frac{\Delta CP_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}{(E_{\text{alvo}})} \div \frac{\Delta CP_{\text{ref}} (\text{controle} - \text{amostra})}{(E_{\text{ref}})}$$

Figura 3.1 - Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E_{alvo} é a eficiência do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do gene referência; CP é o ciclo *threshold*; ΔCP_{alvo} é desvio de CP do controle - amostra do gene alvo; ΔCP_{ref} é desvio de CP do controle - amostra do gene referência.

4.5 Análise estatística

Os dados de quantificação do padrão de expressão gênica foram comparados entre os tratamentos experimentais utilizando-se análise de variância e teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney se apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Todas as análises foram avaliadas utilizando-se o programa *Prophet Statistics*, versão 5.0 (BBN Systems & Technologies, Cambridge, MA, 1996).

5 RESULTADOS

Para o estudo da expressão de genes relacionados com a competência ovocitária em bovinos seis genes candidatos foram quantificados em células do cumulus obtidos de COCs recuperados de diferentes tamanhos de folículos.

De acordo com a análise de qPCR, a expressão dos três genes candidatos selecionados, pelo microarranjo, por serem menos expresso em células do cumulus de folículos grandes variou de acordo com os grupos de folículo ($P < 0,05$) (Figura 3.2). A abundância relativa de transcritos do gene ARHGAP22 foi maior nas células de folículos de 1-3 mm, comparados as dos folículos de 6-8 mm. A expressão desse gene nos folículos $\geq 8,1$ mm apresentou um nível de expressão intermediária, mas não diferiu dos folículos de 1-3 e 6-8 mm. A expressão do gene COL18A1 foi maior em células do cumulus obtidas de folículos de 1-3 mm comparados com as de folículos $\geq 8,1$ mm. Entretanto, o nível de mRNA para esse gene em células do cumulus de folículos de 6-8 mm não diferiu dos outros tamanhos de folículos. Não foi observada alteração nos níveis de transcritos para o gene GPC4 quando células de folículos grandes (6-8 e $\geq 8,1$ mm) foram comparadas. Já as células de folículos pequenos (1-3 mm) apresentaram maior expressão desse gene do que as células de folículos maiores.

Dos três genes candidatos a serem mais expressos em células do cumulus de folículos grandes, somente o gene IGFBP4 apresentou variação ($P > 0,05$) na expressão entre os tamanhos de folículo avaliados (Figura 3.3). A abundância relativa de transcritos de IGFBP4 foi menor em células de folículos de 1-3 mm comparados com as de folículos $\geq 8,1$ mm. Entretanto, a expressão desse gene nos folículos de 6-8 mm não diferiu dos outros tamanhos de folículos. Os níveis de transcritos ($P > 0,05$) para os genes FGF11 e SRPY1 foram similares ($P > 0,05$) entre as células do cumulus obtidas de folículos de diferentes tamanhos.

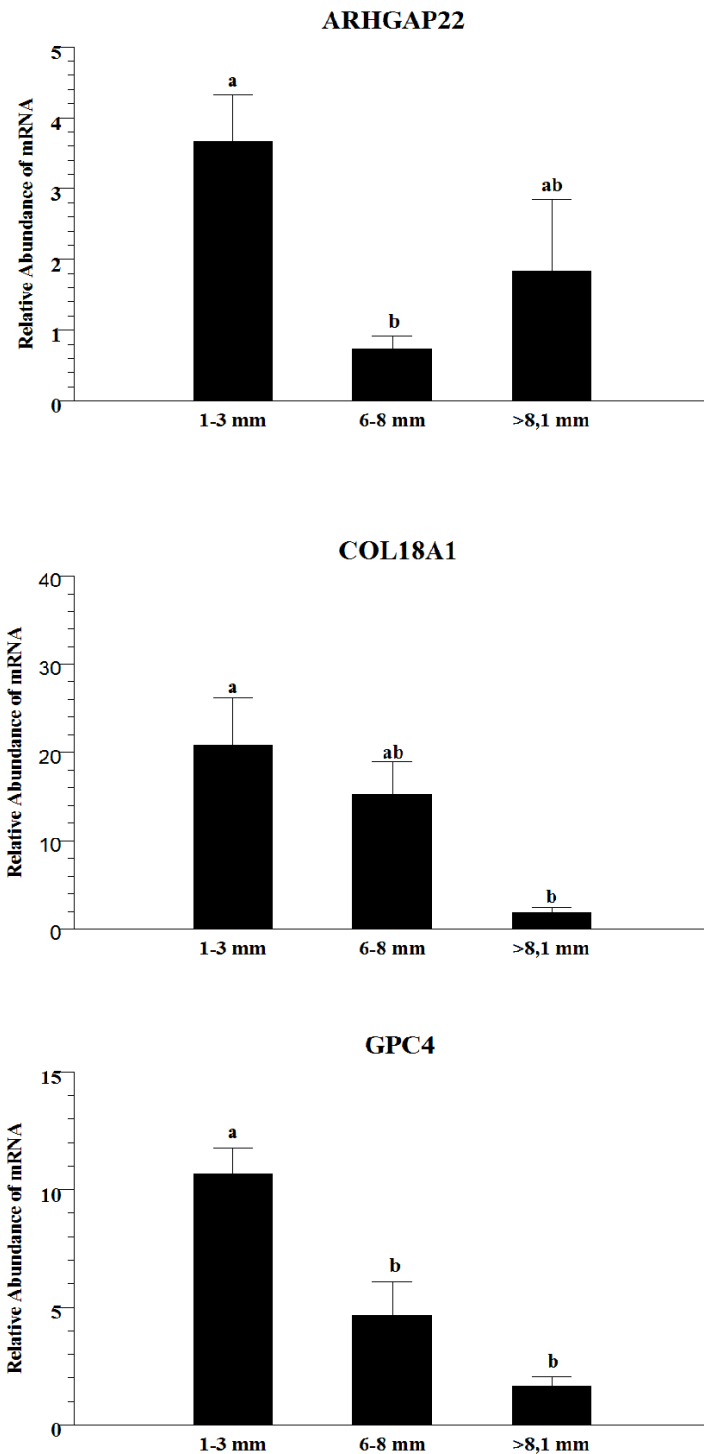


Figura 3.2 - Nível de transcritos dos ARHGAP22, COL18A1 e GPC4 analisados por PCR em tempo real em células do cumulus bovinas de complexos-cumulus ovócitos oriundos de diferentes tamanhos de folículos (1-3; 6-8 e \geq 8,1 mm). Cada grupo foi analisado utilizando-se 4 *pools* de amostras e avaliados em três réplicas. Os dados (média \pm EPM) foram normalizados pelo gene GAPDH e expressos em relação à amostra controle, por meio do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência.

^{a-b} Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

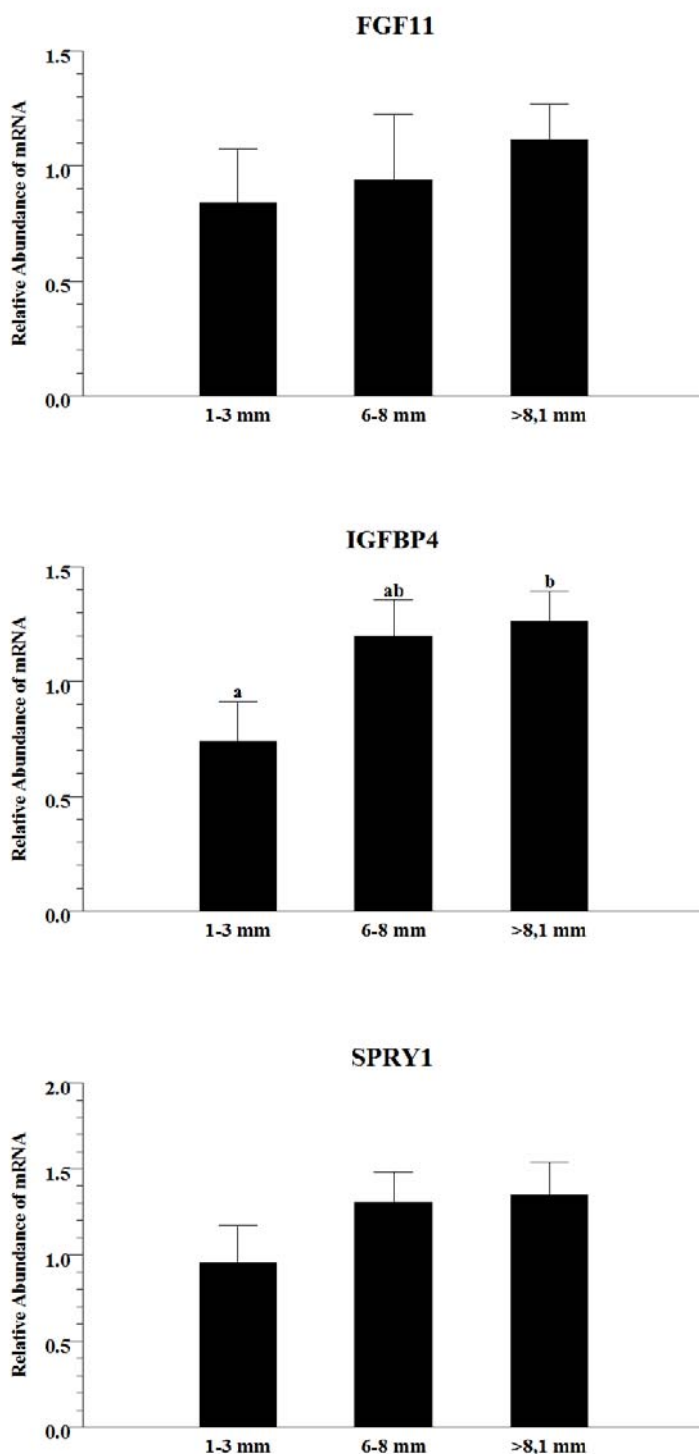


Figura 3.3 - Nível de transcritos dos genes FGF11, IGFBP4 e SPRY1 analisados por PCR em tempo real em células do cumulus bovinas oriundas de ovócitos de diferentes tamanhos de folículos (1-3; 6-8 e \geq 8,1 mm). Cada grupo foi analisado utilizando-se 4 *pools* de amostras e avaliados em três réplicas. Os dados (média \pm EPM) foram normalizados pelo gene GAPDH e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência.

