

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**MARCADORES MOLECULARES PARA  
COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM CÉLULAS DO  
*CUMULUS* BOVINAS**

**Nayara Ribeiro Kussano  
Médica Veterinária**

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS – BRASIL

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**MARCADORES MOLECULARES PARA  
COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM CÉLULAS DO  
*CUMULUS* BOVINAS**

**Nayara Ribeiro Kussano**

**Orientador: Prof. Dr. Mauricio Machaim Franco  
Co-orientadora: Dra. Margot Alves Nunes Dode  
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Produção Animal)

Março – 2015  
Uberlândia - MG

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

K97m  
2015 Kussano, Nayara Ribeiro, 1988-  
Marcadores moleculares para competência ovocitária em células do  
Cumulus bovinas / Nayara Ribeiro Kussano. - 2015.  
86 f. : il.

Orientador: Mauricio Machaim Franco.  
Coorientadora: Margot Alves Nunes Dode.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Biopsia - Teses. 3. Genes - Teses. 4.  
Bovino - Criação - Teses. I. Franco, Mauricio Machaim. II. Dode,  
Margot Alves Nunes. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

---

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Nayara Ribeiro Kussano – nascida em 3 de Junho de 1988, na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, ingressou no 1º semestre de 2008 no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), tendo concluído em Janeiro de 2013. Em março de 2013 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na UFU, área de concentração em Produção Animal, na qual foi bolsista pela CAPES no período de abril de 2013 a Julho de 2014, e de novembro de 2014 a março de 2015.

*Dedico este trabalho a toda a minha família,  
em especial meu PAI Lincoln, que mesmo  
não estando presente fisicamente neste dia  
tão importante, tenho certeza que está muito  
orgulhoso por mais essa conquista, pois sempre  
colocou os estudos dos filhos em primeiro lugar.  
Obrigada por tudo PAI, SAUDADE SEMPRE...*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela saúde e pelas oportunidades. Por sempre me iluminar e abençoar.

À minha “MÃEPAI” **MARINA**, aos meus **irmãos Marilin e Thiago e meu cunhado Luiz Maurício**, por sempre terem me apoiado e dado força nos meus sonhos. Obrigada por todo o incentivo, ajuda e compreensão.

Aos meus amigos e familiares que sempre compreenderam meus momentos de ausência.

Ao meu orientador, **Dr. Maurício Machaim Franco**, pela oportunidade, confiança e ensinamentos. Muito Obrigada!

À minha co-orientadora **Dra. Margot Alves Nunes Dode**, pela oportunidade dada, pelos ensinamentos diários, pela paciência, pelos incentivos, pela amizade e pela confiança. MUITO OBRIGADA POR TUDO!

Aos “Tabajaras” mais queridos, Alice e Thiago, pela amizade e ajuda dada por esses anos. AMO!!

À Andrielle, pela amizade, companhia nos momentos difíceis, e parceria nas horas boas também!

À Ligiane e Ana Luiza, por toda ajuda e ensinamentos dentro do laboratório, Muito Obrigada!!

Aos meus amigos de laboratório, **Aline, Rafa, Catherine Lara, Felipe Caixeta, José Carvalho, Regivaldo e Anacleide**. Obrigada por toda a ajuda, pela amizade diária e pelos momentos de distração.

À Família Sucupira, “Chico”, Zé, Carolle, Oscar, Nathi, Malane, João, Leo, Thaís, Netto, Luzia, Anelise, Mateus, por esses anos de trabalho, convivência, amizade e festas!

A toda equipe da Fazenda Sucupira, pela convivência e trabalhos realizados.

Aos pesquisadores **Bianca Damiani, Eduardo Melo, Ricardo Alarmino**, pelo compartilhamento do conhecimento e ensinamentos científicos.

A TODOS os amigos feitos em Uberlândia, em especial Renata e Família, que serão sempre lembrados!

À Taís Ferreira e Família, por toda ajuda e apoio dado durante esses anos!  
Sou muito Grata!!!

À Célia, sempre muito atenciosa e prestativa!

Ao Frigorífico Qualimax, por ceder material biológico, indispensável para a execução do experimento.

A todos os professores e mestres, por dividirem seus conhecimentos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por todo o suporte para que este trabalho fosse realizado.

