



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA
OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

ESTER SIQUEIRA CAIXETA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
JANEIRO DE 2009**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA
OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

ALUNO: Ester Siqueira Caixeta

ORIENTADOR: Margot Alves Nunes Dode

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 05/ 2009

**BRASÍLIA/DF
JANEIRO DE 2009**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CAIXETA, E. S. **Expressão de genes candidatos para aquisição da competência ovocitária em bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 53p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado 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 o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

CAIXETA, Ester Siqueira. **Expressão de genes candidatos para aquisição da competência ovocitária em bovinos**
Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2008, 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2008.

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

CDD ou CDU

Agris / FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA
OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

ESTER SIQUEIRA CAIXETA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

APROVADA POR:

MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (Embrapa)
CPF: 395.928.980-49 E-mail: margot@cenargen.embrapa.br

CAROLINA MADEIRA LUCCI, Doutorado (UnB)
CPF: 490.390.241-20 E-mail: cmlucci@unb.br

CARLOS FREDERICO MARTINS, Doutorado (Embrapa)
CPF: 170.308.728-35 E-mail: carlos.frederico@cpac.embrapa.br

BRASÍLIA/DF, 26 de JANEIRO de 2009

**“Ao Deus que me revestiu de força e
aperfeiçoou meu caminho” (Salmos 18:32),
dedico...**

Aos meus pais Ivan e Elenice, pelo amor, por estarem sempre ao meu lado, pelo carinho, incentivo e paciência constantes. Vocês serão sempre meu orgulho! Amo vocês!

Aos meus irmãos Dani e Bruna (cunhada), por serem tão especiais, e Mari, pelo quanto é importante para mim... A melhor conversa, a melhor risada, o mais precioso segredo... e sem dúvida, os melhores momentos.

Aos meus avós Sylvia (em memória), José, Cornélia e Isaltino, pelas orações e pelo exemplo de vida.

Ao Russo, que mesmo a distância soube se fazer presente sempre! Pelo companheirismo, carinho e força em todos os momentos. Você é essencial.

À tia Elen, mais que tia, uma irmã, pela disposição em me ajudar sempre, pelos conselhos, amizade e pelos momentos inesquecíveis que vivemos juntas, e ao Tio Marcelo, pela hospedagem em Botucatu e pela sua alegria contagiante.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Dra. Margot Alves Nunes Dode**, agradeço pelos ensinamentos e atenção dispensada durante esses anos. Um grande exemplo de pesquisadora dedicada. Sempre terei um imenso carinho pela senhora!

Ao **Maurício** pela ajuda no laboratório Molecular e pela paciência constante. Seus ensinamentos foram fundamentais!

À **Embrapa – Cenargen**, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Aos **Pesquisadores e Funcionários da Embrapa – Cenargen** pela amizade e incentivo.

À **UnB** pela oportunidade concedida para a realização deste mestrado.

Ao **Labaratório de Fisiologia Ovariana**, UNESP – Botucatu, pela oportunidade concedida para a realização de parte deste trabalho. E pelos grandes amigos que tanto me incentivaram e ajudaram, Paula, Mari, Rúbia, Antony e Diego.

As grandes “irmãs” **Lud e Flavinha**, agradeço pelo alegre convívio nesses anos, pelo companheirismo, apoio e amizade. A nossa “casinha” contribuiu muito para o meu crescimento pessoal. Vocês ficarão sempre no meu coração!

Aos amigos **Ana, Júlia e Léo**, minha família em Brasília, vocês foram fundamentais!

Aos **amigos e colegas de mestrado**, Katlen, Grazieli, Ligiane, Alice, Ana Cláudia, Fernanda, Michele, Monique, Maria Clara, Valquíria, Tati, Zé, Chivas ... a todos, muito obrigada!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pela concessão da bolsa de estudo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivo Geral	4
1.2 Objetivos Específicos	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Desenvolvimento do Folículo e do Ovócito	5
2.2 Competência Ovocitária	7
2.3 Genes Seleccionados	9
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS	24
1 RESUMO	25
2 ABSTRACT	26
3 INTRODUÇÃO	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Delineamento Experimental	30
4.2 Recuperação, Classificação e Mensuração dos Ovócitos	30
4.3 Produção <i>In vitro</i> de Embriões	32
4.3.1 Maturação <i>in vitro</i>	32
4.3.2 Fecundação <i>in vitro</i>	33
4.3.3 Cultivo <i>in vitro</i>	33
4.4 Abundância Relativa dos Transcritos nos Ovócitos e Células do Cumulus	34
4.4.1 Armazenamento dos ovócitos e células do cumulus	34
4.4.2 Extração do RNA e transcrição reversa (RT)	34
4.4.3 PCR em tempo real (qPCR)	35

4.5 Análise Estatística	37
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÕES	47
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Capítulo 2	
2.1 - Folículo sendo dissecado da córtex ovariana com o uso de pinças	31
2.2 - A) Mensuração de folículo >8,0 mm em estereomicroscópio utilizando uma ocular graduada. B) Folículos dissecados das várias categorias de tamanho folicular; 1= $\geq 8,1$ mm; 2= 6,1-8,0 mm; 3= 3,1-6,0 mm; 4= 1,0-3,0 mm.	32
2.3 - 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 transcrito do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do transcrito do gene referência; ΔCP_{alvo} é desvio de CT do controle – amostra do gene alvo transcrito; ΔCP_{ref} é desvio de CT do controle – amostra do gene referência transcrito	36
2.4 - Nível de transcritos da H1Foo, H2A, H3A, SLBP, GHR, OOSP1, BMP15 e GDF9 analisados por PCR em tempo real em ovócitos bovinos em vesícula germinativa recuperados de diferentes tamanhos de folículos (1,0-3,0; 3,1-6,0; 6,1-8,0 e ≥ 8.1 mm). Cada grupo foi analisado utilizando-se cinco (1,0-3,0 e 3,1-6,0 mm) ou quatro (6,1-8,0 e ≥ 8.1 mm) pools de diferentes réplicas. Os dados (média \pm EPM) foram normalizados pelo gene CYC-A e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta Ct$ com correção da eficiência	40
2.5 - Nível de transcritos do FSHR, EGFR, GHR, PTX3 e IGFII analisados por PCR em tempo real nas células do cumulus de bovinos recuperadas de diferentes tamanhos de folículos (1,0-3,0; 3,1-6,0; 6,1-8,0 e ≥ 8.1 mm). Cada grupo foi analisado utilizando-se cinco (1,0-3,0 e 3,1-6,0 mm) ou quatro (6,1-8,0 e ≥ 8.1 mm) pools de diferentes réplicas. Os dados (média \pm EPM) foram normalizados pelo gene CYC-A e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta Ct$ com correção da eficiência	41

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Capítulo 2	
2.1 - Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores, tipo celular analisado, tamanho do fragmento amplificado em pb (pares de base) e temperatura de anelamento	36
2.2 - Diâmetro dos ovócitos oriundos dos diferentes grupos de folículos	38
2.3 - Desenvolvimento embrionário dos ovócitos de diferentes tamanhos de folículos	39

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA** = análise de variância
- AREG** = anfiregulina
- BMP15** = proteína morfogênica óssea 15
- BTC** = betacelulina
- CAP** = meio de lavagem de sêmen
- COCs** = complexos cumulus-ovócitos
- COX2** = cicloxigenase 2
- ct** = ciclo *threshold*
- CYC-A** = ciclofilina A
- D** = Dia
- DNA** = ácido desoxirribonucléico
- DNase** = enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
- EGFR** = receptor do fator de crescimento epidermal
- EREG** = epiregulina
- F** = *primer forward*
- FEC** = meio de fecundação
- EPM** = erro padrão da média
- FSHR** = receptor do hormônio folículo estimulante
- GDF9** = fator de crescimento e diferenciação 9
- GHR** = receptor do hormônio do crescimento
- GPCRs** = receptores acoplados a proteína G
- GVBD** = quebra da vesícula germinativa
- H1Foo** = histona H1 específica do ovócito
- H2A** = histona H2A
- H3A** = histona H3A
- HAS2** = hialurona sintetase 2
- HB-EGF** = fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina
- IGF-II** = fator de crescimento semelhante a insulina-II
- MIV** = meio de maturação
- OOSP1** = proteína secretada pelo ovócito 1
- P450scc** = citocromo P450 colesterol *side-chain cleavage*

pb = pares de base

PBS = solução salina em tampão fosfato

PHE = penicilamina, hipotaurina, epinefrina

pi = pós-inseminação

PIV = produção *in vitro*

PKA = proteína kinase A

PKC = proteína kinase C

PTX3 = Pentraxina 3

R = *primer reverse*

RNA = ácido ribonucléico

RNA_m = ácido ribonucléico mensageiro

RT = transcrição reversa

RT-PCR = reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase

SFB = Soro Fetal Bovino

SLBP = *stem-loop binding protein*

TGF α = fator de crescimento transformante α

TGF β = fator de crescimento transformante β

TMZ = transição materno-zigótica

SO_f_{aaci} = Fluido Sintético de Oviduto

TSG6 = proteína indutora do fator de necrose tumoral- α

RESUMO

EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS

Autor: Ester Siqueira Caixeta

Orientadora: Dra. Margot Alves Nunes Dode

O sucesso das várias técnicas de reprodução assistida depende da competência do ovócito. Entretanto, os fatores envolvidos na sua aquisição e as características moleculares de um ovócito competente não são completamente conhecidos. Com o objetivo de avaliar genes relacionados com a competência do ovócito foi quantificado o nível de transcritos de genes candidatos em ovócitos (H1Foo, H2A, H3A, GHR, GDF9, BMP15, OOSP1) e nas células do cumulus (FSHR, EGFR, GHR, PTX3, IGF-II) com diferentes níveis de competência. Folículos ovarianos foram dissecados e distribuídos de acordo com seu diâmetro em quatro grupos: (1) 1,0 a 3,0 mm; (2) 3,1 a 6,0 mm; (3) 6,1 a 8,0 mm; (4) $\geq 8,1$ mm. Os complexos cumulus-ovócitos (COCs) foram liberados, classificados morfológicamente, maturados, fecundados e cultivados *in vitro*, ou desnudados para a mensuração do diâmetro do ovócito. Os ovócitos em estágio de vesícula germinativa desnudados e suas células do cumulus correspondentes foram utilizados para análise de expressão gênica por RT-qPCR. A taxa de blastocistos foi maior nos ovócitos recuperados de folículos >6 mm, que nos outros dois grupos, confirmando que o tamanho folicular é um bom modelo para o estudo da competência. Nos ovócitos, somente os transcritos da H2A aumentaram gradualmente de acordo com o tamanho do folículo, sendo maior ($P < 0,05$) nos ovócitos originados de folículos $\geq 8,1$ mm do que naqueles menores que 6,0 mm. Dos cinco genes avaliados nas células do cumulus, três (FSHR, EGFR, GHR) mostraram diferença no nível de RNAm, aumentando de

acordo com o tamanho folicular. Com base nos resultados, foi confirmada a implicação crítica da H2A no desenvolvimento da competência. Além disso, foram identificados genes importantes nas células do cumulus, os quais estão associados com a competência do ovócito e podem refletir a sua qualidade.

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

ABSTRACT

EXPRESSION OF CANDIDATE GENES FOR BOVINE DEVELOPMENTAL OOCYTE COMPETENCE

Author: Ester Siqueira Caixeta

Adviser: Dra. Margot Alves Nunes Dode

The success of the various assisted reproductive techniques depends on oocyte competence. However, the factors involved on its acquisition and the molecular attributes of competent oocyte are generally unknown. In an attempt to assess genes related with oocyte competence we quantify transcripts for candidate genes in oocytes (H1Foo, H2A, H3A, GHR, GDF9, BMP15, OOSP1) and cumulus cells (FSHR, EGFR, GHR, PTX3, IGF-II) of different levels of competence. Follicles were dissected and distributed according to their diameter into 4 groups: (1) 1.0 to 3.0 mm; (2) 3.1 to 6.0 mm; (3) 6.1 to 8.0 mm; (4) ≥ 8.1 mm. The COCs were released, morphologically classified, matured, fertilized and cultured *in vitro* or denuded for diameter measurements. The denuded germinal vesicle oocytes and their correspondent cumulus cells were used for gene expression analysis by RT-qPCR. Blastocyst rate was higher for the oocytes recovered from follicles >6 mm than the other two groups, confirming that follicles size is a good model to study competence. In the oocyte, only H2A transcript increased gradually according to follicle size, being greater ($P < 0.05$) in oocyte originated from follicles ≥ 8.1 mm than those lower than 6.0 mm. Of the 5 genes evaluated in the cumulus cells, 3 (FSHR, EGFR and GHR) showed differences in mRNA level, increasing according to follicular size. In conclusion, we confirmed the critical implication of H2A on developmental competence, and identify important genes in cumulus cells which are associated with oocyte competence and can reflect its quality.

Key words: gene expression, oocyte, cumulus cell

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da técnica de produção *in vitro* (PIV) de embriões tem sido possível explorar cada vez mais o potencial reprodutivo das fêmeas. Porém, mesmo com todos os avanços alcançados nos últimos anos, pouco incremento nas taxas de produção foi obtido, mantendo uma média de 25-40% de embriões viáveis após a maturação e fecundação *in vitro* de ovócitos selecionados (Farin et al., 2007). A PIV consiste de três fases distintas e interdependentes, a maturação, a fecundação e o cultivo embrionário. Vários relatos na literatura indicam que os ovócitos maturados *in vivo* são mais competentes do que os ovócitos maturados *in vitro* (van de Leemput et al., 1999; Rizos et al., 2001; Farin et al., 2007), indicando a importância da maturação ovocitária nesse processo.

Na maturação ocorrem mudanças nucleares e citoplasmáticas que conferem ao ovócito a capacidade de dar origem a uma nova vida. Ela ocorre espontaneamente quando os ovócitos são removidos de seus folículos, sendo que vários fatores podem interferir no sucesso da maturação, tais como a qualidade do ambiente folicular, tamanho do folículo de origem (Lonergan et al., 1994; Machatkova et al., 2004; Lequarre et al., 2005; Racedo et al., 2008), morfologia do complexo cumulus-ovócito (Lonergan et al., 2003) e principalmente a competência ovocitária. Sendo que somente ovócitos competentes podem sofrer maturação completa e ter desenvolvimento embrionário normal (Dode, 2006).