^{a-b} Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ($P > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

É conhecido que na maioria das espécies mamíferas incluindo humanos, a qualidade do embrião depende principalmente da competência do ovócito selecionado para a fecundação. Esta competência é o resultado de mútuas interações do ovócito com seu ambiente folicular (Blondin & Sirard, 1995; Mikkelsen & Lindenberg, 2001; Krisher, 2004; Balaban & Urman, 2006). As células do cumulus são as células somáticas que ocupam o espaço imediato ao redor do ovócito e representam a primeira interface do ovócito com o ambiente externo (Hussein et al., 2006). As células do cumulus mantêm uma contínua e recíproca relação com o ovócito e estão envolvidas no suporte e na cronologia da maturação e na aquisição da competência (Hashimoto et al., 1998; Sirard & Trounson, 2003; Hussein et al., 2006). Portanto, o estudo da expressão de genes nas células do cumulus pode refletir o potencial de fertilidade de ovócitos, o qual pode ser avaliado por meio da identificação de biomarcadores moleculares da competência nestas células.

Neste estudo foi avaliada a expressão de seis genes, selecionados a partir da análise de microarranjo, os quais apresentaram menor expressão (ARHGAP22, COL18A1 e GPC4) e maior expressão (FGF11, IGFBP4 e SPRY1) em células do cumulus oriundas de ovócitos com diferentes competências. Para isso foi utilizado o modelo de diferentes tamanhos de folículos o qual estabelece uma relação entre o tamanho folicular e a competência para o desenvolvimento (Caixeta et al., 2009). Apesar de que na análise do microarranjo em que esses genes foram identificados tenham sido utilizadas células de folículos pequenos (1-3 mm) e grandes ($\geq 8,1$ mm), no presente estudo foi incluído um terceiro grupo de células. Esse grupo consistia em células do cumulus obtidas COCs de folículos de 6-8 mm, que em estudos prévios demonstraram apresentar competência para o desenvolvimento semelhante aos COC obtidos de folículos $\geq 8,1$ mm. Desta forma, seria

possível verificar se a expressão diferencial de genes se deve somente à diferença devido ao tamanho do folículo ou se deve à diferença na competência ovocitária.

Dos seis genes candidatos avaliados nas células do cumulus, 3 deles (50,0%), validaram o resultado do microarranjo, o que representa dois genes menos expressos selecionados (COL18A1 e GPC4) e somente um dos mais expressos (IGFBP4). Da mesma forma, Assidi e colaboradores (2011) avaliaram 17 genes candidatos em células do cumulus e somente 7 genes (41,2%) validaram os resultados do microarranjo. Entretanto, na maioria dos estudos, os padrões encontrados na análise de microarranjo são confirmados pelo qPCR (Ganhem et al., 2007; Assidi et al., 2008; Bettegowda et al., 2008; Hamel et al., 2008; Van Montfoort et al., 2008; Assidi et al., 2010; Regassa et al., 2011). No presente estudo na análise de microarranjo, o valor de correlação ($r^2 > 0,93$) entre as replicas foi alto, o que está de acordo com o recomendado para análises de microarranjo para aquisição de dados relevantes e com alta correlação com a validação de qPCR (Gupta et al., 2008). É possível, que se um maior número de genes tivesse sido avaliado neste estudo, a taxa de validação fosse diferente. Apesar disso, os resultados confirmam a idéia de que as informações obtidas na análise do microarranjo requerem uma confirmação da expressão diferencial por outro método como o qPCR.

O gene ARHGAP22 codifica a proteína 22 ativadora de GTPase da família Rho, a qual está envolvida na via de transdução do sinal e regulação da formação das células endoteliais do tubo capilar durante a angiogênese (Katoh & Katoh, 2004). Em humanos, a expressão de ARHGAP22 foi detectada no ovário e é possível que este gene tenha ação importante nas comunicações bidirecionais entre ovócitos e células do cumulus para a aquisição da competência ovocitária. Neste trabalho, a abundância relativa de transcritos de ARHGAP22 foi maior nas células de folículos de 1-3 mm comparados aos de folículos de 6-8 mm. Entretanto, nesta análise não se observou diferença na expressão do gene entre os folículos de 1-3 e $\geq 8,1$ mm como observado nos resultados obtidos no microarranjo.

Os resultados obtidos sugerem que as diferenças da expressão de ARHGAP22 em células do cumulus observadas nos folículos de 1-3 e $\geq 8,1$ mm com relação aos de 6-8 mm podem refletir a variação existente no desenvolvimento do folículo. Portanto, é possível que uma maior expressão desse gene seja requerida inicialmente em folículos menores para os eventos de sinalização celular nas células do cumulus e formação da vascularização durante o crescimento, ambas importantes para o desenvolvimento do COC. É aceito que o

desenvolvimento folicular é dependente da angiogênese (Koos, 1989), a qual é evidente no final do estágio pré-antral durante a aquisição da camada da teca. A vascularização se desenvolve para formar duas redes de capilares, conectadas em teca interna e externa (Findlay, 1986). Entretanto, nos folículos de 6-8 mm a expressão do gene foi diminuída e aumentou novamente nos folículos $\geq 8,1$ mm a um padrão similar ao observado nos folículos de 1-3 mm. A redução da expressão de ARHGAP22 nos folículos de 6-8 mm pode ser decorrência de um maior nível de tradução dos transcritos expressos nas células do cumulus necessários para um intenso processo de vascularização que ocorre simultaneamente à alta taxa de crescimento do folículo neste estágio ou devido a degradação de mRNA, o que é observado durante a ovogênese em bovinos (Vallée et al., 2009). Já nos folículos $\geq 8,1$ mm, o crescimento folicular continua e apesar da vascularização já ter sido formada, é possível, entretanto, que seja requerida uma maior expansão da vascularização existente, o que pode explicar os níveis aumentados da expressão de ARHGAP22 durante o desenvolvimento para formar o folículo maduro para a ovulação. De acordo com van den Hurk e colaboradores (1997), uma vascularização desenvolvida é observada durante as fases finais de crescimento folicular, que provavelmente propiciam um maior suprimento de hormônios, particularmente gonadotrofinas, para o folículo maior. Além disso, a família RHO de pequenas GTPases exerce um importante papel na regulação de muitos aspectos do comportamento celular incluindo progressão do ciclo celular, reorganização do citoesqueleto, polaridade celular, migração e invasão (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Ridley, 2001).

De acordo com a bibliografia revisada, até o momento, não se tem conhecimento da descrição da expressão de ARHGAP22 em células do cumulus de ovócitos bovinos oriundos de diferentes tamanhos de folículos. Sendo, portanto, a primeira vez que este gene é descrito em células do cumulus bovinas.

O gene COL18A1 que codifica o colágeno XVIII está envolvido na proliferação celular, polaridade e diferenciação em vários processos de desenvolvimento (Quelard et al., 2008). Mas é também conhecido que essas glicoproteínas no espaço extracelular exercem um importante papel na sinalização química entre células e elas podem fornecer um reservatório para várias moléculas sinalizadoras tais como membros das famílias Wnt, fator de crescimento transformante beta (TGF β), FGF e receptores de moléculas de adesão celular (Lin et al., 2001; Aricescu et al., 2002). A região C-terminal do colágeno XVIII pode liberar a endostatina que foi primeiro identificada como um potente inibidor da proliferação de células endoteliais e migração, capaz de inibir a angiogênese, com habilidade

de reduzir o crescimento tumoral e parece exercer algumas outras funções, como a indução da apoptose (Dhanabal et al., 1999; Dixelius et al., 2000; Scchmidt et al., 2004). Além disso, o colágeno XVIII na matriz extracelular pode ser importante para definir a plasticidade de células epiteliais e endoteliais em diferentes órgãos e pode estar envolvida na determinação da polaridade celular, influenciando o metabolismo celular e diferenciação (Lin et al., 2001). De acordo com as funções descritas desse gene, foi suposto que ele estivesse relacionado com a competência para o desenvolvimento embrionário. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo não confirmam essa hipótese, uma vez que a sua expressão nos folículos de 6-8 mm foi intermediária entre os demais folículos. É possível, portanto, que a diferença na expressão desse gene esteja relacionada com o tamanho do folículo. Isso porque, a expressão de COL18A foi maior em folículos menores comparada aos folículos $\geq 8,1$ mm, o que sugere que a sua expressão nas células do cumulus seja necessária para os eventos de regulação da proliferação celular, angiogênese e sinalização celular durante os estágios iniciais de desenvolvimento dos folículos.

Além disso, já foi descrito que a lâmina basal do folículo contém colágeno do tipo XVIII (Irving-Rodgers & Rodgers, 2005). É conhecido que, para a ruptura do folículo ovulatório que resulta na expulsão do ovócito, as fibras de colágeno contidas na túnica albugínea e na teca, bem como nas lâminas basais que contribuem para a tensão de estiramento (expansão) da parede do folículo são degradadas e ocorre um aumento da dilatação vascular e permeabilidade, os quais são necessários para que a ruptura ocorra (Murdoch et al., 1986; Abisogun et al., 1988). Desse modo, é provável que a expressão diminuída do gene COL18A1 nos folículos $\geq 8,1$ mm esteja relacionada com esse evento, uma vez que os folículos grandes estão em preparação para o momento da ovulação ou com o evento de degradação de mRNA descrito em ovócitos (Valée et al., 2009). Esses resultados diferenciam-se dos encontrados por Tamba e colaboradores (2010) que identificaram a expressão de aumentada de COL18A1 em células do cumulus de camundongos avaliadas após a ovulação, em resposta à sinalização da prostaglandina. Entretanto, é importante ressaltar que as células do cumulus utilizadas por esses autores foram previamente submetidas à aplicação de hCG, o que difere das condições do presente estudo para maiores comparações.

Quanto ao gene GPC4, o nível de transcritos foi maior nas células do cumulus de folículos de 1-3 mm comparados com as de folículos grandes, entretanto, a expressão do gene não diferiu entre os folículos grandes, ou seja, entre os folículos que continham ovócitos mais competentes. O GPC4 pertence à família das glicanas, as quais estão relacionadas à

regulação de eventos de sinalização celular durante a morfogênese e na fisiologia de organismos adultos (Fico et al., 2011). As glicanas são conhecidas por modular a sinalização mediada por moléculas extracelulares, incluindo Wnts, proteínas morfogenética de osso (BMPs) e FGFs e estão entre as proteoglicanas mais abundantes relacionadas ao desenvolvimento do sistema nervoso, sendo também expressas em células embrionárias (De Cat & David, 2001; Nybakken & Perrimon, 2002). A proteína *gpc4* tem sido mostrada por se ligar a FGF2, portanto, acredita-se que o GPC4 tenha um possível papel na modulação da sinalização do FGF (Hagihara et al., 2000). A função de GPC4, como de outros genes desta família, parece estar associada à regulação da divisão celular (Waterson et al., 2010).

Estes resultados são similares aos encontrados por van Montfoort e colaboradores (2008), os quais avaliaram o padrão de expressão do gene em células do cumulus humanas como um prognóstico indicador da viabilidade do embrião e também identificaram uma expressão diferencial de GPC4 em células do cumulus. As metodologias de análises da expressão gênica foram as mesmas utilizadas no presente estudo, entretanto, diferiu quanto às células do cumulus utilizadas pelos autores, as quais foram provenientes de ovócitos que resultaram em embriões em clivagem inicial comparados às células oriundas de ovócitos que não resultaram em embriões clivados. E de fato, a expressão de GPC4 foi identificada nas células do cumulus provenientes de ovócitos que resultaram em embriões de clivagem inicial, o que comprova que esse gene pode ser um marcador nas células do cumulus para a qualidade do embrião e reforça os resultados obtidos no presente estudo.

Dos três genes candidatos com maior expressão avaliados nas células do cumulus bovinas, somente o IGFBP4 apresentou uma alteração no padrão de expressão nos diferentes tamanhos de folículos, sendo que a abundância de transcritos desse gene foi menor em células de folículos de 1-3 mm comparados com as de folículos $\geq 8,1$ mm. O sistema IGF exerce um importante papel na regulação do desenvolvimento folicular ovariano (Buratini, 2005) e esteroidogênese (Kwintkiewicz & Giudice, 2009). Os IGFs são sinérgicos ao FSH na promoção de crescimento folicular e produção de estradiol (Fortune et al., 2004). É conhecido que a IGFBP4 apresenta grande afinidade pelos IGFs impedindo que estes se liguem aos receptores, portanto, a função das IGFBPases é degradar as IGFBPs possibilitando maior biodisponibilidade de IGF (livre) para se ligar aos receptores (Fortune et al., 2004). Além disso, a IGFBP4 tem sido descrita como a principal IGFBP inibitória no ovário (Conover et al., 1999; 2001).

A expressão aumentada de IGFBP4 tem sido também descrita por Kwon e colaboradores (2010) nas células da granulosa de folículos imaturos em mulheres. Nesse estudo, o aumento observado na expressão do mRNA de IGFBP4 em células da granulosa de mulheres com a síndrome de ovários policísticos é consistente com estudos anteriores que demonstraram que o IGFBP4 inibe a síntese de esteróides em células da granulosa e teca (Cataldo & Giudice, 1992; Mason et al., 1998).

A expressão gênica da IGFBP2 e 4 foi localizada em células da granulosa e da teca, respectivamente (revisado por Fortune, et al. 2001 e Webb et al., 1999). Níveis reduzidos da IGFBP4 foram encontrados em folículos dominantes bovinos comparados com os dois maiores folículos subordinados apenas 1,5 dias após a emergência da onda (Mihm et al. 2000). Há fortes evidências sugerindo que a redução dos níveis de IGFBP4 no folículo selecionado é consequência de um aumento da degradação proteolítica das IGFBPs pela proteína plasmática associada à gestação (PAPP), recentemente detectada no folículo (Mazerbourg et al., 2001). De fato, a degradação não apenas da IGFBP4, mas também da IGFBP5, foi mais alta no maior folículo antes do momento esperado do desvio folicular (Fortune et al., 2004).

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a maior concentração de transcritos de IGFBP4 em células do cumulus de folículos $\geq 8,1$ mm valida os resultados do microarranjo. Entretanto, a expressão de IGFBP4 nos folículos de 6-8 mm não diferiu da expressão nos folículos menores ou incompetentes. Portanto, essas diferenças na expressão gênica podem estar relacionadas ao tamanho do folículo e não com a competência do ovócito, uma vez que já foi demonstrado que os folículos > 6 mm apresentaram competência de desenvolvimento semelhante aos $\geq 8,1$ mm (Caixeta et al., 2009).

A expressão dos genes FGF11 e SRPY1 não apresentou diferença em células do cumulus bovina de acordo com o tamanho do folículo. Entretanto, era esperado que as expressões desses genes validassem os resultados do microarranjo, visto que o *fold change* (Tabelas 2.2 e 2.3, Capítulo 2) de ambos identificados no microarranjo foram superiores em relação aos dos demais genes avaliados. Os resultados de microarranjos são influenciados por uma variedade de fatores, como extração do RNA, marcação da sonda, condições de hibridação e análise de imagens. De acordo com Dallas e colaboradores (2005) geralmente existe uma grande correlação entre o dados de microarranjo e qPCR e que os dados discordantes indicam que uma validação independente continua sendo uma importante consideração.

Os FGFs alteram a função ovariana, pelo menos em parte pela inibição da secreção dos hormônios esteróides e afetam a sobrevivência das células da granulosa (Jiang et al., 2010), entretanto, os mecanismos de ação do FGF nas células do folículo ovariano ainda não estão bem caracterizados. O SPRY1 faz parte de uma família de quatro genes (SPRY1-4) que são induzidos pela sinalização de FGF e serve como um regulador *de feedback* negativo de FGF (Faedo et al., 2010; Jiang et al., 2010). Estudos demonstraram que a baixa expressão de SPRY1 endógeno aumenta os processos relativos à angiogênese em células endoteliais e o silenciamento deste gene em camundongos aumenta notavelmente a proliferação celular (Sabatel et al., 2010). Estudos em bovinos, demonstraram que o FGF2 aumentou a abundância de RNAm dos genes SPRY1, 2 e 4 nas células da granulosa (Jiang et al., 2010).

Apesar de não terem sido detectadas diferenças na expressão dos genes FGF11 e SRPY1 é evidente a expressão dos transcritos desses genes nas células do cumulus nos grupos de folículos avaliados. De acordo com a bibliografia consultada, até o momento, não se tem conhecimento da descrição de transcritos de FGF11 em células do cumulus de bovinos.

Portanto, a identificação de marcadores moleculares para a qualidade do ovócito em células do cumulus é uma importante ferramenta, especialmente porque permite prever a qualidade do ovócito para se desenvolver em um embrião saudável sem danificar o ovócito, o qual poderá ser ainda utilizado nas tecnologias de produção *in vitro* de embriões tanto para humanos quanto para os animais domésticos.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, foi confirmada a expressão diferencial dos genes COL18A1, GPC4 e IGFBP4 expressos em células do cumulus bovinas oriundas de folículos de diferentes tamanhos. Entretanto, o GPC4 é o gene que melhor reflete a qualidade do ovócito e seu grau de competência. Este gene pode representar um biomarcador não-invasivo para a competência de desenvolvimento do ovócito e ser utilizado rotineiramente nos procedimentos das TRAs. Todavia, o conhecimento do exato papel desse gene no controle do desenvolvimento potencial de ovócitos necessita de investigação adicional.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABISOGUN, A.O.; DAPHNA-IKEN, D.; REICH, R.; KRANZFELDER, D.; TSAFRIRI, A. Modulatory role of eicosanoids in vascular changes during the preovulatory period in the rat. **Biology of Reproduction**, 38, 756–7621, 1988.

ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. **Human Reproduction**, 9:815-827, 1994.