A competência do ovócito, portanto, se refere à sua capacidade de ser fecundado e de formar um embrião viável, que por sua vez, depende da presença de informações específicas na forma de RNAm ou proteínas. Desde a retomada da meiose até a transição materno-zigótica (TMZ), a transcrição ocorre em um nível muito baixo, por isso os ovócitos necessitam ter estoques de proteínas e RNAm para suprir as necessidades durante a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (Lequarre et al., 2005; Mourot et al., 2006; Racedo et al., 2008). Se estas informações estão ausentes ou são insuficientes,

podem ocorrer falhas na maturação nuclear ou citoplasmática, ou em ambas, prejudicando o desenvolvimento subsequente.

Apesar de alguns genes terem sido identificados como relacionados com a competência (Donnison & Pfeffer, 2004; Fair et al., 2004; Dode et al., 2006; Racedo et al., 2008), os mecanismos pelos quais o ovócito adquire essa competência ainda não são conhecidos. Uma das alternativas para se tentar elucidar esses mecanismos é a utilização de um modelo que permita avaliar ovócitos com diferentes graus de competência e identificar as diferenças entre eles.

Está clara a existência de uma relação entre o tamanho do folículo e a qualidade do ovócito em termos de morfologia e grau de competência, sendo que ovócitos derivados de grandes folículos têm um maior potencial de desenvolvimento do que ovócitos vindos de pequenos folículos, gerando uma melhor produção de embriões *in vitro* (Hagemann et al., 1999; Machatkova et al., 2004; Lequare et al., 2005). Por outro lado, também existe uma correlação entre o diâmetro do ovócito e tamanho do folículo e, conseqüentemente com a capacidade de desenvolvimento (Fair, 2003; Gandolfi et al., 2005). Devido a este fato, o tamanho do folículo se tornou um modelo interessante para avaliação dos mecanismos relacionados à competência. Desta forma, a quantificação do nível de expressão gênica em ovócitos e células do cumulus provenientes de folículos de diferentes tamanhos forneceria informações relevantes, pois a identificação das principais mudanças relacionadas à expressão de genes importantes durante a aquisição da competência nos proporcionaria um tipo de “mapa molecular” para cada um desses genes em cada fase.

Essas informações nos permitiriam entender melhor os eventos que ocorrem nesse período fundamental para o futuro do ovócito. Além disso, tais conhecimentos podem contribuir na identificação de alterações necessárias para que o sistema *in vitro* possa ser o mais semelhante possível do *in vivo*, e com isso aumentar a disponibilidade de ovócitos e melhorar os resultados e a qualidade dos embriões produzidos por técnicas de reprodução assistida.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar o padrão de expressão de genes candidatos para a aquisição da competência em ovócitos e células do cumulus oriundos de diferentes tamanhos de folículos em bovinos.

1.2 Objetivos Específicos

a) Comparar o tamanho dos ovócitos oriundos de folículos de diferentes tamanhos e avaliar o desenvolvimento embrionário desses ovócitos;

b) Quantificar a expressão dos genes histona H1 específica do ovócito (H1Foo), histona H2A (H2A), histona H3A (H3A), *stem-loop binding protein* (SLBP), receptor do hormônio do crescimento (GHR), fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9), proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) e proteína secretada pelo ovócito 1 (OOSP1) em ovócitos imaturos de diferentes tamanhos de folículos;

c) Quantificar a expressão dos genes receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR), receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), receptor do hormônio do crescimento (GHR), Pentraxina 3 (PTX3) e fator de crescimento semelhante a insulina-II (IGF-II) nas células do cumulus de diferentes tamanhos de folículos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento do Folículo e do Ovócito

Diferente dos espermatozóides, os quais são continuamente gerados a partir da puberdade, a fêmea tem uma população finita de ovócitos que estão presentes no ovário desde o seu nascimento (Austin & Short, 1982). Os ovócitos presentes em um ovário adulto originam-se a partir de um número definido de células germinativas primordiais que são formadas no epitélio do saco vitelínico do embrião. Estas células migram do saco vitelínico para as cristas genitais e colonizam as gônadas em formação (Farin et al., 2007).

A ovogênese e a foliculogênese são processos distintos, porém interdependentes. Na ovogênese ocorre a formação, crescimento e maturação do gameta feminino. O processo se inicia durante a vida fetal (Austin & Short, 1982; Haper, 1994; Fair, 2003), quando as células germinativas primordiais se diferenciam em ovogônias, que se proliferam por mitoses antes do nascimento e então entram em meiose, tornando-se um ovócito primário, que inicialmente, fica retido no estágio prófase I (Austin & Short, 1982).

Portanto, no nascimento os ovócitos estocados nos ovários encontram-se no estágio de prófase da primeira divisão meiótica e necessitam da ação hormonal na puberdade para a retomada e finalização da meiose I e uma correta maturação citoplasmática (Hafez & Hafez, 2004; Wang & Sun, 2007).

A foliculogênese em bovinos, também começa durante a vida fetal. Logo após a formação dos ovócitos, eles tornam-se circundados por uma simples camada de células epiteliais achatadas, formando o folículo primordial (Austin & Short, 1982; Fair, 2003; Farin et al., 2007). Logo que o estoque de folículos primordiais é estabelecido, inicia-se o crescimento que ocorre somente em um grupo de folículos. O crescimento folicular é um

processo contínuo durante a vida reprodutiva (Austin & Short, 1982). Os folículos que entram na fase de crescimento passam a ser chamados de folículos primários, que se caracterizam pelo ovócito rodeado por uma completa camada de células cubóides (Fair, 2003). Progressivamente, as células da granulosa do folículo primário aumentam em número e tornam-se mais volumosas originando os folículos secundários (Austin & Short, 1982; Haper, 1994). As células da granulosa começam a sintetizar um fluido que se acumula entre elas, formando o antro inicial e o folículo terciário.

Durante todo este período de desenvolvimento folicular o ovócito permanece retido no estágio de diplóteno da prófase I. Entretanto, o seu crescimento continua, sendo que o volume da célula aumenta, indicando um período de intensa atividade metabólica, na qual ocorrem mudanças ultra-estruturais no ovócito, incluindo o surgimento de algumas novas organelas. O crescimento do ovócito é acompanhado por um aumento no número de mitocôndrias e por mudanças na sua ultra-estrutura, tornando-se altamente vacuolizadas e ovais. Concomitantemente, o complexo de Golgi sofre alterações, que são indicativas de um aumento na sua atividade. Ocorre também um acúmulo de gotículas de lipídeos, que servirão como reserva energética para o futuro embrião. O surgimento da zona pelúcida no espaço perivitelínico também ocorre neste período de crescimento do ovócito. Por último, ocorre a formação dos grânulos corticais, que são pequenas vesículas esféricas que terão a função de provocar o endurecimento da zona pelúcida no momento da fecundação, impedindo a polispermia (Haper, 1994).

O período final do desenvolvimento folicular antral envolve o recrutamento, seleção e dominância. O estímulo para o recrutamento folicular é uma elevação nas concentrações séricas de FSH. Após o recrutamento apenas um folículo é selecionado e passa a exercer dominância sobre os demais ao longo da onda (Fair, 2003).

Se o folículo dominante está presente durante a fase lútea, os altos níveis de progesterona impedem o aumento da frequência dos pulsos de LH e não ocorrerá a ovulação. Ocorrendo a luteólise, as concentrações de progesterona diminuem permitindo um aumento na pulsabilidade de LH, o qual desencadeia a maturação final do folículo e do ovócito, e a ovulação (Sirard et al., 2006).

O folículo pré-ovulatório ainda contém um ovócito primário, que por ação do LH é estimulado a retomar e completar a primeira divisão meiótica, acompanhado pela extrusão do primeiro corpúsculo polar e, subsequente entrada na segunda divisão meiótica. O ovócito no estágio de metáfase da segunda divisão meiótica é então retido pela segunda vez, sendo esse o estágio em que se encontra quando é liberado do folículo na ovulação (Austin &

Short, 1982). O término da maturação meiótica do ovócito é dependente da penetração do espermatozóide durante a fecundação. Quando a região equatorial da cabeça espermática liga-se à membrana vitelínica inicia a ativação do ovócito que induz o término da segunda divisão meiótica e a liberação do segundo corpúsculo polar (Ginther, 1992; Hafez & Hafez, 2004).

Em seguida tem-se a formação dos dois pró-núcleos, masculino e feminino, os quais migram para o centro do ovo e então se fundem, originando um núcleo diplóide e a primeira célula do conceito, o zigoto. Esta fusão, chamada singamia, finaliza a fecundação e estimula o zigoto a iniciar o seu desenvolvimento (Ginther, 1992; Hafez & Hafez, 2004).

2.2 Competência Ovocitária

A competência ovocitária é definida como a habilidade ou potencial de um ovócito passar pela maturação, fecundação e se desenvolver até o estágio de blastocisto (Donnison & Pfeffer, 2004; Farin et al., 2007). Apesar dos avanços nas condições de cultivo durante a maturação de ovócitos, a competência para o desenvolvimento nos ovócitos maturados *in vivo* é maior do que nos maturados *in vitro* (van de Leemput et al., 1999; Rizos et al., 2001; Farin et al., 2007). Em bovinos, aproximadamente 60-80% dos ovócitos obtidos de folículos maturados *in vivo* são competentes para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, comparado com somente 25-40% dos ovócitos maturados *in vitro* (Farin et al., 2007). Essa competência é progressivamente adquirida durante os estágios finais da foliculogênese, através de várias alterações celulares e moleculares que proporcionam ao ovócito capacidade para o desenvolvimento embrionário após a fecundação (Dode, 2006).

A partir do momento que ovócitos imaturos são removidos de seus folículos, eles necessitam ser competentes para completar não só a maturação nuclear, mas também a maturação citoplasmática. Ovócitos competentes para completar a maturação nuclear podem mostrar diferenças na sua habilidade em se desenvolver até o estágio de blastocisto, e isto pode ser atribuído à diferenças no seu status de maturação citoplasmática e molecular (Donnison & Pfeffer, 2004).

Existe uma correlação evidente entre o tamanho do folículo e a competência do ovócito. Tem sido demonstrado em vários trabalhos (Lonergan et al., 1994; Blondin & Sirard, 1995; Hagemann et al., 1999; Machatkova et al., 2004; Lequare et al., 2005; Feng et al., 2007;

Racedo et al., 2008) que ovócitos provenientes de folículos maiores têm maior potencial de desenvolvimento que os de folículos menores. Por outro lado, também existe uma correlação entre o diâmetro do ovócito e tamanho do folículo e, conseqüentemente com a capacidade de desenvolvimento (Fair, 2003; Gandolfi et al., 2005). Portanto, a utilização de ovócitos de diferentes tamanhos de folículos permitiria avaliar ovócitos de diferentes graus de competência (Mourot et al., 2006).

Um aspecto importante durante o crescimento do ovócito é seu alto grau de atividade transcricional, portanto, mudanças moleculares podem ser responsáveis pelo aumento na competência de ovócitos. Essas mudanças envolvem síntese, degradação e modificações de RNAm e proteínas, favorecendo o ovócito com o estoque molecular necessário para o desenvolvimento a partir da maturação meiótica, fecundação, até o momento da ativação do genoma embrionário no estágio de 8-16 células no embrião bovino (Donnison & Pfeffer, 2004; Song & Wessel, 2005). A transcrição materna diminui marcadamente antes do final da maturação do ovócito, quando o folículo tem em torno de 3 mm (Fair, 2003). A partir deste ponto a transcrição continua em um nível bem menor, implicando que as proteínas e transcritos que foram estocados não são substituídas, pelo contrário, são gradualmente traduzidas ou degradadas até a TMZ, de forma a suprir as necessidades da fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (Mourot et al., 2006).

Portanto, a competência do ovócito também pode ser determinada pela quantidade de RNAm transcritos de origem materna que são estocados durante o crescimento e fase final da foliculogênese. Estes estoques podem ser diferentes quando são comparados ovócitos competentes e incompetentes, sendo essa diferença uma alternativa para identificação de genes marcadores da competência ovocitária (Dode et al., 2006; Racedo et al., 2008).

Esforços para identificar genes potenciais para a competência ovocitária em bovinos utilizando populações com diferentes graus de competência têm sido realizados com ovócitos de diferentes tamanhos de folículos (Donnison & Pfeffer, 2004; Mourot et al., 2006; Nemcova et al., 2006; Racedo et al., 2008) e ovócitos que clivam em diferentes momentos após a fecundação (Robert et al., 2000; Fair et al., 2004; Dode et al., 2006). A maioria desses genes candidatos têm sido selecionados devido a suas funções na fecundação, desenvolvimento inicial, metabolismo, regulação da expressão de genes e proteínas, comunicação intercelular e proteção contra estresse oxidativo (Mourot et al., 2006).

Apesar de alguns genes já terem sido identificados como relacionados à competência, os mecanismos envolvidos na mesma e a fase do desenvolvimento folicular em

que ela ocorre, não são conhecidos (Dode et al., 2006). Da mesma forma, ainda não se tem um consenso sobre que gene ou genes pode ser utilizado como marcadores.

2.3 Genes Selecionados

Estudos avaliando a expressão diferencial de genes em ovócitos de diferentes tamanhos de folículos demonstraram que o RNAm da H2A aumentou gradualmente a partir de folículos de 5,0 mm, sendo maior nos folículos maiores que 8,0 mm (Mourot et al., 2006). Além disso, quando foram utilizados embriões que clivaram prematuramente e tardiamente após a fecundação, como representantes de ovócitos competentes e incompetentes, respectivamente, foi observado que a H2A (Dode et al., 2006) e H3A (Fair et al., 2004) foram mais expressas em embriões que clivaram mais cedo.

As histonas são proteínas nucleares que se associam ao DNA para formar a cromatina, sendo os principais componentes protéicos da mesma. A estrutura básica da cromatina é o nucleossoma, e seu DNA está associado a um octômero de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e à uma molécula de histona H1 que se associa externamente ao DNA que envolve o octômero. As histonas são fundamentais para a divisão celular e também são necessárias para substituir as protaminas durante a descondensação do DNA dos espermatozoides após sua penetração no ovócito (Andrade & Jordão, 2000). Porém, as histonas não são somente proteínas estruturais, elas são também fundamentais, através de modificações por acetilação e fosforilação, para o controle da expressão gênica (McGraw et al., 2006), ativação do genoma, metilação do DNA e inativação do cromossomo X no desenvolvimento embrionário inicial (Fair et al., 2004). Nas células somáticas os níveis de RNAm de histonas estão relacionados com a replicação do DNA e não têm capacidade de estocar a proteína. Já os ovócitos, estocam as histonas na forma de RNAm e de proteínas, para serem utilizadas no desenvolvimento embrionário inicial (Dode et al., 2006).

A partir do início da maturação até a TMZ duas divisões meióticas e três a quatro replicações de DNA ocorrem sem nenhuma nova transcrição de histonas, por isso, uma grande quantidade de RNAm e proteínas maternas precisam ser estocadas (Mourot et al., 2006). Portanto, as histonas são críticas desde o momento da maturação e fecundação, sendo que níveis deficientes podem afetar a clivagem e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário (Dode et al., 2006).

Da mesma forma, quando folículos de diferentes tamanhos foram utilizados, foi observado um aumento na expressão da SLBP em ovócitos competentes, quando comparado com os incompetentes (Donnison & Pfeffer, 2004). A SLBP é uma proteína que tem uma importante função na estabilização, ativação e tradução de RNAm de histonas durante a maturação do ovócito e após a fecundação. Ela exerce sua função biológica através de sua ligação na região *stem-loop* dos RNAm das histonas. Assim como nas histonas, a dinâmica de síntese e degradação da SLBP difere bastante em ovócitos e embriões iniciais, comparado com as células somáticas (Allard et al., 2002). Ocorre um acúmulo da proteína SLBP durante a maturação meiótica, o qual se inicia logo após a quebra da vesícula germinativa, e regula a síntese de histonas (Donnison & Pfeffer, 2004).

Em camundongos, a manipulação da quantidade de SLBP em ovócitos afetou o acúmulo de RNAm de histonas H3 e H4. A deficiência no acúmulo de SLBP durante a ovogênese foi associada com a queda da fertilidade, sendo que a maioria dos embriões tiveram seu desenvolvimento interrompido no estágio de duas células. Provavelmente, essa interrupção no desenvolvimento foi devido à insuficiência de histonas (Arnold et al., 2008). Sendo assim, o acúmulo de RNAm da SLBP pode ser considerado um parâmetro importante para a aquisição da competência, visto que a regulação das histonas é essencial para o remodelamento da cromatina, que ocorre após a fecundação (Donnison & Pfeffer, 2004; Allard et al., 2005).

Mais recentemente foi relatada a existência de uma histona H1 específica de ovócitos, a H1Foo, uma proteína na qual a expressão é restrita ao crescimento e maturação do ovócito e ao desenvolvimento embrionário inicial (Tanaka et al., 2003; Gao et al., 2004; Tanaka et al., 2005; McGraw et al., 2006). Os transcritos da H1Foo aparecem pela primeira vez em ovócitos de folículos primordiais, sendo detectado um grande aumento em ovócitos de folículos primários e secundários (Tanaka et al., 2005). A proteína da H1Foo foi detectada em ovócitos de folículos secundários, e durante todo o crescimento e maturação dos ovócitos (Tanaka et al., 2003; Tanaka et al., 2005). Após a fecundação ocorre uma diminuição na expressão da H1Foo, sendo quase nula no estágio embrionário de duas células, e não mais detectada até o estágio de oito células, no camundongo (Tanaka et al., 2003). No embrião bovino o RNAm da H1Foo ainda é detectado no estágio de 8-16 células, porém em uma quantidade muito pequena (McGraw et al., 2006). Esses resultados sugerem que os transcritos de H1Foo são de origem materna e seu desaparecimento coincide com o início da ativação do genoma embrionário (Tanaka et al., 2003; Gao et al., 2004).

Tem sido proposto que a H1Foo pode ter a função de controle da expressão gênica durante a ovogênese e embriogênese inicial. A H1Foo contém na sua região 3'UTR uma seqüência de hexanucleotídeo poliadenilado (AAUAAA), a qual é necessária para que ocorra a poliadenilação citoplasmática que é conhecida por regular o estoque materno de RNAm, induzindo a tradução através de um aumento no comprimento da cauda polyA durante a maturação do ovócito. Mais investigações das possíveis funções da H1Foo ainda são necessárias (Tanaka et al., 2005; McGraw et al., 2006).

Todos estes estudos indicam a importância das histonas nos eventos após a fecundação e a necessidade do ovócito de ter estoque adequado de RNAm para essas proteínas.

Fatores intraovarianos derivados da camada da teca, das células granulosa e do ovócito desempenham papéis importantes no estímulo ou inibição das funções celulares durante o desenvolvimento folicular ovariano (Spicer et al., 2008). Entre estes fatores intraovarianos estão o GDF9 e a BMP15. O GDF9 e a BMP15 são dois membros da superfamília de fatores de crescimento transformante β (TGF β), que são expressos pelos ovócitos e têm funções essenciais no início do crescimento folicular, sendo importantes no desenvolvimento das células da granulosa, diferenciação e expansão das células do cumulus, na taxa de ovulação e fertilidade em mamíferos (Wu & Matzuk, 2002; Juengel et al., 2004; Su et al., 2004; Zhu et al., 2008).

A administração exógena de GDF9 e BMP15 em sistemas de cultivo influencia o crescimento de células somáticas foliculares e a maturação de ovócitos (Zhu et al., 2008). Em sistemas de cultivo, o GDF9 promoveu a proliferação de células da granulosa, supressão da expressão do receptor de LH (LHR) nas células da granulosa e o estímulo da expressão de genes envolvidos na expansão e mucificação das células do cumulus e na ovulação, como a hialurona sintetase 2 (HAS2) e a cicloxigenase 2 (COX2), nas células do cumulus de camundongos. Ovócitos de camundongos com deficiência de BMP15 e GDF9 passam pela quebra da vesícula germinativa (GVBD) e atingem o estágio de metáfase II, porém o desenvolvimento embrionário é prejudicado, indicando que a expressão do GDF9 e BMP15 em ovócitos é necessária para uma completa maturação citoplasmática (Su et al., 2004). Nos ovinos, tanto o GDF9 como o BMP15 são essenciais para o crescimento folicular normal e para uma melhor taxa de ovulação (Juengel et al., 2004).

Recentemente uma nova proteína secretada pelo ovócito foi encontrada em camundongos, a OOSP1. Em camundongos a sua expressão é ovócito específica no ovário, porém a OOSP1 foi detectada também no baço (Yan et al., 2001). Em bovinos a OOSP1 é

expressa exclusivamente em ovócitos, sendo maior no estágio de vesícula germinativa e diminuindo gradualmente durante o desenvolvimento embrionário inicial, até não serem mais detectadas no estágio de blastocisto, indicando que os transcritos da OOSP1 são de origem materna, diminuem durante o desenvolvimento embrionário e não são ativados após a TMZ (Tremblay et al., 2006).

Existe uma relação íntima e interdependente entre as células do cumulus e o ovócito, formando uma unidade funcional necessária para que haja crescimento folicular e ovocitário adequados (Gandolfi et al., 2005; Zhang et al., 2005; Farin et al., 2007). As células do cumulus são células da granulosa especializadas e estão ligadas ao citoplasma através de pequenas junções que permitem a passagem de moléculas na forma direta ou indireta através da ligação em seus receptores celulares. Portanto, esta comunicação bidirecional entre as células do cumulus e o ovócito durante o crescimento e maturação é essencial para uma completa competência ovocitária (Gandolfi et al., 2005; Dode, 2006), sendo importante considerar as células do cumulus quando se estuda a competência do ovócito.

Desta forma, estudos de expressão gênica nas células do cumulus de diferentes populações de ovócitos permitem o melhor conhecimento da regulação do crescimento e maturação do ovócito e também podem gerar marcadores moleculares relacionados ao potencial de desenvolvimento dos ovócitos.

Tem sido demonstrado que os hormônios FSH, GH e EGF têm efeito benéfico na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos e que sua ação no ovócito se dá após sua ligação a receptores presentes nas células do cumulus (Simone et al., 1997; Bevers & Izadyar, 2002; Oyamada et al., 2004; Conti et al., 2006).

O FSH é o hormônio central na reprodução dos mamíferos, necessário para o desenvolvimento gonadal e maturação na puberdade e para a produção de gametas durante a fase fértil da vida. Junto com o LH, esta gonadotrofina é produzida e secretada pela hipófise como uma glicoproteína altamente heterogênea (Simone et al., 1997; Wu & Tian, 2007). Na fêmea a expressão do FSHR é estritamente gonadal e altamente célula-específica, sendo localizados nas células da granulosa (Simone et al., 1997). O FSH desempenha uma função importante na aquisição da competência em ovócitos bovinos, e esta função está associada primariamente com seu efeito no crescimento folicular *in vivo*. Foi mostrado que fêmeas de camundongo *knockout* (FSH β *-/-*) são inférteis devido a incapacidade de continuar a foliculogênese após o estágio antral inicial, além disso, o *knockout* do FSHR levou a um distúrbio no ciclo estral, problemas anovulatórios e infertilidade (Sirard et al., 2007).

In vivo o FSH participa na proliferação das células da granulosa na fase pré antral inicial, previne a atresia folicular, induz a síntese de LHR e a expressão de hormônios esteróides, assim como a expressão de RNAm da citocromo P450 colesterol *side-chain cleavage* (P450scc) em bovinos, suínos, humanos e camundongos. Além de estimular a expressão de fatores esteroidogênicos nas células da granulosa, o FSH é também considerado um dos fatores mais importantes no processo de seleção do folículo, através do controle da esteroidogênese. O FSH desempenha essas funções através de cascatas de sinalização que induz a expressão gênica nas células da granulosa de proteínas kinase A (PKA) e C (PKC), que estão relacionadas com a competência dos ovócitos (Sirard et al., 2007).

A função do FSH na competência ovocitária está bem estabelecida *in vitro*. O FSH é muito usado em vários protocolos de maturação *in vitro*, uma vez que ele tem um efeito positivo na expansão das células do cumulus e melhora a taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário (Calder et al., 2003; Ali & Sirard, 2005; Sirard et al., 2007). A ação do FSH na maturação do ovócito é mediada através das células do cumulus. O RNAm do FSHR está presente nas células da granulosa e células do cumulus, mas não é detectado em ovócitos desnudos de folículos antrais bovinos (Calder et al., 2003; Sirard et al., 2007). Tem sido mostrado que o FSH, através da ligação em seus receptores nas células do cumulus, induz a secreção de substâncias estáveis que se difundem e de uma forma parácrina e estimulam a retomada da meiose em ovócitos inclusos nas células do cumulus, mas não em ovócitos desnudos. O co-cultivo de células do cumulus e ovócitos desnudos com FSH não induz a GVBD, sugerindo que além da presença do FSHR nas células do cumulus, o contato íntimo entre essas células e o ovócito é essencial para a retomada da meiose (Byskov et al., 1997).

Portanto, a aquisição de FSHR é essencial para a diferenciação das células da granulosa e para a maturação folicular *in vivo*, assim como para a expansão das células do cumulus e melhor desenvolvimento embrionário *in vitro*. Devido as suas funções importantes na sinalização celular e crescimento folicular, o nível de expressão do RNAm do FSHR nas células do cumulus pode ser um importante marcador para a competência ovocitária. Calder et al. (2003) detectaram uma maior abundância de RNAm do FSHR em complexos cumulus-ovócitos (COCs) de melhor qualidade (Grau 1 e 2), comparado com os COCs de qualidade inferior (Grau 3), indicando que diferenças na sinalização do FSH entre qualidades variáveis de COCs podem refletir a variação no seu grau de desenvolvimento da competência.

Estudos têm demonstrado que o GH é um importante regulador da função ovariana estimulando o desenvolvimento folicular *in vivo* e *in vitro*. É conhecido que o GH

tem um efeito supressivo na apoptose, afeta a esteroidogênese nas células da granulosa e também desempenha um efeito benéfico na maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro* (Kolle et al., 2003). A presença de GH durante a maturação do ovócito acelera a maturação nuclear e os eventos citoplasmáticos, induz a expansão das células do cumulus e melhora a capacidade de desenvolvimento de ovócitos maturados, aumentando o índice de formação de blastocistos após a fecundação *in vitro* (Izadyar et al., 1998; Kolle et al., 1998). Porém estes efeitos só ocorrem na presença das células do cumulus, indicando que as ações promotoras do GH na maturação do ovócito são exercidas através de GHR presentes nessas células. O RNAm para o GHR foi encontrado nas células da granulosa, células do cumulus e em ovócitos de folículos antrais médios. Já, o RNAm para o GH está presente somente nas células murais da granulosa e em ovócitos imaturos e maduros de folículos maiores que 2 mm de diâmetro, coincidindo com o início da aquisição da competência (Izadyar et al., 1998; Bevers & Izadyar, 2002).

A presença da proteína do GH no ovócito e nas células do cumulus, e de seu RNAm em ovócitos e células da granulosa, apontam para a síntese do hormônio pelo próprio ovócito e pelas células da granulosa. Estas observações sugerem uma regulação autócrina e/ou parácrina do GH no crescimento folicular bovino e na maturação do ovócito. Porém, alguns autores acreditam que a maioria das ações do GH sejam mediadas pelo IGF I, que é secretado por vários tecidos em resposta ao GH. Recentemente, foi proposto em bovinos que o efeito do GH na maturação do ovócito ocorre através de uma ação direta do próprio hormônio, e não um processo mediado pelo IGF I, desde que a adição de um anticorpo direto contra o IGF I não afetou o efeito estimulatório na maturação nuclear e o grau de expansão das células do cumulus. Existem também fortes evidências de que ocorra uma sinalização via AMPc na indução da maturação pelo GH (Bevers & Izadyar, 2002; Kolle et al., 2003). Entretanto, é questionável se esses achados refletem uma função regulatória do GH na maturação dos ovócitos *in vivo* e ainda permanece muito controverso esse possível efeito direto do GH no ovário (Bevers & Izadyar, 2002).