ARICESCU, A.R., MCKINNELL, I.W., HALFTER, W., STOKER, A.W. Heparan sulfate proteoglycans are ligands for receptor protein tyrosine phosphatase sigma. **Molecular Cell Biology**, 22, 1881–1892, 2002.

ASSIDI, M., DUFORT, I., ALI, A., HAMEL, M., ALGRIANY, O., DIELEMANN, S., SIRARD, M. A. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with folliclestimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. **Biology of Reproduction**, 79, 209–222, 2008.

ASSIDI, M.; DIELEMAN, S.J.; SIRARD, M.A. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, Dec; 140(6):835-52, Aug 19, 2010.

ASSIDI, M.; MONTAG, M.; VAN DER VEN, K.; SIRARD, M.A. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Feb; 28(2):173-88, 2011.

BALABAN, B.; URMAN, B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. **Reproductive Biomedicine Online**, 12:608–15, 2006.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; LEE, K. B. et al. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. **Biology of Reproduction**, 79, 301–309, 2008.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 41:54–62, 1995.

BURATINI, J.R. J.; TEIXEIRA, A.B.; COSTA, I.B. et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, 130:343-50, 2005.

CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M., et al. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**; 21:655–664, 2009.

CALDER, M.D.; CAVENEY A.N.; WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2)(PGE(2)) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus–oocyte complex quality, and PGE(2) induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. **Biology of Reproduction**, 65 135–140, 2001.

CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; SIRARD, M.A.; WATSON, A.J. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro. **Fertility and Sterility**, Apr; 83 Suppl 1:1077-85, 2005.

CATALDO, N.A.; GIUDICE LC. Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlate with follicular functional status. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 74:821–9, 1992.

CONOVER, C.A.; OXVIG, C.; OVERGAARD, M.T., et al. Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 84, 4742–4745, 1999.

CONOVER, C.A.; FAESSEN, G.F.; ILG, K.E. et al. Pregnancy-associated plasma protein-a is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum. **Endocrinology**, 142:2155, 2001.

COTICCHIO, G.; SERENI, E.; SERRAO, L. et al. What criteria for the definition of oocyte quality? **Annals of the New York Academy of Science**, 1034:132–144, 2004.

DALLAS, P. B.; GOTTARDO, N. G.; FIRTH, M. J. et al. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR – how well do they correlate? **BMC Genomics**, 6: 59, 2005.

DE CAT, B.; DAVID, G. Developmental roles of the glypicans. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 12:117–125, 2001.

DE WIT, A. A. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, T. A. M. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus–oocyte complex. **Journal of Animal Science**, 78, 1277–1283, 2000.

DHANABAL, M.; RAMCHANDRAN, R.; WATERMAN, M.J.; LU, H.; KNEBELMANN, B.; SEGAL, M.; SUKHATME, V.P. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, 274, 11721–11726, 1999.

DIXELIUS, J.; LARSSON, H.; SASAKI, T. et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. **Blood**, Jun 1;95(11):3403-11, 2000.

DODE, M. A. N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M. A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, 73, 288–297, 2006.

DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of Reproduction**, 71, 1813–1821, 2004.

EPPIG, J. J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bioessays**, 13:569–574,1991.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, 122, 829–838, 2001.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F. L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **Proceedings National Academy of Science, USA**, 99:2890–4, 2002.

ETIENNE-MANNEVILLE, S., HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, 420, 629–635, 2002.

FAEDO, A.; BORELLO, U.; RUBENSTEIN, J. L. R. Repression of Fgf-Signaling by Sprouty1-2 Regulates Cortical Patterning in Two Distinct Regions and Times. **Journal of Neuroscience**, March 17; 30(11): 4015–4023, 2010.

FAIR, T.; MURPHY, M.; RIZOS, D. et al. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, 67, 136–144, 2004.

FATEHI, A. N.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B. Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote*, 13 : pp 177-185, 2005.

FICO, A.; MAINA, F.; DONO, R. Fine-tuning of cell signaling by glypicans. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 68:923–929, 2011.

FINDLAY J.K. Angiogenesis in reproductive tissues. **Journal of Endocrinology**, 111, 357, 1986.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

GHANEM, N.; HÖLKER, M.; RINGS, F.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.A, et al. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. **Developmental Biology**, 7: 1-19, 2007.

GILCHRIST, R.B., RITTER, L.J.; ARMSTRONG D.T. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, 82–83:431–46, 2004.

GUPTA, PK.; RUSTGI, S.; MIR, R.R. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. **Heredity**, 101, 5–18, 2008.

HAGEMANN, L. J.; BEAUMONT, S. E.; BERG, M. et al. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, 53, 451–458, 1999.

HAGIHARA, K.; WATANABE, K.; CHUN, J.; YAMAGUCHI, Y. Glypican-4 is an FGF2-binding heparan sulfate proteoglycan expressed in neural precursor cells. **Developmental Dynamics**, 219:353–367, 2000.

HAMEL, M.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; GRAVEL, C.; LEVEILLE, M.C.; LEADER, A, SIRARD, M.A. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. **Human Reproduction**, May;23(5):1118-27, 2008.

HANAFUSA, H. et al. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. **Nature cell biology advance online publication**. Published online: 28 October, 2002.

HASHIMOTO, S.; SAEKI, K.; NAGAO, Y. et al. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, Jun; 49(8):1451-63, 1998.

HUSSEIN, T.S.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, 296:514–521, 2006.

IRVING-RODGERS, H.F.; RODGERS, R.J. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. **Cell and Tissue Research**, 322: 89–98, 2005.

JIANG, Z.L.; RIPAMONTE, P.; BURATINI, J., et al. Fibroblast Growth Factor-2 Regulation of Sprouty and NR4A Genes in Bovine Ovarian Granulosa Cells. **Journal of cellular physiology**. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com), 10 November, 2010.

KATOH, M.; KATOH, M. Identification and characterization of ARHGAP24 and ARHGAP25 genes in silico. **International Journal of Molecular Medicine**, 14:333– 8, 2004.

KOOS, R.D. Potential relevance of angiogenic factors to ovarian physiology. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, 7, 29–40, 1989.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, 82, 14–23, 2004.

KWINTKIEWICZ, J.; GIUDICE, L.C. The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. **Seminars in Reproductive Medicine**, 27:43–51, 2009.

KWON, H.; CHOI, D. H.; BAE, J. H. et al. mRNA expression pattern of insulin-like growth factor components of granulosa cells and cumulus cells in women with and without polycystic ovary syndrome according to oocyte maturity. **Fertility and Sterility**, Vol. 94, No. 6, November, 2010.

LEQUARRE, A. S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F., et al. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, 63, 841–859, 2005.

LIN, Y.; ZHANG, S.; REHN, M. et al. Induced repatterning of type XVIII collagen expression in ureter bud from kidney to lung type: association with sonic hedgehog and ectopic surfactant protein C. **Development**, 128, 1573–1585, 2001.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D., et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, 37, 48–53, 1994.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E., et al. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, 61, 329–335, 2004.

MASON, H.D.; CWYFAN-HUGHES, S.; HOLLY, J.M., et al. Potent inhibition of human ovarian steroidogenesis by insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4). **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Jan; 83(1):284-7, 1998.

MATZUK, M.M.; BURNS, K.H.; VIVEIROS, M.M., et al. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, 296 2178–2180, 2002.

MAZERBOURG, S.; OVERGAARD, M.T.; OXVIG, C. 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**, 142:5243–5253, 2001.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J.; GOOD, T.E.M. et al. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 811-819, 2000.

MIKKELSEN, A.L.; LINDENBERG, S. Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. **Human Reproduction**, Aug; 16(8):1714-8, 2001.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C., et al. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, 73, 1367–1379, 2006.

MURDOCH, W. J., T. A. PETERSON, E. A. VAN KIRK, et al. Inskeep. Interactive roles of progesterone, prostaglandins and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biology of Reproduction**, 35:1187, 1986.

NYBAKKEN, K.; PERRIMON, N. Heparan sulfate proteoglycan modulation of developmental signaling in *Drosophila*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1573:280–291, 2002.

PATEL, O.V.; BETTEGOWDA, A.; IRELAND, J. J., et al. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor development competence of bovine oocytes. **Reproduction**, 133, 95–106, 2007.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 29, e45, 2001.

QUELARD, D.; LAVERGNE, E.; HENDAOU, I., et al. A cryptic frizzled module in cell surface collagen 18 inhibits Wnt/beta-catenin signaling. **Plos One**, 3, e1878, 2008.

RACEDO, S. E.; WRENZYCKI, C; HERRMANN, D. et al. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine *in vitro* matured oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 75, 17–25, 2008.

REGASSA, A.; RINGS, F.; HOELKER, M. et al. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. **BMC Genomics**, Jan 24;12:57, 2011.

RIDLEY, A. JRho GTPases and cell migration. **Journal of Cell Science**, 114, 2713–2722, 2001.

SCHMIDT, A.; ADDICKS, K.; BLOCH, W. Opposite effects of endostatin on different endothelial cells. **Cancer Biology and Therapy**, 3, 1162–1168, 2004.

SIRARD, M.A.; TROUNSON, A. Follicular factors affecting oocyte maturation and developmental competence. In: TAOG RG, editor. **Biology and pathology of the oocyte: Its role in fertility and reproductive medicine**. Cambridge: Cambridge University Press; p. 305–15, 2003.

TAMBA, S.; YODOI, R.; MORIMOTO, K. et al. Expression profiling of cumulus cells reveals functional changes during ovulation and central roles of prostaglandin EP2 receptor in cAMP signaling. **Biochimie**, 92 665-675, 2010.

VALLÉE, M.; DUFORT, I.; DESROSIERS, S. et al. Revealing the bovine embryo transcript profiles during early *in vivo* embryonic development. **Reproduction**, 138, 95–105, 2009.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, 47:73–82, 1997.

VAN MONTFOORT, A.P.A; GERAEDT, J.P.M.; DUMOULIN, J.C.M. et al. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. **MHR-Basic Science of Reproductive Medicine**, Vol.14, No.3 pp. 157–168, 2008.

WATERSON, J.; STOCKLEY, T.L.; SEGAL, S., et al. Novel duplication in glypican-4 as an apparent cause of Simpson–Golabi–Behmel syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, 152A:3179–3181, 2010.

WEBB, R.; CAMPBELL, B.K.; GARVERICK, H.A.; GONG, J.G.; GUTIERREZ, C.G.; ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, Review, 54:33-48, 1999.

ZHONG W, WANG, Q.T.; SUN, T. et al. FGF ligand family mRNA expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem cells. **Molecular Reproduction and Development**, May; 73(5):540-50, 2006.

CAPÍTULO 4

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização das biotécnicas de reprodução, tais como a produção *in vitro* de embriões, depende de muitos fatores, dentre eles, a seleção de ovócitos de qualidade. Muitos estudos têm sido conduzidos em ovócitos para se estabelecer parâmetros eficientes para a identificação dos mais competentes para o desenvolvimento. As células do cumulus que envolvem o ovócito, e que são metabolicamente ligadas a eles por comunicações intercelulares, têm papel fundamental no crescimento e maturação ovocitária. Essas células, portanto, podem ser indicadores diretos do status fisiológico dos ovócitos e, por serem facilmente obtidas sem inviabilizar a posterior utilização do ovócito, têm sido alvo na busca de marcadores para a qualidade do ovócito.

O uso da análise de microarranjo permite o estabelecimento de um painel de expressão dos genes e representa um arsenal valioso de informações biológicas a ser intensivamente explorado. Essa técnica foi utilizada no presente estudo na tentativa de identificar genes diferencialmente expressos em células do cumulus bovinas que representassem ovócitos com diferentes graus de competência. Vários genes foram identificados e muitos deles possivelmente constituem-se como potenciais marcadores da competência do ovócito e a sua validação é um passo crucial para a confirmação dos mesmos como verdadeiros biomarcadores. A partir dos resultados pode-se confirmar que a viabilidade do ovócito é dependente de um fino balanço de múltiplas vias e vários tipos celulares que compõem o folículo. Entretanto, é importante ressaltar que as vias moleculares nas quais esses genes estão envolvidos são ainda muito pouco conhecidas e mais estudos são necessários para um melhor entendimento das suas respectivas funções e facilitar a capacidade de prever o desenvolvimento potencial dos ovócitos.

De posse das informações obtidas nesse estudo, seria importante o estabelecimento de uma lista de marcadores moleculares em células do cumulus para a

seleção de ovócitos competentes que pudessem realmente ser utilizados nas rotinas de produção *in vitro* de embriões, visto a existência das várias facilidades tecnológicas atualmente disponíveis nos laboratórios para a rápida quantificação da expressão gênica. Apesar de um pequeno número de genes terem sido utilizados para validação do resultado do microarranjo, foi possível identificar pelo menos um gene que está claramente relacionado e que tem grande potencial para ser utilizado como marcador para competência. A identificação de marcadores moleculares não-invasivos para a competência do ovócito pode contribuir para uma melhor seleção de ovócitos competentes para aplicação nas rotinas de FIV, ICSI e clonagem e proporcionam ferramentas importantes para os estudos que visam melhorar a eficiência dessas técnicas.

Além disso, os transcritos de alguns dos genes investigados neste estudo (ARHGAP22 e FGF11) foram pela primeira vez descritos em células do cumulus de bovinos de diferentes tamanhos de folículos. Essas informações moleculares são essenciais para auxiliar na elucidação dos eventos que regem a complexa interação células do cumulus e ovócito e que estão envolvidos na aquisição da competência. De acordo com esta perspectiva, este estudo representa uma contribuição diante da quantidade de informação disponível que foi gerada. Todavia, significa um avanço para a continuidade dos estudos conduzidos nesse laboratório, de modo a aprofundar as investigações sobre os eventos que conferem a competência ovocitária.

ANEXOS

1 ANEXO A – RELAÇÃO DE GENES

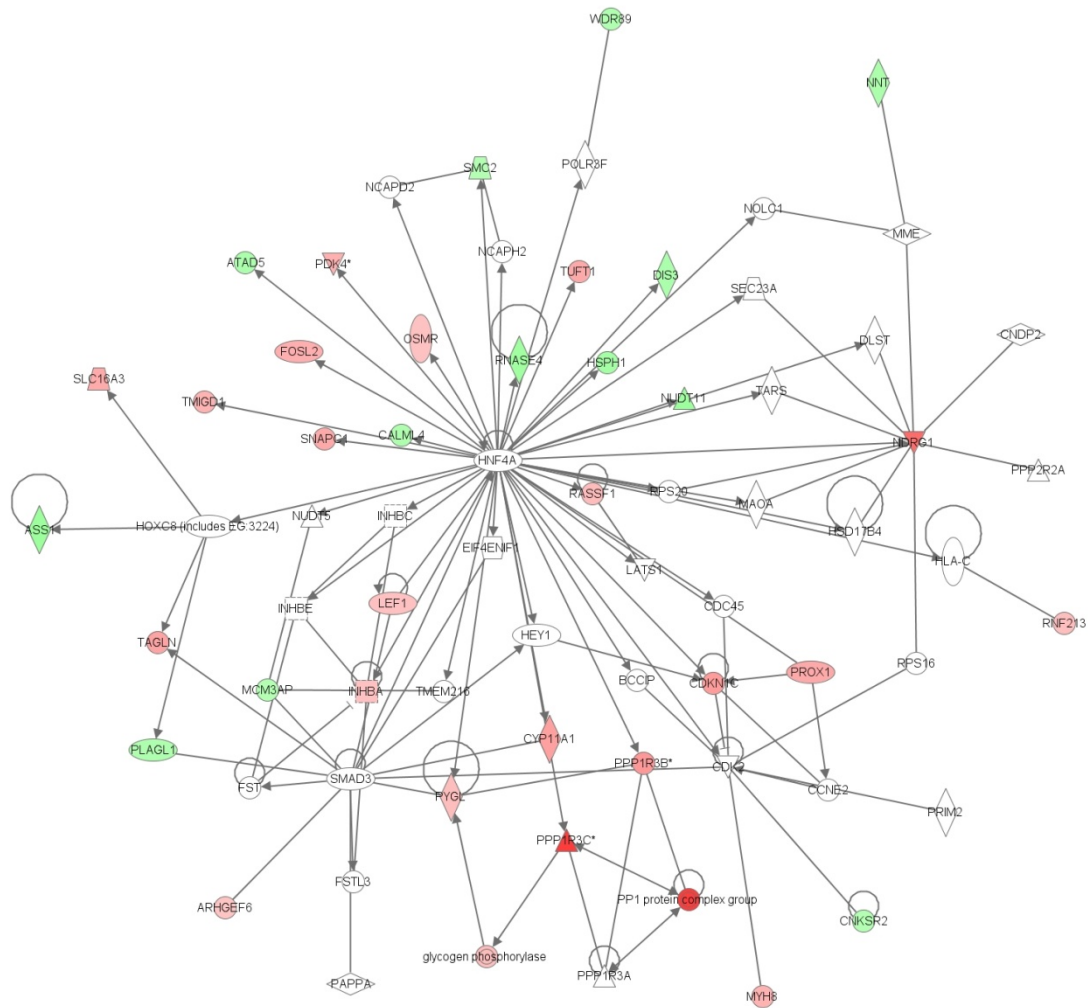
Tabela 2.A.1 - Relação de genes diferencialmente expressos em células do cumulus bovinas provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com a classificação funcional IPA (*Ingenuity Pathways Analysis*).