O EGF foi um dos primeiros fatores de crescimento a ser identificado em mamíferos. Ele possui uma atividade mitótica promotora de crescimento e tem suas propriedades bem caracterizadas. Nos anos 70 foi sugerido por Gospodarowicz e Bialecki (apud Conti et al., 2006) que o EGF agiria no folículo estimulando a replicação das células da granulosa, indicando o seu envolvimento no crescimento folicular. Ao longo dos anos, tem sido notado que o EGF desempenha funções no crescimento e diferenciação dos folículos ovarianos e na esteroidogênese (Conti et al., 2006). O EGF é somente um dos membros da

grande família de proteínas que incluem o fator de crescimento transformante α (TGF α), o fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina (HB-EGF), a anfiregulina (AREG), a epiregulina (EREG), a betacelulina (BTC) e as neuregulinas (Park et al., 2004; Conti et al., 2006).

O EGF tem influência positiva na maturação *in vitro* de ovócitos através de uma melhora na expansão das células do cumulus, na taxa de maturação nuclear dos ovócitos, na taxa de fecundação e no desenvolvimento embrionário pós-fecundação, aumentando a taxa de expansão e eclosão dos blastocistos. Tem sido sugerida também uma função fisiológica do EGF na maturação citoplasmática de ovócitos bovinos. O EGF também desencadeia a esteroidogênese nas células da granulosa e células do cumulus, aumentando, portanto os níveis de progesterona, testosterona e estradiol (Lonergan et al., 1996; Gall et al., 2004; Oyamada et al., 2004). O EGF pode atuar sozinho ou interagir com outras gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento para desempenhar seus efeitos na maturação dos ovócitos. Desde que o fluido folicular contém significativa quantidade de EGF (Lonergan et al., 1996; Gall et al., 2004), todos esses achados sugerem que o EGF deve ser um dos fatores foliculares de maior responsabilidade na estimulação da maturação citoplasmática e nuclear dos ovócitos (Lonergan et al., 1996).

Em vista disso, a suplementação com EGF no meio de maturação tem sido utilizada com o intuito de melhorar a taxa de blastocistos e o desenvolvimento embrionário (Oyamada et al., 2004). Porém, o EGF não pode desencadear diretamente a maturação de ovócitos desnudos, sugerindo que o EGFR nas células do cumulus são requeridos para que ele desempenhe suas funções (Conti et al., 2006). O EGF liga-se especificamente ao seu receptor de membrana (EGFR) para ativar a cascata da proteína quinase ativadora de mitose (MAPK) e o fator promotor de meiose (MPF) que são essenciais para a maturação dos ovócitos mamíferos (Oyamada et al., 2004).

O EGFR também atua como sinalizador central dos eventos mediados pelo LH. A ligação do LH ao seu receptor, um membro da superfamília de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), localizados nas células da teca e células da granulosa estimula uma sinalização via AMPc, resultando na ativação dos fatores de crescimento semelhantes ao EGF (anfiregulina, epiregulina e betacelulina). Essas moléculas solúveis dos fatores de crescimento semelhantes ao EGF ligam-se aos EGFR nas células da granulosa e células do cumulus e estimulam a produção de esteróides e outros fatores que promovem a retomada da meiose, a maturação do ovócito e expansão das células do cumulus (Oyamada et al., 2004; Ashkenazi et al., 2005; Jamnongjit et al., 2005; Conti et al., 2006). Portanto, esses fatores funcionam como

mediadores parácrinos dos efeitos do LH (Park et al., 2004; Ashkenazi et al., 2005). Os fatores semelhantes ao EGF induzem também a expressão da COX2, da proteína indutora do fator de necrose tumoral- α (TSG6) e da HAS2 em camundongos, genes críticos para o remodelamento da matriz no COC e para a ruptura do folículo *in vivo* (Ashkenazi et al., 2005; Conti et al., 2006).

Ashkenazi e colaboradores (2005) mostraram que através da inibição específica do EGFR houve um bloqueio dos efeitos do LH e da retomada da meiose, aumentando a proporção de ovócitos em vesícula germinativa em camundongos. O tratamento também diminuiu a expressão de genes associados com a expansão das células do cumulus e a porcentagem de ovulação estimulada pelo LH ou hCG *in vivo*.

Em cabras foi demonstrada a presença do EGFR em todos os estágios de desenvolvimento folicular. Sua expressão aumentou durante o crescimento do folículo, sendo, portanto associado com a competência para retomar e completar a meiose. Isto sugere que a aquisição da competência meiótica pode estar correlacionada com a expressão de EGFR (Gall et al., 2004).

Outros genes expressos nas células do cumulus, como a PTX3 têm sido identificados como proteínas essenciais para a formação e estabilidade da matriz do cumulus. A síntese de PTX3 é aumentada em uma variedade de tipos celulares em resposta a sinais inflamatórios primários. A PTX3 também aumenta em células do cumulus de camundongos e humanos no momento que precede a ovulação (Scarchilli et al., 2007). Camundongos com deficiência de PTX3 apresentaram instabilidade na matriz do cumulus e infertilidade das fêmeas (Zhang et al. 2005; Scarchilli et al., 2007).

A PTX3 foi descrita em humanos como sendo positivamente relacionada com a competência ovocitária e tem sido indicada como marcador para essa característica. Zhang et al. (2005), encontraram um aumento na expressão da PTX3 nas células do cumulus de ovócitos que se desenvolveram em embriões de 8 células no dia 3 após a fecundação, indicando que a abundância do RNAm da PTX3 nas células do cumulus está altamente associada com o desenvolvimento do ovócito em humanos.

Os IGFs são fatores de crescimento semelhante à insulina ou somatomedinas e são produzidos pela maioria dos tecidos, tendo capacidade de atuar por via endócrina, assim como por mecanismos parácrino e/ou autócrino (Hafez & Hafez, 2004). 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 IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6 e por enzimas de inativação (IGFBPase) das IGFBPs. As proteínas ligadoras de baixo peso molecular (IGFBP-

2, -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).

Webb et al. (2004) afirmaram que esses fatores produzidos localmente no ovário, têm papel importante no estágio inicial do desenvolvimento folicular. Entretanto, ainda existem muitas contradições devido à grande variedade de dados publicados, os quais demonstram a presença RNAm de IGF-I apenas nas células da granulosa (Yuan et al., 1996) ou em ambas, células da granulosa e da teca (Hastie & Haresign, 2006), ou ainda nas células do cumulus (Nuttinck et al., 2004), enquanto Armstrong et al. (2002) não detectaram RNAm de IGF-I nem em células da granulosa nem em células da teca. A presença do RNAm de IGF-II foi detectada por alguns autores apenas nas células da teca (Yuan et al., 1996; Hastie & Haresign, 2006), ou também nos ovócitos (Yaseen et al., 2001). Além disso, Yuan et al. (1998) também mostraram que a maioria dos folículos não recrutados apresentavam expressão de RNAm para IGFBP-2, sugerindo que o destino dos folículos que possuem RNAm para IGFBP-2 seja a atresia e citam que as células da granulosa de folículos pré-antrais expressam RNAm de ambos IGFBP-2 e receptor tipo I de IGF. Dessa forma, qualquer alteração nos componentes do sistema IGF pode afetar potencialmente o desenvolvimento folicular.

Já foi claramente demonstrada a importância dos IGFs para os estágios iniciais do desenvolvimento folicular (Buratini, 2006). Os IGFs são considerados potentes agentes mitogênicos, que estimulam a diferenciação e proliferação celular, podem atuar de maneira benéfica na esteroidogênese (Hastie & Haresign, 2006) e desempenhar um papel importante no desenvolvimento embrionário precoce (Yaseen et al., 2001). A adição de IGF-I ou II no meio de cultivo resultou em uma melhora na maturação de ovócitos bovinos e no desenvolvimento embrionário (Yaseen et al., 2001). Hastie & Haresign (2006) enfatizaram a importância do IGF-II como o principal IGF intra-ovariano em ovinos, devido a sua função na proliferação de pequenos folículos antrais, diferenciação celular e na esteroidogênese, estando associado com o aparecimento de receptores para LH nas células da teca.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A.; SIRARD, M.A. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction**, v.130, p.303-310, 2005.

ALLARD, P., CHAMPIGNY, M. J., SKOGGARD S, ERKMANN, J. A., WHITFIELD, M.L., MARZLUFF, W. F., CLARKE, H. J. Stem-loop binding protein accumulates during oocyte maturation and is not cell-cycle-regulated in the early mouse embryo. **Journal of Cell Science**, v.115, p.4577-4586, 2002.

ALLARD, P.; YANG, Q.; MARZLUFF, W.F.; CLARKE, H.J. The stem-loop binding protein regulates translation of histone mRNA during mammalian oogenesis. **Developmental Biology**, v.286, p.195-206, 2005.

ANDRADE, C.G.T.; JORDÃO, B.Q. O núcleo da célula. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000. p.141-197.

ARMSTRONG, D. G., BAXTER, G., HOGG, C. O., WOAD, K. J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. **Reproduction**, v.123, p.789-797, 2002.

ARNOLD, D. R., FRANÇON, P., ZHANG, J., MARTIN, K., CLARKE, H. J. Stem-loop binding protein expressed in growing oocytes is required for accumulation of mRNAs encoding histones H3 and H4 and for early embryonic development in the mouse. **Developmental Biology**, v.313, p.347-358, 2008.

ASHKENAZI, H., CAO, X., MOTOLA, S., POPLIKER, M., CONTI, M., TSAFRIRI, A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v.146, p.77-84, 2005.

AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Germ cells and fertilization: Reproduction in mammals:1**. 2.ed. Ed. Cambridge: New York, 1982. 177p.

BEVERS, M.M.; IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.197, p.173-178, 2002.

- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.54-62, 1995.
- BYSKOV, A.G.; ANDERSEN, C.Y.; HOSSAINI, A.; GUOLIANG, X. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.296-305, 1997.
- BURATINI Jr, J. Foliculogênese em bovinos. In: 2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2006, Londrina. **Anais...** Londrina, 2006.
- CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N.; SMITH, L. C.; WATSON, A. J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-12, 2003.
- CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v.20, p. 715-723, 2006.
- DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: XXI ENCONTRO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 34, 2006, Araxá. **Anais...** Araxá: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, p.115-129, 2006.
- 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**, v.73, p.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**, v.71, p.1813-1821, 2004.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.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**, v.67, p.136-144, 2004.
- FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.97-112, 2007.
- FENG, W.G.; SUI, H.S.; HAN, Z.B.; CHANG, Z.L.; ZHOU, P.; LIU, D.J.; BAO, S.; TAN, J.H. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: A study using the well-in-drop culture system. **Theriogenology**, v.67, p.1339-1350, 2007.
- 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.

GALL, L.; CHENE, N.; DAHIREL, M.; RUFFINI, S.; BOULESTEIX, C. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, p.439-445, 2004.

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 Technique**, v.24, p.413-423, 2005.

GAO, S.; CHUNG, Y.G.; PARSEGHIAN, M.H.; KING, G.J.; ADASHI, E.Y.; LATHAM, K.E. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. **Developmental Biology**, v.266, p.62-75, 2004.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2.ed. Ed. Equiservices: Madison, Wisconsin, 1992. 642p.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7.ed. Ed. Monole: São Paulo, 2004. 513p.

HAGEMANN, L.J.; BEAUMONT, S.E.; BERG, M.; DONNISON, M.J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A.J.; SCHURMANN, A.; TERVIT, H.R. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.451-458, 1999.

HAPER, M.J.K. Gamete and zygote transport. In: KNOBIL, E.; NEILL, D.J. **The physiology of reproduction**. v.1, 2.ed. Ed. Raven press: New York, 1994. p.123-187.

HASTIE, P. M.; HARESIGN, W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.92, p.284-299, 2006.

IZADYAR, F.; HAGE, W.J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. The promontory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, p.444-453, 1998.

JAMNONGJIT, M.; GILL, A.; HAMMES, S.R. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, p.16257-16262, 2005.

JUENGEL, J.L.; BODENSTEINER, K.J.; HEATH, D.A.; HUDSON, N.L.; MOELLER, C. L.; SMITH, P.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H.; SAWYER, H.R.; MCNATTY, K.P. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.447-460, 2004.

KOLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.59, p.836-842, 1998.

KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of Connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1584-1589, 2003.

LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v.63, p.841-859, 2005.

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; LANGENDONCKT, A.V.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1420-1429, 1996.

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**, v.37, p.48-53, 1994.

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 Animals**, v.38, p.259-267, 2003.

MCGRAW, S.; VIGNEAULT, C.; TREMBLAY, K.; SIRARD, M.A. Characterization of linker histone H1FOO during bovine *in vitro* embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.692-699, 2006.

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**, v.61, p.329-335, 2004.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; 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**, v.73, p.1367-1379, 2006.

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**, v.65, p.1254-1264, 2006.

NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v.27, p.179-195, 2004.

OYAMADA, T.; IWAYAMA, H.; FUKUI, Y. Additional effect of epidermal growth factor during *in vitro* maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. **Zygote**, v.12, p.143-150, 2004.

PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.C.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v.303, p.682-684, 2004.

RACEDO, S.E.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; SALAMONE, D.; NIEMANN, H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.17-25, 2008.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002.

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**, v.57, p.167-175, 2000.

SCARCHILLI, L.; CAMAIONI, A.; BOTTAZZI, B.; NEGRI, V.; DONI, A.; DEBAN, A.B.; SALVATORI, G.; MANTOVANI, A.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI, A. PTX3 interacts with inter- α -trypsin inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.30161-30170, 2007.

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v.18, p.739-773, 1997.

SIRARD, A.M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.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**, v.68, p.71-76, 2007.

SONG, J.L.; WESSEL, G.M. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. **Differentiation**, v.73, p.1-17, 2005.

SPICER, L.J.; AAD, P.Y.; ALLEN, D.T.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A.H.; HSUEH, A.J. Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. **Biology of Reproduction**, v.78, p.243-253, 2008.

SU, Y.Q.; WU, X.; BRIEN, M.J.O.; PENDOLA, F.L.; DENEGRE, J.N.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.J. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. **Developmental Biology**, v.276, p.64-73, 2004.

TANAKA, M.; KIHARA, M.; MECZEKALSKI, B.; KING, G.J.; ADASHI, E.Y. H1 α : a pre-embryonic H1 linker histone in search of a function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.202, p. 5-9, 2003.