EPO, ID2, LGALS3, AATF, DDIT3, HSPA1A, PTN, PTHLH, TPD52L1, PROX1, BCL6, CHEK1, VEGFA, BCAT1, RASSF1, TOP2A, FOSL2, KIT, ERFF1, CDKN1C, MXI1, DPP4, IL4R, PLAGL1, H19, UHRF1, ANGPTL2, IRF9, CKAP2, RPRM, CEBPB, IER3, KLF4, INHBA, TOB2, GHR, SMC2, BHLHE40, CEBPD, CDKN1A, FBXO5, LEF1, PTGS2, A2M, TRIM25	Ciclo celular
TFR2, TYRO3, IKZF3, VEGFA, BNIP3, BCAT1, LTF, MT2A, FBLN1, OSMR, SERPINE1, TNFRSF21, SFRP4, IL4R, SLC2A1, NDRG1, ITGA6, GRK5, IER3, MAFF, CD72, BHLHE40, THBS2, CTSB, ALCAM, MEST, TNFAIP6, ENC1, ANG, EPO, CD99, ZFP36, AATF, DDIT3, WWTR1, SEMA6A, PTN, PROX1, GPC4, EIF4EBP1, CHEK1, TRIB1, RASSF1, F2RL1, PLIN2, HOXA5, IFITM1, FABP4, COL18A1, TNFRSF6B, PLAGL1, RGS2, SERPINF1, CDCA7, DLC1, F3, ISG15, MRAP, RASGRP1, CDKN1A, FGF11, PTGS2, TRIM25, WFDC1, PER1, LGALS3, HSPA1A, PRSS2, PTHLH, BCL6, TCF7, CA9, IFI30, CYBB, PXDN, FOSL2, CDKN1C, MXI1, TSPAN31, PFKFB3, H19, KLF4, BST2, INHBA, STC1, TOB2, ANKRD1, CEBPD, FBN1, CD14, LEF1, ACTN4, IGFBP4, ID2, SFRP2, FRZB, KLF10, UGCG, TNFRSF12A, COL1A2, EPHB6, CYP19A1, TIMP1, EGLN3, KIT, ERFF1, DNAJB1, PIK3IP1, ARHGAP22, DPP4, SLC9A3R1, UHRF1, SPRY1, ERO1L, MX1, CEBPB, HOPX, CXCL16, GHR, NT5E, CRABP2, EDNRA, A2M, TOX, ISG20	Crescimento celular e proliferação
RGS1, HSPA1A, ASS1, C1QA, BCL6, PLA2G7, TCF7, VEGFA, LTF, IFI30, CYBB, OSMR, SERPINE1, IL4R, NDRG1, IRF9, IER3, INHBA, ANKRD1, PRSS23, CXCR7, CEBPD, THBS2, CD14, ALCAM, TNFAIP6, COL3A1, EPO, ZFP36, TNFRSF12A, EIF4EBP1, VNN1, F2RL1, CYP19A1, KIT, FABP4, IFI6, TNFRSF6B, DPP4, RGS2, SERPINF1, MX1, CEBPB, S100A12, F3, ISG15, CXCL16, NT5E, CDKN1A, EDNRA, NMI, PTGS2, A2M	Ovulação e inflamação
PPP1R3B, PPP1R3C, CTSB, PYGL, TNFAIP6, PLA2G7, ACSS1, ACSS2, ACAT2A, CYP2, ALDH2, ALDH1B, ALDH3A, ALDH7A1, AKR1B1, ALDH9A, DLAT, DLD, GRHPR, GLO1, LDHA, LDHB, LDHC, LDHD, HAGH, HAGL, MDH1, MDH2 ME1, ME2, ME3, PDHB, PDHA1, PC, PCK1, PKLR	Metabolismo de energia
BCAT1, DPP4, GHR, ASS1, CPA1, PHGDH, EDNRA, SLC1A1, MAT2A, GATM, ALAS2, ABP1, ARG1, AKR1B10, ARG2, ASS1, ASL, AMT, ALAS1, ALDH4A1, CHKA, BHMT, CHKB, CKB, CKMT2, CKM, DLD, DMGDH, CPS1, GATM, GNMT, GLUD1, GLDC, GARS, GCAT, GOT1, GOT2, LAP3, HSD3B7, SARS, MAOA, MAOB, NOS3, OAT, OTC, PEMT, PYCRL, PISD, PYCR1, PYCR2, SARS2, RDH12, TARS2, SHMT2, PIPOX, P4HA3, PSPH, RDH11, RARS, SDS, PRODH, P4HA1, P4HA2, SARDH, TARS	Metabolismo de aminoácido
RGS1, PER1, CD99, LGALS3, AATF, HSPA1A, TYRO3, PTHLH, PRSS2, C1QA, TNFRSF12A, VEGFA, EPHB6, RASSF1, VNN1, F2RL1, LTF, TIMP1, KIT, COL18A1, SERPINE1, TNFRSF6B, DPP4, IL4R, SORL1, SERPINF1, ITGA6, F3, INHBA, CXCL16, RND3, RASGRP1, CD72, THBS2, CDKN1A, CDH8, ALCAM, CD14, ACTN4, TNFAIP6, DSG2, A2M, PVRL2	Sinalização Celular
EPO, IGFBP4, LGALS3, DDIT3, HSPA1A, TFR2, PTHLH, PTN,	Reparo de DNA

MCM3AP, TPD52L1, CHEK1, VEGFA, BNIP3, RASSF1, TOP2A, ERRF1, CDKN1C, PIK3IP1, UHRF1, INHBA, GHR, CDKN1A, THBS2, EDNRA, PTGS2, ANG, A2M, ISG20	
HMGCR, JAG2, BMP15, CSNK2A2, DDX25, GDF9, PICK1, SPA17, SPAG6, TOB2, TSSK3, BMPR1B, PRM2, PRM1, USP9X, CEP57, HSPA2, HSF2BP, DUSP13, DAZAP1, CHEK1, DEAF1, PNMA1, XRN2, TESK2, TESK1, SPAG4, SYCP3, TCFL5 BAX, RACGAP1, AXIN1, MEA1, INSL3, PRKAG1, PARN, DYNLL1, SERPINA5, FSHR, PROK2, RUVBL1, FSHB, DNAH9, HOXA10	Meiose

ANEXO B – VIAS METABÓLICAS

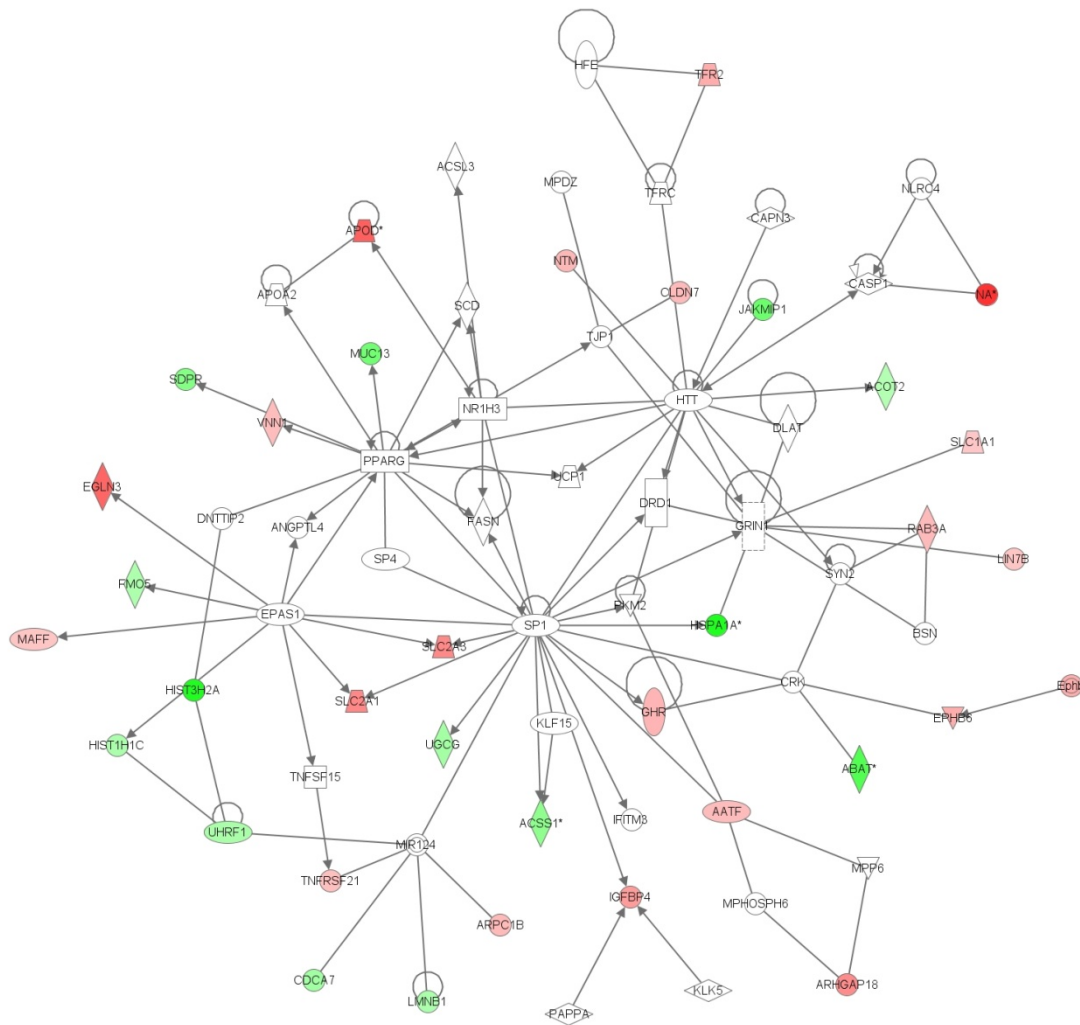
Network 2 : IPA568DEGs - 2010-09-29 08:11 PM : IPA568DEGs.xls : IPA568DEGs - 2010-09-29 08:11 PM



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 2.B.9 - Via metabólica 3 (VM 3) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis). Os genes mais expressos (vermelho) são: PDK4, FOSL2, SLC16A3, NDRG1, TMIGD1, TUFT1, TAGLN, CYP11A1, PPP1R3C, PPP1R3B, CDKN1C, PROX1, NDRG1. Os genes menos expressos (verde) são: ASS1 e NUDT11. A expressão de vários desses genes está envolvida com o ciclo celular (CDKN1C), ovulação e inflamação (ASS1, NDRG1) e metabolismo de energia (PPP1R3C, PPP1R3B) nas células do cumulus bovinas, funções possivelmente relacionadas à competência ovocitária.