TANAKA, M.; KIHARA, M.; HENNEBOLD, J.D.; EPPIG, J.J.; VIVEIROS, M.M.; EMERY, B.R.; CARRELL, D.T.; KIRKMAN, N.J.; MECZEKALSKI, B.; ZHOU, J.; BONDY, C.A.; BECKER, M.; SCHULTZ, R.M.; MISTELI, T.; FUENTE, R.D.L.; KING,

G.J.; ADASHI, E.Y. H1FOO is coupled to the initiation of oocytic growth. **Biology of Reproduction**, v.72, p.135-142, 2005.

TREMBLAY, K.; VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MORIN, G.; SIRARD, M.A. Identification and characterization of a novel bovine oocyte-specific secreted protein gene. **Gene**, v.375, p.44-53, 2006.

VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C.; BEVERS, M.M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; DIELEMANA, S.J. Improvement of in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers treated for superovulation with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v.52, p.335-349, 1999.

WANG, Q.; SUN, Y.Q. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.1-12, 2007.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ASRMSTRONG, D.G. Control of follicular interactions and nutritional influences. **Journal Animal Science**, v.82, p.63-74, 2004.

WU, X.; MATZUK, M.M. GDF-9 and BMP-15: Oocyte organizers. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v.3, p.27-32, 2002.

WU, J.; TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle in vitro. **Zygote**, v.15, p.233-240, 2007.

YAN, C.; PENDOLA, F.L.; JACOB, R.; LAU, A.L.; EPPIG, J.J.; MATZUK, M.M. Oosp1 encodes a novel mouse oocyte-secreted protein. **Genesis**, v.31, p.105-110, 2001.

YASEEN, M.A.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. **Reproduction**, v.122, p.601-610, 2001.

YUAN, W.; LUCY, M.C.; SMITH, M.F. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1045-1054, 1996.

YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H.; YOUNGQUIST, R.; LUCY, M. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v.15, p.55-63, 1998.

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**, v.83, p.1169-1179, 2005.

ZHU, G.; GUO, B.; PAN, D.; MU, Y.; FENG, S. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.275-283, 2008.

**CAPÍTULO 2 – EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA AQUISIÇÃO DA
COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

1 RESUMO

O sucesso das várias técnicas de reprodução assistida depende da competência do ovócito. Entretanto, os fatores envolvidos na sua aquisição e as características moleculares de um ovócito competente não são completamente conhecidos. Com o objetivo de avaliar genes relacionados com a competência do ovócito foi quantificado o nível de transcritos de genes candidatos em ovócitos (H1Foo, H2A, H3A, GHR, GDF9, BMP15, OOSP1) e nas células do cumulus (FSHR, EGFR, GHR, PTX3, IGF-II) com diferentes níveis de competência. Folículos ovarianos foram dissecados e distribuídos de acordo com seu diâmetro em quatro grupos: (1) 1,0 a 3,0 mm; (2) 3,1 a 6,0 mm; (3) 6,1 a 8,0 mm; (4) $\geq 8,1$ mm. Os complexos cumulus-ovócitos (COCs) foram liberados, classificados morfológicamente, maturados, fecundados e cultivados *in vitro*, ou desnudados para a mensuração do diâmetro do ovócito. Os ovócitos em estágio de vesícula germinativa desnudados e suas células do cumulus correspondentes foram utilizados para análise de expressão gênica por RT-qPCR. A taxa de blastocistos foi maior nos ovócitos recuperados de folículos >6 mm, que nos outros dois grupos, confirmando que o tamanho folicular é um bom modelo para o estudo da competência. Nos ovócitos, somente os transcritos da H2A aumentaram gradualmente de acordo com o tamanho do folículo, sendo maior ($P<0,05$) nos ovócitos originados de folículos $\geq 8,1$ mm do que naqueles menores que 6,0 mm. Dos cinco genes avaliados nas células do cumulus, três (FSHR, EGFR, GHR) mostraram diferença no nível de RNAm, aumentando de acordo com o tamanho folicular. Com base nos resultados, foi confirmada a implicação crítica da H2A no desenvolvimento da competência. Além disso, foram identificados genes importantes nas células do cumulus, os quais estão associados com a competência do ovócito e podem refletir a sua qualidade.

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

2 ABSTRACT

The success of the various assisted reproductive techniques depends on oocyte competence. However, the factors involved on its acquisition and the molecular attributes of competent oocyte are generally unknown. In an attempt to assess genes related with oocyte competence we quantify transcripts for candidate genes in oocytes (H1Foo, H2A, H3A, GHR, GDF9, BMP15, OOSP1) and cumulus cells (FSHR, EGFR, GHR, PTX3, IGF-II) of different levels of competence. Follicles were dissected and distributed according to their diameter into 4 groups: (1) 1.0 to 3.0 mm; (2) 3.1 to 6.0 mm; (3) 6.1 to 8.0 mm; (4) ≥ 8.1 mm. The COCs were released, morphologically classified, matured, fertilized and cultured *in vitro* or denuded for diameter measurements. The denuded germinal vesicle oocytes and their correspondent cumulus cells were used for gene expression analysis by RT-qPCR. Blastocyst rate was higher for the oocytes recovered from follicles >6 mm than the other two groups, confirming that follicles size is a good model to study competence. In the oocyte, only H2A transcript increased gradually according to follicle size, being greater ($P<0.05$) in oocyte originated from follicles ≥ 8.1 mm than those lower than 6.0 mm. Of the 5 genes evaluated in the cumulus cells, 3 (FSHR, EGFR and GHR) showed differences in mRNA level, increasing according to follicular size. In conclusion, we confirmed the critical implication of H2A on developmental competence, and identify important genes in cumulus cells which are associated with oocyte competence and can reflect its quality.

Key words: gene expression, oocyte, cumulus cell

3 INTRODUÇÃO

A avaliação morfológica do ovócito baseada no número e compactação das células do cumulus e homogeneidade do citoplasma tem sido rotineiramente utilizada como um critério de seleção para a qualidade do ovócito (de Wit et al., 2000; Stojkovic et al., 2001; Lonergan et al., 2003). Entretanto, a avaliação morfológica por si só é insuficiente para distinguir ovócitos competentes que têm a habilidade de levar uma gestação à termo (Lonergan et al., 2003; Coticchio et al., 2004; Krisher, 2004). Assim, uma seleção mais rigorosa de ovócitos competentes é fundamental para melhorar o sucesso das diversas técnicas de reprodução assistida, bem como fornecer ferramentas adequadas para o estudo da competência.

Uma característica bem conhecida no desenvolvimento do ovócito em mamíferos é a necessidade de acumular, durante a foliculogênese, todos os fatores maternos necessários para os eventos pós-fecundação (Donnison & Pfeffer, 2004; Lequarre et al., 2005; Song & Wessel, 2005). Portanto, existe um consenso de que a competência do ovócito pode estar relacionada com a abundância de transcritos específicos, que foram estocados durante o crescimento do ovócito e fase final da foliculogênese (Robert et al., 2000; Gandolfi & Gandolfi, 2001; Maddox-Hyttel et al., 2005; Sirard et al., 2006). Estas informações sugerem que diferenças entre ovócitos competentes e incompetentes podem estar relacionadas com um padrão diferencial de expressão gênica. Apesar de alguns genes já terem sido identificados como relacionados com a 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 sua aquisição não são totalmente conhecidos. Portanto, a caracterização molecular é necessária não somente para elucidar como os ovócitos adquirem a competência, mas também para proporcionar importantes marcadores moleculares relacionados com a capacidade de

desenvolvimento. Uma abordagem que pode ser utilizada na investigação desses mecanismos é a comparação de ovócitos com diferentes níveis de competência.

Está clara a relação existente entre o tamanho folicular e a competência do ovócito, sendo que aqueles ovócitos obtidos de folículos maiores são mais competentes *in vitro* que ovócitos oriundos 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). Além disso, existe também uma correlação entre o diâmetro do ovócito e o seu potencial de desenvolvimento (Fair, 2003; Gandolfi et al., 2005).

Ovócitos bovinos recuperados de folículos de 2-3 mm possuem uma menor taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto do que aqueles oriundos de folículos maiores que 6 mm (Pavlok et al., 1992; Lonergan et al., 1994; Hagemann et al., 1999; Machatkova et al., 2004; Kauffold et al., 2005; Lequarre et al., 2005). Coincidentemente, os ovócitos bovinos completam sua fase de crescimento em um folículo de aproximadamente 3 mm (Fair et al., 1995), o qual corresponde ao tamanho em que o folículo se torna responsivo ao FSH e em que ocorre emergência da onda folicular. A transcrição diminui marcadamente quando os folículos atingem 3 mm e o ovócito permanece transcricionalmente quiescente (Fair et al., 1995; Fair, 2003; Baran et al., 2004). Portanto, o RNAm que foi previamente estocado deve conduzir o desenvolvimento até a ativação do genoma embrionário (Memili & First, 2000). A diminuição da maior parte da atividade transcricional do ovócito em um determinado tamanho do folículo e sua relação com o baixo potencial de desenvolvimento sugere que ovócitos de folículos menores não tenham alcançado o estoque completo de RNAm requerido para o desenvolvimento posterior (Donnison & Pfeffer, 2004). Além disso, o baixo nível de transcrição que continua no ovócito após o folículo atingir 3 mm (Mourot et al., 2006) pode estar relacionado com o aumento na sua competência que ocorre à medida que o folículo se aproxima do estágio pré-ovulatório. Portanto, ovócitos provenientes de folículo de diferentes tamanhos podem ser utilizados como modelo para o estudo da competência.

Durante a foliculogênese, o ovócito adquire primeiro a competência meiótica e então, a competência para o desenvolvimento, sendo essa aquisição, em parte direcionada pelas células somáticas circundantes (Tanghe et al., 2002). As células do cumulus mantêm uma cooperação metabólica com os ovócitos, na qual fatores parácrinos e moléculas de baixo peso molecular mediam um diálogo entre eles. Esta comunicação bidirecional é um fator determinante para que o ovócito possa atingir a completa maturação (Gandolfi et al., 2005). Considerando que as células do cumulus estão intimamente conectadas ao ovócito através das junções gap durante o desenvolvimento folicular e ovulação (Gilchrist et al., 2004; Pangas &

Matzuk, 2005), a análise dessas células pode fornecer informações importantes relacionadas à aquisição da competência pelos ovócitos. Além disso, as células do cumulus são uma fonte promissora de marcadores para prever a qualidade do ovócito.

Na tentativa de identificar genes associados com competência foi utilizado o modelo do tamanho folicular e avaliado a expressão de oito genes nos ovócitos (H1Foo, H2A, H3A, SLBP, GHR, GDF9, BMP15, OOSP1) e cinco genes nas células do cumulus (FSHR, EGFR, GHR, PTX3, IGFII). Os genes foram selecionados baseados no seu potencial envolvimento na competência ovocitária, já relatado na literatura (Bever & Izadyar, 2002; Calder et al., 2003; Donnison & Pfeffer, 2004; Fair et al., 2004; Gall et al., 2004; Zhang et al., 2005; Dode et al., 2006; McGraw et al., 2006; Tremblay et al., 2006). Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar a abundância de transcritos dos genes selecionados em ovócitos e células do cumulus com diferentes graus de competência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

Para a realização deste experimento foram utilizados ovários de fêmeas bovinas Nelores obtidos em abatedouro local. Os folículos foram dissecados e classificados de acordo com a qualidade e o tamanho, sendo recuperados em cada manipulação todas as categorias de tamanhos. Os COC's recuperados dos diferentes tamanhos de folículos foram utilizados em três etapas diferentes, sendo uma a avaliação do diâmetro dos ovócitos, outra a produção *in vitro* (PIV) dos COC's, e a última, o armazenamento dos ovócitos e das células do cumulus para análise de expressão gênica. Para a avaliação do diâmetro foram utilizados 60 ovócitos de cada grupo. Na PIV foram utilizados no mínimo 80 COC's de cada tamanho de folículo, e para a expressão gênica foram armazenados 4 ou 5 pools de 20 ovócitos e suas células do cumulus correspondentes para cada categoria de folículos.

4.2 Recuperação, Classificação e Mensuração dos Ovócitos

Os ovários de fêmeas bovinas Nelore (*Bos indicus*) 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 - 100 ug/ml – Sigma, Sto Louis MO, USA), à temperatura de 35 a 37°C.

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

com saís de Hank's suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino ([SFB] – Gibco BRL, Burlington, ON, Canada), sobre placa aquecedora à 36°C durante todo o processo de dissecação (Figura 2.1). Posteriormente os folículos foram mensurados utilizando-se uma ocular graduada (*micrometer eyepiece* OSM-4® Olympus, Tokyo, Japan), classificados morfológicamente e distribuídos de acordo com o diâmetro em quatro grupos: 1,0-3,0; 3,1-6,0; 6,1- 8,0 e $\geq 8,1$ mm (Figura 2.2 A e B). Os critérios utilizados para a seleção do folículo foram a presença de uma vascularização extensiva e fina e um aspecto translúcido e brilhante de forma homogênea. Após a ruptura do folículo foram observadas e também utilizadas para seleção a presença de células da granulosa com um aspecto regular e saudável (Blondin & Sirard, 1995) e ausência de partículas flutuantes no fluido folicular (de Wit et al., 2000). Cada complexo cumulus-ovócito (COC) foi liberado por ruptura dos folículos e classificado de acordo com o aspecto e distribuição das células do cumulus e uniformidade do citoplasma. Somente os ovócitos classificados como Grau 1 (COCs 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 estudo.

Para a mensuração dos ovócitos, os COCs foram desnudados por repetidas pipetagens e o diâmetro avaliado com a ocular graduada *micrometer eyepiece*, excluindo a zona pelúcida.

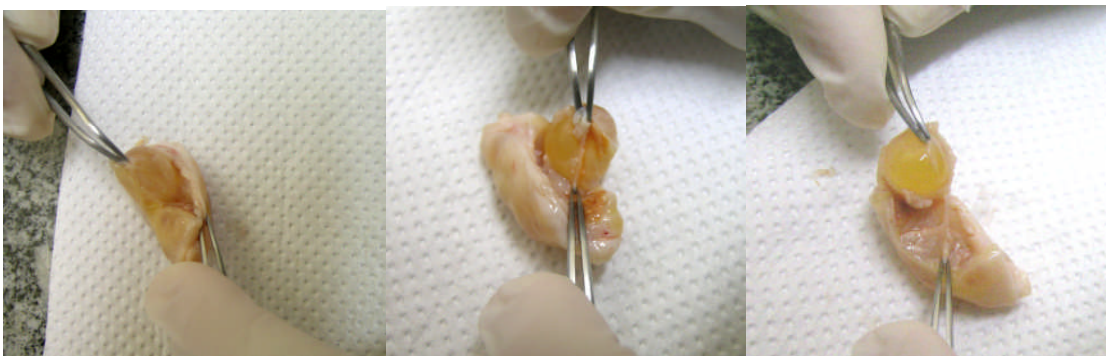


Figura 2.1 - Folículo sendo dissecado da córtex ovariana com o uso de pinças.

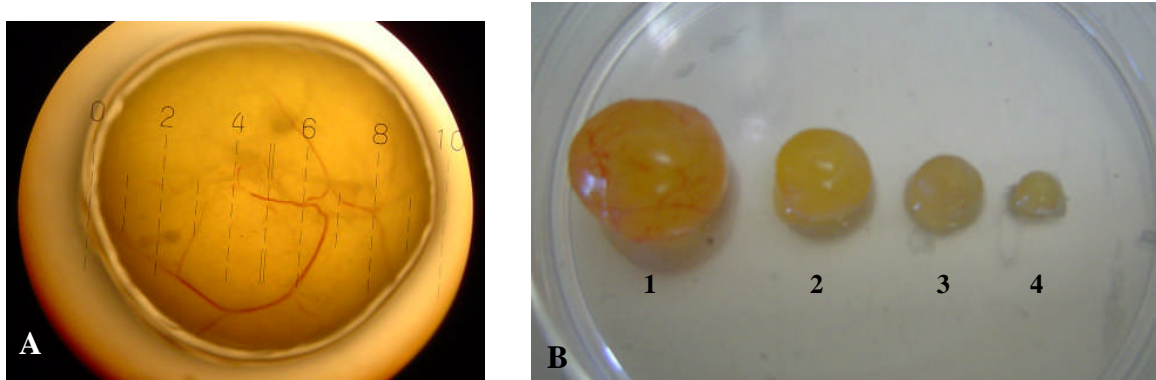


Figura 2.2 - A) Mensuração de folículo $>8,0$ mm em estereomicroscópio utilizando uma ocular graduada. B) Folículos dissecados das várias categorias de tamanho folicular; 1= $\geq 8,1$ mm; 2= 6,1-8,0 mm; 3= 3,1-6,0 mm; 4= 1,0-3,0 mm.

4.3 Produção *In vitro* de Embriões (PIVE)

Os meios utilizados em todas as etapas da produção *in vitro* de embriões foram produzidos pela Nutricell® Nutrientes Celulares Ltda (Campinas, SP, Brasil).

4.3.1 Maturação *in vitro*

Os ovócitos selecionados de cada categoria de folículos foram lavados em meio de maturação (MIV®) suplementado com 10% de SFB e então, transferidos para gotas de 50 μ l (quando colocados até 10 ovócitos) ou gotas de 100 μ l (quando colocados 11 a 20 ovócitos) do mesmo meio MIV®, cobertas com óleo mineral. As gotas contendo os COCs foram incubadas em atmosfera umidificada por 24h a 39°C com 5% CO₂. Foram utilizados no mínimo 80 ovócitos de cada grupo na produção *in vitro* de embriões.

4.3.2 Fecundação *in vitro*

Para a fecundação foi utilizado sêmen congelado de touro da raça Nelore, previamente testado para o sistema de PIV. O sêmen foi selecionado por gradiente de Percoll 90 e 45% (Parrish et al., 1995), centrifugado a 700g durante 20 minutos. Após a passagem pelo Percoll, o sêmen foi lavado em meio de lavagem de sêmen (CAP®) por centrifugação e o *pellet* ressuspensionado em meio de fecundação (FEC®), suplementado com 40 µg/ml de PHE (2mM de penicilamina, 1mM de hipotaurina, 250mM de epinefrina) e 10 µg/ml de heparina. A dose inseminante foi ajustada de forma a obter uma concentração final de 1×10^6 /ml.

Os ovócitos foram lavados e transferidos para gotas de meio de fecundação, cobertas com óleo mineral, e então, inseminados. Os espermatozóides e os ovócitos foram co-incubados durante 18h a 39° C com 5% de CO₂, sendo o dia da inseminação *in vitro* considerado Dia (D) zero.

4.3.3 Cultivo *in vitro*

Dezoito horas pós-inseminação (pi), os possíveis zigotos foram parcialmente desnudados através de sucessivas pipetagens e em seguida lavados e transferidos para gotas de meio de cultivo (Fluido Sintético de Oviduto - SOF_{aaci}®) suplementado com 5% SFB, cobertas com óleo mineral e incubados a 39° C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂

O desenvolvimento embrionário foi avaliado pela taxa de clivagem no D2, e produção de blastocistos nos D6, D7 e D8.

4.4 Abundância Relativa dos Transcritos nos Ovócitos e Células do Cumulus

4.4.1 Armazenamento dos ovócitos e células do cumulus

Os ovócitos imaturos classificados como Grau 1 e Grau 2 foram transferidos para uma gota de 50µl de solução salina em tampão fosfato (PBS) onde foram desnudados através de sucessivas pipetagens garantindo a ausência completa de células do cumulus. Após a remoção das células do cumulus os ovócitos intactos e completamente desnudos foram lavados três vezes e congelados em um volume mínimo de PBS.

A gota de 50µl de PBS com as células do cumulus foi transferida para um tubo de 0,2 ml e centrifugada duas vezes por 2 minutos à 700g para lavagem. O sobrenadante foi retirado, sendo adicionado 2µl de PBS ao pellet formado.

No fim do procedimento todos os tubos com os ovócitos e as células do cumulus foram armazenados à -80°C até o momento da extração do RNA. Para cada tamanho de folículo foram estocados quatro ou cinco pools de 20 ovócitos e das células do cumulus correspondentes.

4.4.2 Extração do RNA e transcrição reversa (RT)

O RNA total foi extraído de pools de 20 ovócitos e das células do cumulus correspondentes utilizando o kit RNeasy® (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante e eluído em 30 µL de água livre RNase . Após a extração, as concentrações das amostras de RNA total das células do cumulus foram mensuradas por espectrofotômetro NanoDrop® ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), visto que o número de células do cumulus pode ser variável entre os pools. A concentração de RNA foi nivelada para todos os pools utilizando a amostra com menor quantidade de RNA (50 ng/µl). As amostras de RNA total dos ovócitos não foram quantificadas, uma vez que foi utilizada uma quantidade padronizada de células por pool (20 ovócitos).

Nove microlitros de RNA total foi incubado com DNase I (1U; Invitrogen, São Paulo, Brasil) e então submetidos a reação de transcrição reversa contendo 1µl de

SuperScript III (200U/ μ l; Invitrogen), 1 μ l de primer Oligo-dT (500 μ g/ml), 2 μ l dNTPs (2.5mM cada), 2 μ l DTT (0.1M), 1 μ l RNaseOUT® Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/ μ l; Invitrogen) e 4 μ l de tampão 5X first strand. As reações foram realizadas a 42°C por 15 min, 50°C por 50 min e finalmente, 70° por 15 min para a inativação da enzima.

4.4.3 PCR em tempo real (qPCR)

Para a análise relativa através do PCR em tempo real utilizou-se o protocolo de amplificação do “kit” Power Syber Green Master Mix® (Applied Biosystems). As reações foram realizadas com um volume final de 25 μ l e as condições para a amplificação dos genes foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos (desnaturação: 95°C por 10 seg; temperatura de anelamento [ver Tabela 2.1] por 1 minuto), seguido de curva de dissociação padrão. A seqüência dos primers, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento para cada gene estão apresentados na Tabela 2.1. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi analisada em duplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente.

Os genes GAPDH, Ciclofilina (CYC-A) e Histona (H2A) foram testados através do programa geNorm (Vandesompele et al., 2002) para seleção do controle endógeno mais estável para cada tipo celular analisado. Os resultados indicaram que a CYC-A foi o melhor controle endógeno tanto para os ovócitos como para as células do cumulus.

Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo. A expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência (Pfaffl, 2001; Figura 2.3). A eficiência para cada gene foi calculada através do perfil de amplificação de cada amostra utilizando-se o programa LinRegPCR (Ramakers et al., 2003).

Tabela 2.1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tipo celular analisado, tamanho do fragmento amplificado em pb (pares de base) e temperatura de anelamento

Genes	Sequência	Tipo celular analisado	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento(°C)
CYC-A	F 5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3' R 5'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-3'	Ovócito/Células do cumulu	65	60
GAPDH	F 5'- GCGGTGAACCACGAGAAGTATAA-3' R 5'- CCCTCCACGATGCCAAAGT-3'	Ovócito/Células do cumulus	119	62
H1Foo	F 5'-AGTCGAAGGTCAAAGAAAGAGGGAGC-3' R 5'-TGAACTCTGACTTCCAGGCTGTGT-3'	Ovócito	80	60
H2A	F 5'-GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG-3' R 5'-TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC-3'	Ovócito/Células do cumulus	104	60
H3A	F 5'-GTACAAAGCAGACTGCCCCGAAAAT-3' R 5'-ACCAGGCCTGTAACGATGAGGTTT-3'	Ovócito	128	60
SLBP	F 5'-CAGTCTTGCCACAACCTTCAATC-3' R 5'-ATGGAGCCGATTATGAGAACAC-3'	Ovócito	208	53
OOSP1	F 5'-GCCAAGATTAACCCACACTATTT-3' R 5'-ATAATGAGCATCTGGTGAACGTA-3'	Ovócito	182	56
BMP15	F 5'-GTCAGCAGCCAAGAGGTAGTG-3' R 5'-CCCGAGGACATACTCCCTTAC-3'	Ovócito	360	59
GDF9	F 5'-TGGTCCTTGCTGAAGCATCTAGA-3' R 5'-ACAGTGTTGTAGAGGTGGCTTCT-3'	Ovócito	202	59
GHR	F 5'-AGAGATTCATGCCGACATCC-3' R 5'-CGTTGTCTGGTTCTCACACG-3'	Ovócito/Células do cumulus	210	54
FSHR	F 5'-AGCCCTTGTCACAACCTCTATGTC-3' R 5'-GTTCTCACCGTGAGGTAGATGT-3'	Células do cumulus	105	60
EGFR	F 5'-AAAGTTTGCCAAGGGACAAG-3' R 5'-AAAGCACATTTCTCGGATG-3'	Células do cumulus	253	53
PTX3	F 5'-CCTCAGCTATCGGTCCATAA-3' R 5'-ATTGAAGCCTGTGAGGTCTGC-3'	Células do cumulus	294	54
IGF-II	F 5'-GACCGCGGCTTCTACTTCAG-3' R 5'-AAGAAGTTGCCACGGGGTAT-3'	Células do cumulus	203	54

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 2.3 - 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 relativos à taxa de clivagem e produção de blastocistos foram analisados pelo teste Chi-quadrado. O tamanho dos ovócitos foi comparado pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. O nível de significância considerado foi $P < 0.05$.

O efeito do tamanho do folículo sobre a expressão gênica de ovócitos e células do cumulus foi testado por ANOVA e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey. Os dados foram transformados para logaritmo quando não apresentaram distribuição normal. Quando os valores mesmo que transformados em log não tiveram distribuição normal foi utilizado teste não paramétrico (Kruskall-Wallis). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa JMP (SAS, versão 7.0). Os resultados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (EPM). Foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Para o estudo da expressão de genes relacionados com a competência foram utilizados ovócitos obtidos de diferentes tamanhos de folículos. Para determinar se ovócitos completamente crescidos já estavam presentes em folículos pequenos de fêmeas *Bos indicus*, e confirmar que o modelo utilizado refletia ovócitos com diferentes competências em nosso sistema, um pré-experimento foi realizado. Inicialmente o diâmetro dos ovócitos foi mensurado, e posteriormente foi avaliado o potencial de desenvolvimento dos ovócitos obtidos de diferentes tamanhos de folículos.

Os ovócitos obtidos de folículos de 1,0-3,0 mm foram menores ($P < 0,05$) que aqueles obtidos das outras categorias (Tabela 2.2). Não houve aumento no tamanho do ovócito após o folículo atingir 3,0 mm de diâmetro.

Tabela 2.2 - Diâmetro dos ovócitos oriundos dos diferentes grupos de folículos

Grupo	Tamanho do folículo	Número total de ovócitos	Diâmetro dos ovócitos (média \pm desvio padrão)
1	1,0-3,0 mm	60	124,15 \pm 9,19 μm^a
2	3,1-6,0 mm	60	128,0 \pm 7,41 μm^b
3	6,1-8,0 mm	60	128,20 \pm 6,04 μm^b
4	\geq 8,1 mm	60	129,33 \pm 8,11 μm^b

^{ab} Diferentes letras na mesma coluna indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

O potencial de desenvolvimento dos ovócitos com diferentes competências está apresentado na Tabela 2.3. As taxas de clivagem e blastocistos foram maiores ($P < 0,05$) nos grupos de ovócitos isolados de folículos maiores que 6,0 mm. Apesar da alta taxa de clivagem

($P < 0,05$) observada nos ovócitos oriundos de folículos de 3,1-6,0 mm comparado com grupo de ovócitos provenientes de folículos menores, a taxa de blastocistos foi similar ($P > 0,05$) em ambos os grupos.