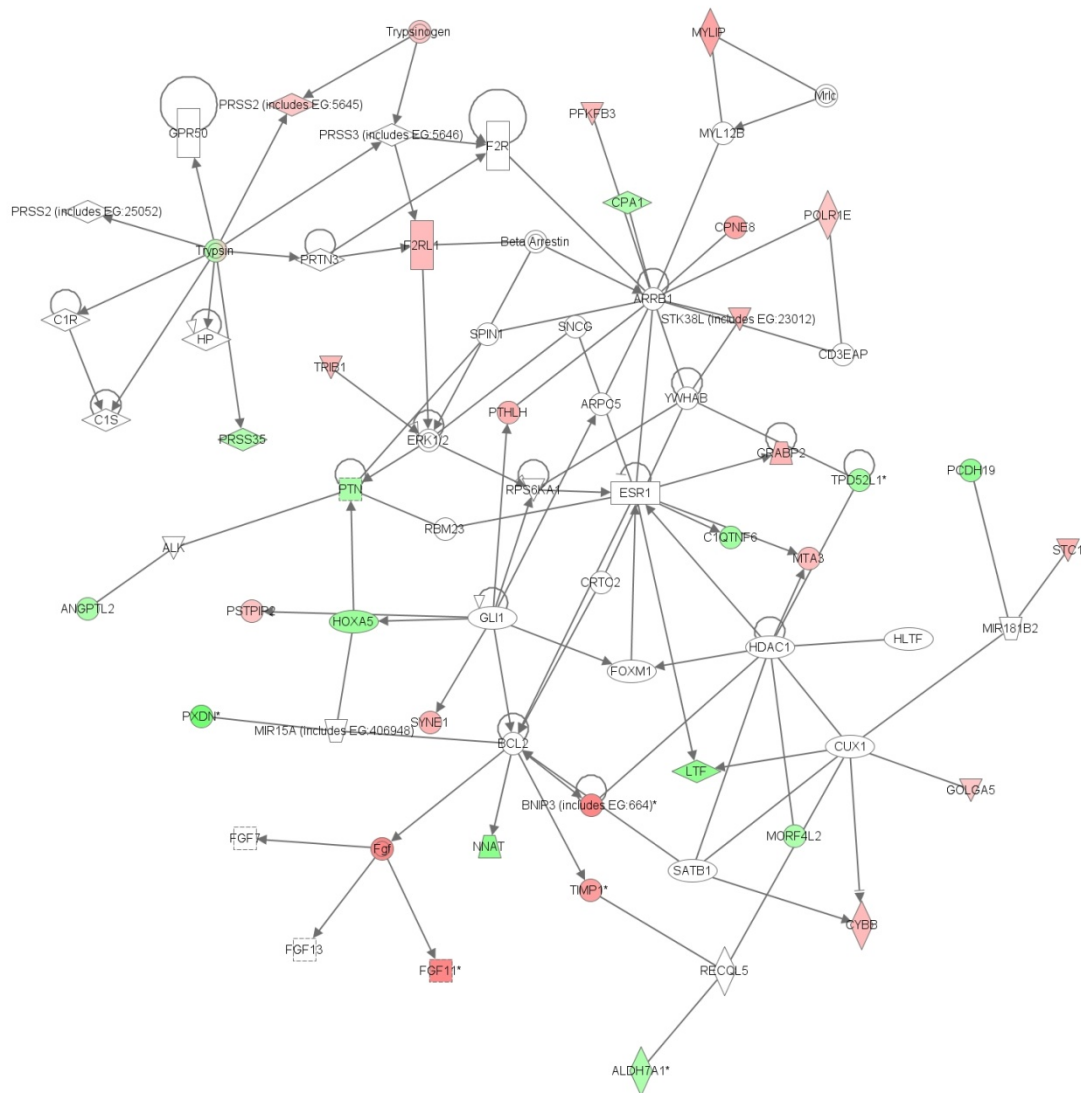
Network 3 : IPA568DEGs - 2010-09-29 08:11 PM : IPA568DEGs.xls : IPA568DEGs - 2010-09-29 08:11 PM



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 2.B.10 - Via metabólica 4 (VM 4) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis). Os genes mais expressos (vermelho) são: TRF2, APOD, EGLN3, SLC2A3, SCL2A1, GHR, EPHB6, IGFBP4 e ARHGAP18. Os genes menos expressos (verde) são: JAKMP1, MUC13, SDRP, HSPA1A, HIST3H2A e ABAT, ACSS1. A expressão aumentada de IGFBP4 nas células do cumulus bovinas de folículos $\geq 8,1$ mm está relacionada com o crescimento e proliferação celular e reparo de DNA.

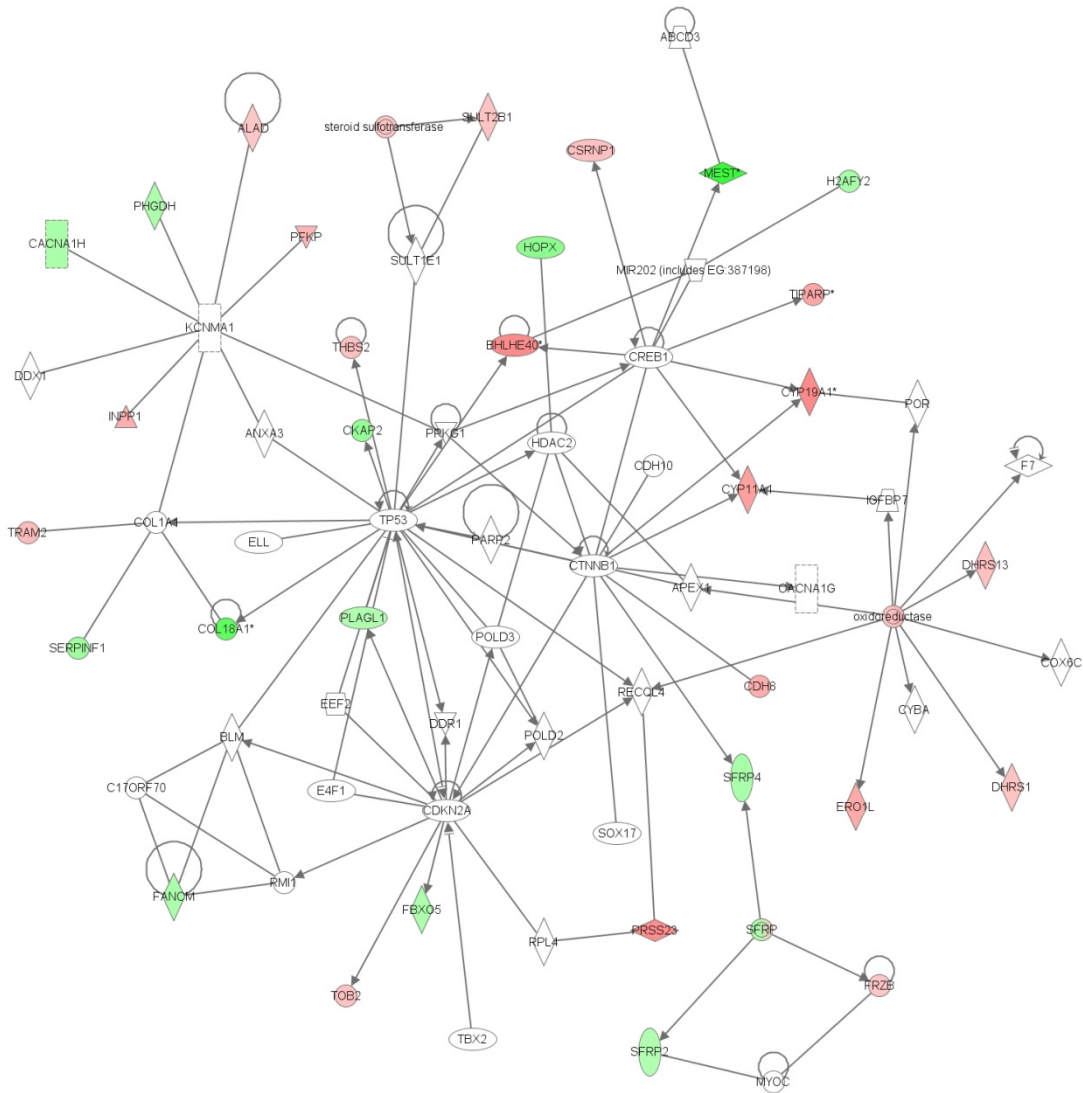
Network 4 : IPA566DEGs - 2010-09-29 08:11 PM : IPA566DEGs : IPA566DEGs - 2010-09-29 08:11 PM



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 2.B.11 - Via metabólica 5 (VM 5) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de foliculos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis). Os genes mais expressos (vermelho) são: MYLIP, CPNE8, STK38L, PTHLH, CRABP2, STC1, SYNE1, BNIP3, TIMP1, FGF11. Os genes menos expressos (verde) são: PCDH19, HOXA5 e PCDN. A expressão aumentada dos genes PTHLH e TIMP1 nas células do cumulus bovinas de foliculos $\geq 8,1$ mm está envolvida com a sinalização celular e organogênese. Do mesmo modo, a expressão de FGF11 nessas células está relacionada ao crescimento e proliferação celular.