Tabela 2.3 – Desenvolvimento embrionário dos ovócitos de diferentes tamanhos de folículos

Grupo	Tamanho do folículo	Ovócitos (N)	Clivagem (%)	Blastocistos		
				D6 (%)	D7 (%)	D8 (%)
1	1,0 - 3,0 mm	96	57 (59%) ^a	14 (15%) ^a	19 (20%) ^a	19 (20%) ^a
2	3,1 - 6,0 mm	183	133 (73%) ^b	47 (26%) ^a	62 (34%) ^a	62 (34%) ^a
3	6,1 - 8,0 mm	81	70 (86%) ^c	40 (49%) ^b	50 (62%) ^b	51 (63%) ^b
4	≥ 8,1 mm	107	93 (87%) ^c	50 (47%) ^b	64 (60%) ^b	64 (60%) ^b

^{abc} Diferentes letras na mesma coluna indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

Dos oito genes analisados nos ovócitos somente a H2A diferiu entre os grupos (Figura 2.4). A abundância relativa de transcritos da H2A aumentou de acordo com o tamanho do folículo, sendo maior ($P < 0,05$) em ovócitos obtidos de folículos $\geq 8,1$ mm do que nos menores que 6,0 mm. O grupo de folículos com diâmetro de 6,1-8,0 mm apresentou uma expressão intermediária desde que os níveis de RNAm foram similares a ambos os grupos, $< 6,0$ mm e $\geq 8,1$ mm. Não foram observadas alterações nos níveis de transcritos para os genes H1Foo, H3A, SLBP, GDF9, BMP15, OOSP1 e GHR ($P > 0,05$).

Nas células do cumulus, a abundância de três (FSHR, GHR e EGFR) dos cinco genes analisados variou de acordo com o tamanho do folículo ($P < 0,05$) (Figura 2.5). A expressão do FSHR foi menor em folículos de 1,0-3,0 mm comparado com os folículos $\geq 8,1$ mm. A expressão desse gene nos grupos de folículos de tamanho intermediário (3,1-6,0 e 6,1-8,0) não diferiu dos outros grupos. Um modelo similar de expressão foi observado para o gene EGFR, exceto que as células do cumulus provenientes de folículos de 6,1-8,0 mm mostraram um aumento significativo no nível de RNAm comparado com o grupo de folículos de 1,0-3,0 mm. A abundância relativa de transcritos para o gene GHR aumentou gradualmente nas células do cumulus de acordo com o tamanho do folículo, sendo a maior expressão detectada em folículos maiores e a menor, em folículos menores. Os outros dois genes, PTX3 e IGF-II não mostraram diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

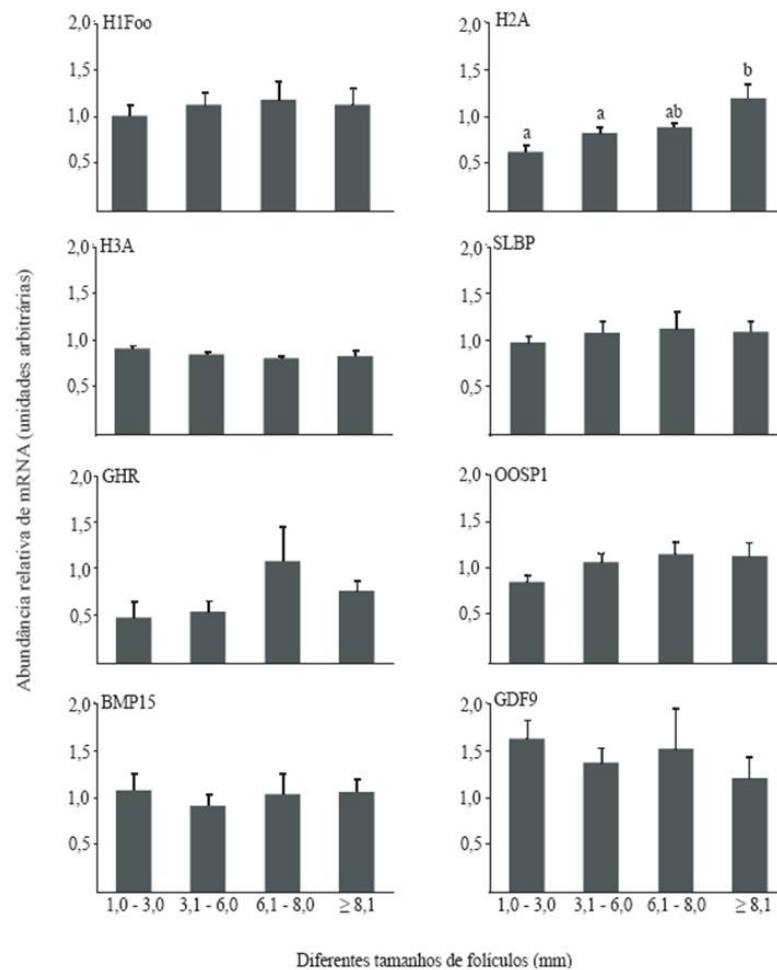


Figura 2.4 - Nível de transcritos da H1Foo, H2A, H3A, SLBP, GHR, OOSP1, BMP15 e GDF9 analisados por PCR em tempo real em ovócitos bovinos em vesícula germinativa recuperados de diferentes tamanhos de foliculos (1,0-3,0; 3,1-6,0; 6,1-8,0 e \geq 8,1 mm). Cada grupo foi analisado utilizando-se cinco (1,0-3,0 e 3,1-6,0 mm) ou quatro (6,1-8,0 e \geq 8,1 mm) pools de diferentes réplicas. Os dados (média \pm EPM) foram normalizados pelo gene CYC-A 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 ($P < 0,05$).

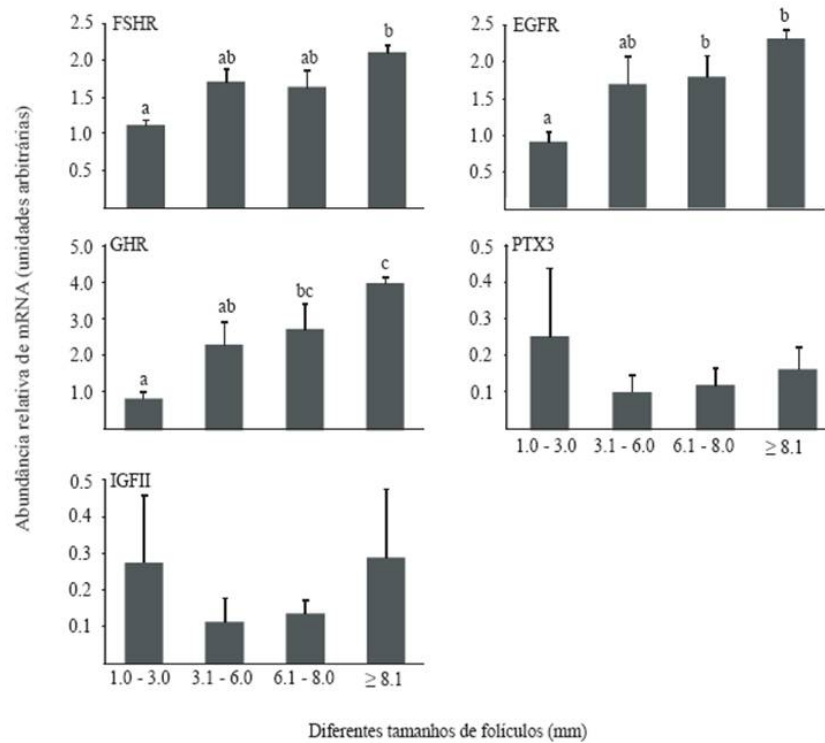


Figura 2.5 - Nível de transcritos do FSHR, EGFR, GHR, PTX3 e IGFII analisados por PCR em tempo real nas células do cumulus de bovinos recuperadas de diferentes tamanhos de folículos (1,0-3,0; 3,1-6,0; 6,1-8,0 e \geq 8,1 mm). Cada grupo foi analisado utilizando-se cinco (1,0-3,0 e 3,1-6,0 mm) ou quatro (6,1-8,0 e \geq 8,1 mm) pools de diferentes réplicas. Os dados (média \pm EPM) foram normalizados pelo gene CYC-A e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência.

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

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi analisada a abundância relativa de genes potencialmente envolvidos na competência do ovócito, utilizando o modelo de diferentes tamanhos de folículos. Este modelo é baseado em uma relação já bem estabelecida entre o tamanho do folículo e a competência para o desenvolvimento dos ovócitos. Entretanto, neste estudo foram utilizadas fêmeas *Bos indicus* como doadoras de ovário, as quais têm sido relatado na literatura apresentar ovários menores (Mutiga et al., 1993), maior número de folículos <5 mm e menor tamanho do folículo pré-ovulatório (Figueiredo et al., 1995; Baruselli et al., 2007) comparado com as fêmeas *Bos taurus*.

Portanto, para confirmar que os ovócitos utilizados apresentavam diferentes níveis de competência, foi realizado um pré-experimento para avaliar o diâmetro dos ovócitos e seu potencial de desenvolvimento. Os resultados mostraram que ovócitos de folículos pequenos apresentaram o menor diâmetro e que não houve alteração no tamanho do ovócito a partir do momento em que os folículos atingiram 3 mm. O grupo de folículos menores, 1,0-3,0 mm, também apresentou uma menor taxa de clivagem, possivelmente por não ter completado o seu crescimento total. Apesar da alta taxa de clivagem observada nos ovócitos oriundos de folículos de 3,1-6,0 mm comparado com os ovócitos provenientes de folículos de 1,0-3,0 mm, a taxa de blastocistos entre eles foi similar ($P > 0,05$). Entretanto, é importante ressaltar que os ovócitos de folículos de 3,1 a 6,0 mm apesar de apresentarem o diâmetro similar comparado com os ovócitos de folículos >6,0 mm, apresentaram uma menor competência para o desenvolvimento. Estes resultados confirmam que outros fatores, além do crescimento completo do ovócito, estão envolvidos na aquisição da competência ovocitária. Portanto, os dados obtidos confirmaram que o tamanho do folículo é um bom modelo para o estudo da competência por fornecer ovócitos com diferentes níveis de competência.

Foi avaliada a expressão de oito genes (H1Foo, H2A, H3A, SLBP, GHR, GDF9, BMP15, OOSP1) nos ovócitos, e cinco genes (FSHR, EGFR, GHR, PTX3, IGFII) nas suas células do cumulus correspondentes, que foram selecionados devido ao seu potencial envolvimento na competência do ovócito.

As histonas são proteínas nucleares responsáveis pela formação da estrutura do nucleossoma, sendo essencial para a divisão celular. Recentemente, uma histona específica de ovócitos (H1Foo), a qual está envolvida no controle da expressão gênica durante a ovogênese e embriogênese inicial tem sido relatada (Tanaka et al., 2003; Gao et al., 2004; Tanaka et al., 2005; McGraw et al., 2006). Outro gene relacionado com as histonas é a SLBP, que desempenha uma importante função no acúmulo e tradução de RNAm das histonas durante a maturação e fecundação do ovócito (Allard et al., 2002; Allard et al., 2005; Arnold et al., 2008).

Neste trabalho o nível de transcritos da H2A aumentou de acordo com o tamanho do folículo, sugerindo que altos níveis contribuem para um maior potencial de desenvolvimento. Apesar de não ter sido observada diferença estatística no nível de expressão da H2A entre os grupos 1, 2 e 3, neste último, a quantidade de transcritos foi semelhante também a do grupo $\geq 8,1$ mm, o que não foi observado para os grupos de 1,0 a 3,0 mm e 3,1 a 6,0 mm. É possível que com um aumento no número de réplicas biológicas essa diferença possa ser evidenciada. Resultados similares aos do presente estudo foram encontrados por Mourot e colaboradores (2006), os quais também utilizaram ovócitos provenientes de diferentes tamanhos de folículos.

A associação da competência do ovócito com altos níveis de H2A (Dode et al., 2006) e H3A (Fair et al., 2004) também foi observada quando o modelo do momento da primeira clivagem foi usado. A função das histonas na competência do ovócito pode ser facilmente explicada, considerando que a partir do início da maturação até a transição materno-zigótica duas divisões meióticas e três a quatro replicações de DNA ocorrem sem nenhuma nova transcrição de histonas, por isso, uma grande quantidade de RNAm e proteínas maternas precisam estar estocadas (Mourot et al., 2006). No presente estudo, apesar da variação observada no nível de RNAm da H2A de acordo com o tamanho do folículo, a abundância de RNAm da H1Foo, H3A e SLBP não foi alterada. Estes resultados indicam que somente a expressão diferencial da H2A pode estar relacionada com a competência. De acordo com Sturm e colaboradores (1988) é comum observar no nucleossoma uma estreita associação entre a H2A e H2B e entre a H3 e H4, sendo a regulação da transcrição diferente

entre esses pares de genes. Estas diferenças podem explicar a variação no modelo de expressão da H2A e H3A observado nos ovócitos obtidos de diferentes tamanhos de folículos.

Considerando-se que a SLBP é um gene importante para o estoque das histonas, foi inesperado não encontrar uma expressão diferencial da SLBP de acordo com o tamanho do folículo. Além disso, Donnison & Pfeffer (2004) mostraram um maior nível de RNAm da SLBP em ovócitos competentes comparado com ovócitos incompetentes também obtidos de diferentes tamanhos de folículos. Entretanto, é importante ressaltar que estes autores utilizaram diferentes tamanhos de folículos, os quais foram aspirados e não dissecados como no presente estudo. Essas diferenças na metodologia podem ser responsáveis pelas dissimilaridades nos resultados. Tem sido relatado que ovócitos em crescimento de camundongos transgênicos com deficiência de SLBP têm o acúmulo das histonas H3 e H4 afetado, mas não o das histonas H2A e H2B (Arnold et al., 2008), refletindo diferentes mecanismos de estoque dessas histonas. De fato, tem sido observado que após a depleção da SLBP, RNAm poliadenilado da H2A foi encontrado em ovócitos (Narita et al., 2007), sugerindo que o processamento normal do RNAm da H2A ocorre mesmo na ausência da SLBP.

Desde que as histonas são críticas nos eventos pós-fecundação, todos esses resultados indicam que níveis deficientes podem afetar a primeira clivagem e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário. É provável que os ovócitos na fase final de crescimento, presentes em folículos pequenos já acumularam a quantidade suficiente de H1Foo, SLPB e H3A, mas não de H2A. Portanto, o acúmulo de H2A pode se prolongar por um período maior em ovócitos completamente crescidos, o que pode ser observado pela sua maior expressão no grupo $\geq 8,1$ mm, comparado ao grupo de 3,1 a 6,0 mm, no qual os ovócitos já atingiram o crescimento total.

Os outros três genes, GDF-9, BMP15 e OOSP1 definidos como genes específicos do ovócito no ovário, não foram afetados pelo tamanho do folículo e tiveram uma expressão similar em ovócitos com diferentes competências. Apesar de esses genes terem um papel essencial na foliculogênese, ovulação, fecundação e desenvolvimento embrionário (Wu & Matzuk, 2002; Juengel et al., 2004; Su et al., 2004; Tremblay et al., 2006; Zhu et al., 2008) parece que a abundância de seus transcritos não desempenha um papel importante no potencial de desenvolvimento dos ovócitos. Além disso, o modelo de expressão do RNAm do GHR também foi similar em todos os tamanhos de folículos. Apesar do RNAm do GHR estar presente nos ovócitos, provavelmente, ele também não está relacionado com o grau de competência do ovócito.

Dos cinco genes avaliados nas células do cumulus, o FSHR, EGFR e GHR foram diferencialmente expressos nas populações recuperadas de vários tamanhos de folículos. O efeito benéfico do FSH, GH e EGF na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos através da ligação em seus receptores nas células do cumulus tem sido bem caracterizado (Calder et al., 2003; Bevers & Izadyar, 2002; Oyamada et al., 2004; Conti et al., 2006).

Considerando que a aquisição do FSHR é essencial para mediar as ações do FSH, as quais são requeridas para a maturação *in vitro* do ovócito, era esperado que os transcritos do FSHR nas células do cumulus de COCs mais competentes fossem mais abundantes. Os resultados obtidos sugerem que diferenças na sinalização do FSH entre os grupos de 1,0 a 3,0 mm e $\geq 8,1$ mm podem refletir a variação existente no desenvolvimento da competência. Calder e colaboradores (2003) também detectaram uma maior abundância de RNAm do FSHR em COCs de melhor qualidade.

Um aumento gradual no nível de RNAm do EGFR de acordo com o tamanho do folículo também foi observado. Resultados similares foram descritos em ovócitos de cabras (Gall et al., 2004). Um aumento no acúmulo de RNAm a medida que o folículo cresce, prepararia o COC para sofrer a maturação completa, e portanto, poderia estar relacionado com a competência ovocitária. Uma função fisiológica do EGFR na maturação citoplasmática tem sido proposta (Oyamada et al., 2004; Conti et al., 2006). Além disso, o EGFR atua como mediador das ações do LH que estimula a liberação dos fatores de crescimento semelhantes ao EGF (anfiregulina, epiregulina, e betacelulina) que se ligam ao EGFR e induzem a retomada da meiose, maturação do ovócito e expansão das células do cumulus (Oyamada et al., 2004; Ashkenazi et al., 2005; Jamnongjit et al., 2005; Conti et al., 2006).

Similar ao FSHR e EGFR, o nível de transcritos do GHR também aumentou de acordo com o tamanho do folículo, sendo maior nas células do cumulus de folículos $\geq 8,1$ mm. A presença do GH no meio acelera a maturação nuclear e citoplasmática, induz a expansão das células do cumulus e melhora a taxa de blastocistos (Izadyar et al., 1998; Kolle et al., 1998; Bevers & Izadyar, 2002; Kolle et al., 2003). Considerando que no ovócito não houve diferença na expressão do GHR em diferentes tamanhos de folículos, é possível que o efeito benéfico do GH no COC ocorra principalmente através das células do cumulus.

Apesar do FSH, EGF e GH atuarem através de mecanismos diferentes na maturação *in vitro*, todos eles melhoram o potencial de desenvolvimento dos ovócitos bovinos agindo através de seus receptores nas células do cumulus. É possível que um sinal positivo possa ser gerado após eles se ligarem aos seus receptores, o qual é transferido para os ovócitos estimulando os mecanismos envolvidos na aquisição da competência. Essa sinalização pode

ter uma importante função na fase final do crescimento folicular. De todos os receptores avaliados nas células do cumulus, o GHR mostrou um aumento mais constante e gradual. O padrão de expressão sugere que o GHR reflete de forma mais precisa a qualidade do ovócito e seu grau de competência. Isso porque a competência não é um evento estático, mas sim, adquirida gradualmente durante o desenvolvimento, existindo ovócitos em vários graus intermediários entre aqueles incompetentes e competentes.

A identificação de marcadores para a qualidade do ovócito nas células do cumulus é uma importante ferramenta, especialmente porque permite prever o potencial de desenvolvimento sem danificar o ovócito. No nosso modelo de estudo a diferença no nível de expressão e no desenvolvimento embrionário entre os grupos de ovócitos provenientes de folículos <3 mm e >8,0 mm é evidente, sugerindo que a abundância de transcritos do GHR, EGFR e FSHR está relacionada com a competência, sendo um indicativo de qualidade ovocitária.

A expressão dos genes PTX3 e IGF-II não apresentou diferença de acordo com o tamanho do folículo. A PTX3 tem sido identificada como uma proteína importante para a estabilização da matriz do cumulus e tem sido descrita como um marcador para a competência de ovócitos em humanos (Zhang et al., 2005). Entretanto, outros estudos não encontraram relação entre a PTX3 e a qualidade do ovócito (Cillo et al., 2007), mostrando que até mesmo em humanos sua função como marcador da competência ovocitária ainda é controversa. Em nosso estudo, a ausência de diferenças nas condições testadas sugere que a abundância de transcritos da PTX3 podem não ter uma função no potencial de desenvolvimento de ovócitos bovinos. Dados conflitantes em relação à expressão dos IGFs também são relatados. Os transcritos do IGF-II têm sido detectados nas células da teca e ovócitos, e os transcritos do IGF-I nas células da granulosa, teca e cumulus (Yuan et al., 1996; Yaseen et al., 2001; Nuttinck et al., 2004; Hastie & Haresign, 2006). Porém, outros autores não encontraram o RNAm do IGF-I nas células do cumulus (Armstrong et al., 2002). No presente estudo a presença do RNAm do IGF-II foi detectada nas células do cumulus de bovinos, entretanto, não foi observada diferença no nível de transcritos relacionado com as diferenças no potencial de desenvolvimento.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, foram identificados genes diferencialmente expressos nos ovócitos e nas células do cumulus provenientes de diferentes tamanhos de folículos, e seus níveis de expressão podem ser associados com a competência do ovócito. Foi confirmado o papel crítico da histona H2A no desenvolvimento da competência. Porém, mais estudos são necessários para esclarecer o envolvimento da H2A nos mecanismos responsáveis pela aquisição da competência e quais fatores afetam o seu acúmulo progressivo nos estágios finais da foliculogênese. Foram identificados também genes nas células do cumulus (GHR, EGFR, FSHR) os quais refletem a qualidade do ovócito, sendo o GHR aquele que melhor avalia o potencial de desenvolvimento do ovócito.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, P., CHAMPIGNY, M. J., SKOGGARD S, ERKMANN, J. A., WHITFIELD, M.L., MARZLUFF, W. F., CLARKE, H. J. Stem-loop binding protein accumulates during oocyte maturation and is not cell-cycle-regulated in the early mouse embryo. **Journal of Cell Science**, v.115, p.4577-4586, 2002.

ALLARD, P.; YANG, Q.; MARZLUFF, W.F.; CLARKE, H.J. The stem-loop binding protein regulates translation of histone mRNA during mammalian oogenesis. **Developmental Biology**, v.286, p.195-206, 2005.

ARMSTRONG, D. G., BAXTER, G., HOGG, C. O., WOAD, K. J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. **Reproduction**, v.123, p.789-797, 2002.

ARNOLD, D. R., FRANÇON, P., ZHANG, J., MARTIN, K., CLARKE, H. J. Stem-loop binding protein expressed in growing oocytes is required for accumulation of mRNAs encoding histones H3 and H4 and for early embryonic development in the mouse. **Developmental Biology**, v.313, p.347-358, 2008.

ASHKENAZI, H., CAO, X., MOTOLA, S., POPLIKER, M., CONTI, M., TSAFRIRI, A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v.146, p.77-84, 2005.

BARAN, V.; PAVLOK, A.; BJERREGAARD, B.; WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; PHILIMONENKO, V.V.; LAPATHITIS, G.; HOZAK, P.; NIEMANN, H.; MOTLIK, J. Immunolocalization of upstream binding factor and pocket protein p130 during final stages of bovine oocyte growth. **Biology of Reproduction**, v.70, p.877-886, 2004.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.205-211, 2007.

BEVERS, M.M.; IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.197, p.173-178, 2002.

CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N.; SMITH, L. C.; WATSON, A. J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the

effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-12, 2003.

CILLO, S.; BREVINI, T.A.L.; ANTONINI, S.; PAFFONI, A.; RAGNI, G. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. **Reproduction**, v.134, p.645-650, 2007.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v.20, p. 715-723, 2006.

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**, v.1034, p.132-144, 2004.

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 Animal Science**, v.78, p.1277-1283, 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**, v.73, p.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**, v.71, p.1813-1821, 2004.

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

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.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**, v.67, p.136-144, 2004.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; ROCHA, G.P.; PAPA, F.O. Prevalência de duas ondas de crescimento folicular ovariano em vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, p.200-209, 1995.

GALL, L.; CHENE, N.; DAHIREL, M.; RUFFINI, S.; BOULESTEIX, C. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, p.439-445, 2004.

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

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 Technique**, v.24, p.413-423, 2005.

GAO, S.; CHUNG, Y.G.; PARSEGHIAN, M.H.; KING, G.J.; ADASHI, E.Y.; LATHAM, K.E. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. **Developmental Biology**, v.266, p.62-75, 2004.

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

HAGEMANN, L.J.; BEAUMONT, S.E.; BERG, M.; DONNISON, M.J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A.J.; SCHURMANN, A.; TERVIT, H.R. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.451-458, 1999.

HASTIE, P. M.; HARESIGN, W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.92, p.284-299, 2006.

IZADYAR, F.; HAGE, W.J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. The promontory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, p.444-453, 1998.

JAMNONGJIT, M.; GILL, A.; HAMMES, S.R. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, p.16257-16262, 2005.

JUENGEL, J.L.; BODENSTEINER, K.J.; HEATH, D.A.; HUDSON, N.L.; MOELLER, C. L.; SMITH, P.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H.; SAWYER, H.R.; MCNATTY, K.P. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.447-460, 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. **The Journal of reproduction and development**, v.51, p.325-332, 2005.

KOLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.59, p.836-842, 1998.

KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of Connexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1584-1589, 2003.

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

LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v.63, p.841-859, 2005.

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**, v.37, p.48-53, 1994.

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 Animals**, v.38, p.259-267, 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**, v.61, p.329-335, 2004.

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

MCGRAW, S.; VIGNEAULT, C.; TREMBLAY, K.; SIRARD, M.A. Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.692-699, 2006.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanism of early gene expression as compared with others species. **Zygote**, v.8, p.87-96, 2000.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; 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**, v.73, p.1367-1379, 2006.

MUTIGA, E.R.; MUKASA-MUGERWA, E.; AZAG, T. Luteolytic effect of PGF₂ alpha in Boran and Boran x Friesian cross-breed heifers. **Journal Agricultural Science**, v.120, p.103-106, 1993.

NARITA, T.; YUNG, T.M.C.; YAMAMOTO, J.; TSUBOI, Y.; TANABE, H.; TANAKA, K.; YAMAGUCHI, Y.; HANDA, H. NELF interacts with CBC and participates in 3' end processing of replication-dependent histone mRNAs. **Molecular Cell**, v.26, p.349-365, 2007.

- NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v.27, p.179-195, 2004.
- OYAMADA, T.; IWAYAMA, H.; FUKUI, Y. Additional effect of epidermal growth factor during *in vitro* maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. **Zygote**, v.12, p.143-150, 2004.
- PANGAS, S.A.; MATZUK, M.M. The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. **Biology of Reproduction**, v.73, p.582-585, 2005.
- PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.63-67, 1992.
- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p.859-69, 1995.
- PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.2002-2007, 2001.
- RACEDO, S.E.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; SALAMONE, D.; NIEMANN, H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine *in vitro* matured oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.17-25, 2008.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPPEZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v.339, p.62-66, 2003.
- 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**, v.57, p.167-175, 2000.
- SIRARD, A.M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.
- SONG, J.L.; WESSEL, G.M. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. **Differentiation**, v.73, p.1-17, 2005.
- 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**, v.64, p.904-909, 2001.
- STURM, R.A.; DALTON, S.; WELLS, J.R.E. Conservation of histone H2A/HB intergene regions: a role for the H2B specific element in divergent transcription. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.8571-8586, 1988.

- SU, Y.Q.; WU, X.; BRIEN, M.J.O.; PENDOLA, F.L.; DENEGRE, J.N.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.J. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. **Developmental Biology**, v.276, p.64-73, 2004.
- TANAKA, M.; KIHARA, M.; MECZEKALSKI, B.; KING, G.J.; ADASHI, E.Y. H1 α : a pre-embryonic H1 linker histone in search of a function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.202, p. 5-9, 2003.
- TANAKA, M.; KIHARA, M.; HENNEBOLD, J.D.; EPPIG, J.J.; VIVEIROS, M.M.; EMERY, B.R.; CARRELL, D.T.; KIRKMAN, N.J.; MECZEKALSKI, B.; ZHOU, J.; BONDY, C.A.; BECKER, M.; SCHULTZ, R.M.; MISTELI, T.; FUENTE, R.D.L.; KING, G.J.; ADASHI, E.Y. H1FOO is coupled to the initiation of oocytic growth. **Biology of Reproduction**, v.72, p.135-142, 2005.
- 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.414-24, 2002.
- TREMBLAY, K.; VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MORIN, G.; SIRARD, M.A. Identification and characterization of a novel bovine oocyte-specific secreted protein gene. **Gene**, v.375, p.44-53, 2006.
- VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.D.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N.V.; PAEPE, A.D.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v.3, p.1-11, 2002.
- WU, X.; MATZUK, M.M. GDF-9 and BMP-15: Oocyte organizers. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v.3, p.27-32, 2002.
- YASEEN, M.A.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different *in vitro* systems. **Reproduction**, v.122, p.601-610, 2001.
- YUAN, W.; LUCY, M.C.; SMITH, M.F. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1045-1054, 1996.
- 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**, v.83, p.1169-1179, 2005.
- ZHU, G.; GUO, B.; PAN, D.; MU, Y.; FENG, S. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.275-283, 2008.