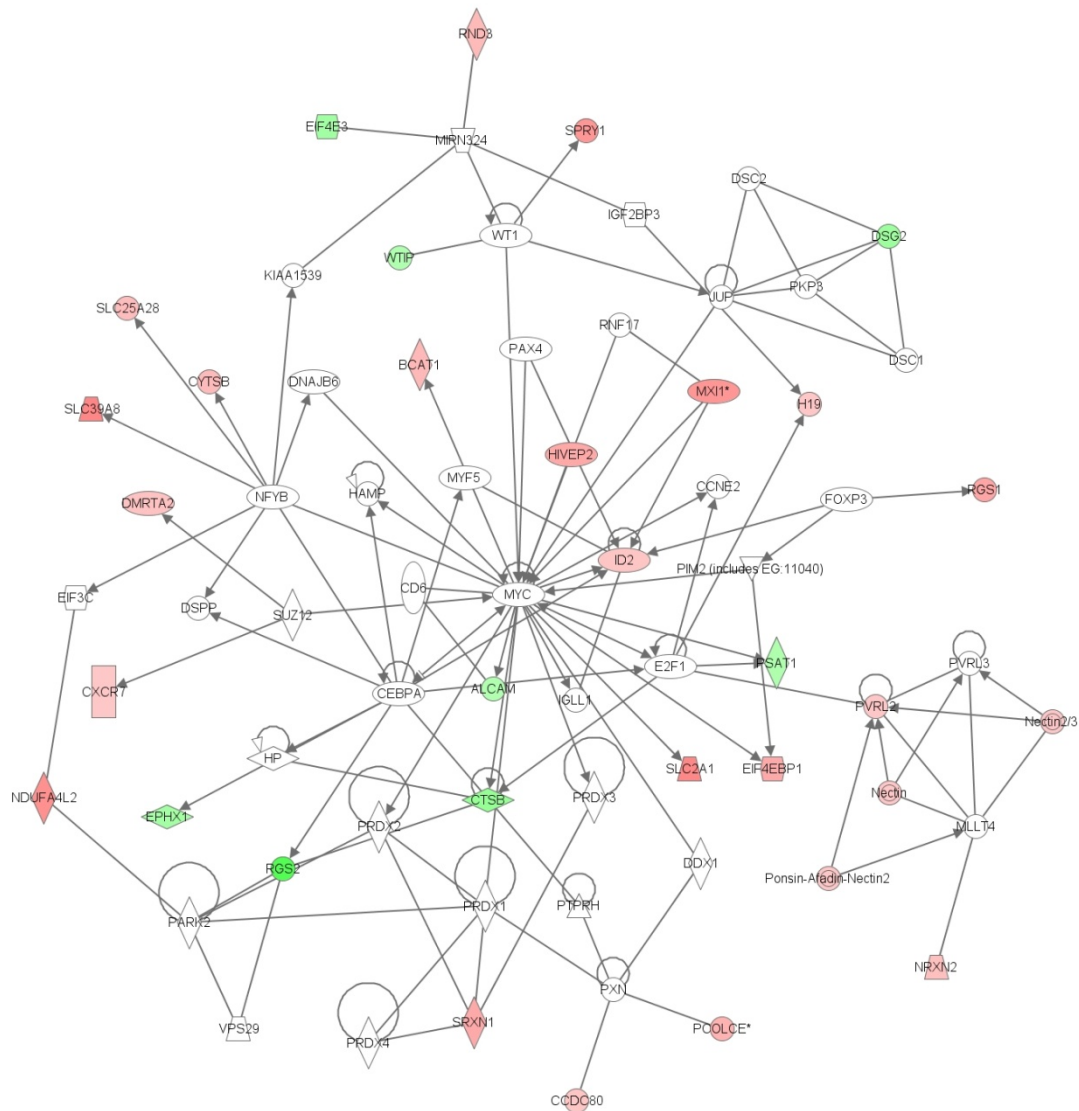
Network 6 : IPA566DEGs - 2010-09-29 08:11 PM : IPA566DEGs.xls : IPA566DEGs - 2010-09-29 08:11 PM



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 2.B.12 - Via metabólica 6 (VM 6) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis). Os genes mais expressos (vermelho) são: PFKF, TIPARP, INPP1, CYP11A1, CYP19A1 e CDH8. Os genes menos expressos (verde) são: MEST, HOPX, CKAP2 e COL18A1. A função do gene COL18A1 nas células do cumulus bovinas de folículos $\geq 8,1$ mm está relacionada com o crescimento e proliferação celular e sinalização celular.

Network 7 : IPA566DEGs - 2010-09-29 08:11 PM : IPA566DEGs.xls : IPA566DEGs - 2010-09-29 08:11 PM



© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 2.B.13 - Via metabólica 7 (VM 7) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis). Os genes mais expressos (vermelho) são: SPRY1, MXI1, SLC39A8, HIVEP2, SLC2A1, PCOLCE, EIF4EBP1 e SRXN1. Os genes menos expressos (verde) são: DSG2, CTSS e RGS2. A expressão do gene SPRY1 em células do cumulus bovinas de folículos $\geq 8,1$ mm está relacionado com a função de crescimento e proliferação celular.

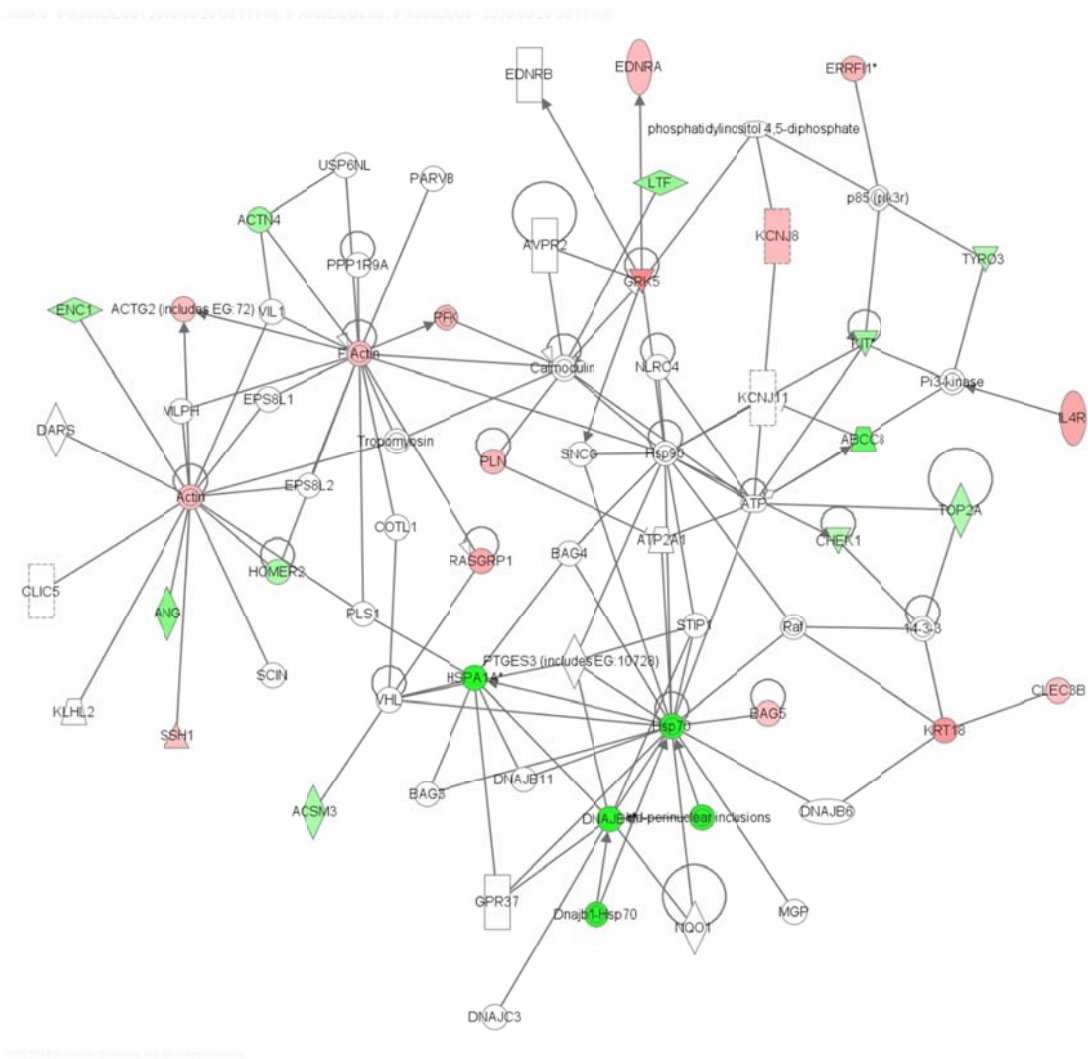


Figura 2.B.15 - Via metabólica 9 (VM 9) gerada a partir de genes mais ($\geq 2,5$ fold change) e menos ($\leq 2,5$ fold change) expressos em células do cumulus bovina provenientes de folículos $\geq 8,1$ mm comparados aos de 1-3 mm, de acordo com IPA (Ingenuity Pathways Analysis). Os genes mais expressos (vermelho) são: ERRF11, GRK5, IL4R, PLN, RASGRP1 e KRT18. Os genes menos expressos (verde) são: ACTN4, LTF, KIT, ABCC8, ANG, HSPA1A e DNAJB1. A expressão aumentada dos genes ERRF11 e IL4R em células do cumulus bovinas de folículos $\geq 8,1$ mm está envolvida com as funções de ciclo celular, crescimento e proliferação celular. Além disso, o gene ERRF11 é relacionado com o reparo de DNA e o IL4R com os eventos de sinalização celular e ovulação e inflamação nessas células.