Ao CAPES/ CnPQ pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Uberlândia, pelo curso oferecido.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
I – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo Geral.....	3
1.2 Objetivos específicos.....	3
II - REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Maturação e Competência Ovocitária.....	4
2.2 Métodos de seleção de ovócitos .....	7
2.3 Interação células do <i>cumulus</i> – ovócito.....	10
2.4- Sistemas de cultivo de embriões PIVE.....	12
2.5 - Genes candidatos a marcadores moleculares para qualidade ou competência de ovócito.....	15
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Recuperação e Seleção dos ovócitos .....	22
3.2 Maturação <i>in vitro</i> .....	22
3.3 Fecundação <i>in vitro</i> .....	24
3.4 Cultivo embrionário <i>in vitro</i> .....	25
3.5 Biópsias das células do <i>cumulus</i> .....	26
3.6 Quantificação pelo PCR em tempo-real (qRT - PCR)....	26
IV - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	29
4.1 Experimento 1 Efeito da biópsia de células do <i>cumulus</i> de complexos- <i>cumulus</i> -ovócitos imaturos e do cultivo individual na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	29
4.2 Experimento 2. Expressão de genes candidatos em células do <i>cumulus</i> de ovócitos capazes ou não de produzir embriões <i>in vitro</i> .....	30
V - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
VI – RESULTADOS.....	31
Experimento 1 - Efeito da biópsia de células do <i>cumulus</i> de complexos - <i>cumulus</i> -ovócitos imaturos e do cultivo individual na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	31
Experimento 2 - Expressão de genes candidatos em células do <i>cumulus</i> de ovócitos capazes ou não de produzir embriões <i>in vitro</i> .....	34
VII – DISCUSSÃO.....	37
VIII – CONCLUSÕES.....	44
IX – REFERÊNCIAS.....	45



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ACTB -  $\beta$ -Actina
- BCB – *Brilliant Cresyl Blue*
- CC – Células do *cumulus*
- CCO – Complexo – *cumulus* - ovócito
- CIV – Cultivo *in vitro*
- EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético
- EGFR - Receptor do fator de crescimento epidermal
- FGF11 - Fator de crescimento de fibroblasto 11
- FIV – Fecundação *in vitro*
- FSHR - Receptor do hormônio folículo estimulante
- GAPDH - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
- GHR - Receptor do hormônio de crescimento
- GPC4 - Glicana 4
- IGFBP4 - Proteína ligadora de IGF 4
- KRT8 - Keratin proteins 8
- MIV – Maturação *in vitro*
- NaCl – Cloreto de Sódio
- PBS – Solução salina em tampão fosfato
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PIVE – Produção *in vitro* de embriões
- PPIA - *Peptidylprolylisomerase A*
- qPCR – Reação em cadeia pela polymerase quantitativa em tempo real
- RNA – Ácido ribonucleico
- RNAse – Ribonuclease
- SFB – Soro Fetal Bovino
- SLC2A1 - Solute carrier family 2 member 1
- SLC2A3 - Solute carrier family 2 member 3
- SOF - Fluido sintético de oviduto
- SPRY1 - *Sprouty* homólogo 1, antagonista da sinalização de FGF  
(*Drosophila*)

TALP - *Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate*

TCM – 199 – Meio de cultura de tecidos - 199

TRAs – Tecnologias de reprodução assistida

VCAN - Versican

WOW – Well of the Well

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> A) Placa utilizada para cultivo individual no sistema <i>Well of the Well</i> (WOW); B) Cultivo de Complexos – <i>Cumulus</i> - Ovócitos (CCO) individual no sistema WOW, em que cada poço recebe um número de identificação.....	23
<b>Figura 2.</b> Cultivo individual de Complexos- <i>cumulus</i> -ovócitos em Microgota de 20µL.....	24
<b>Figura3.</b> A- Complexo- <i>cumulus</i> -ovócito (CCO) aspirado de folículo presente em ovários oriundo de abatedouro antes da biópsia, B- Gota com meio contendo CCO antes da biópsia; C- CCO após a biópsia das células do <i>cumulus</i> .....	26
<b>Figura 4.</b> Nível de transcritos dos genes GPC4, GHR e VCAN analisados por qPCR em células do <i>cumulus</i> bovinas de complexos- <i>cumulus</i> -ovócitos de 3 grupos: CCOs que chegaram a blastocisto (Embriões), CCOs que clivaram mas não chegaram a blastocisto (Clivados) e CCOs que não clivaram (Não Clivados). Cada grupo possuía 5 pools de amostras e avaliados em triplicata. (P<0,10).....	35
<b>Figura 5.</b> Nível de transcritos dos genes IGFBP4, SPRY1, FSHR, SLC2A, KRT8, FGF11, EGFR e SLC2A3 analisados por qPCR em células do <i>cumulus</i> bovinas de complexos- <i>cumulus</i> -ovócitos de 3 grupos: CCOs que chegaram a blastocisto (Embriões), CCOs que clivaram mas não chegaram a blastocisto (Clivados) e CCOs que não clivaram (Não Clivados). Cada grupo possuía 5 pools de amostras e avaliados em triplicata. (P<0,10)...	36

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> - Sequência dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos em pares de base (pb) e referência de acesso ao <i>GenBank</i> .....	28
<b>Tabela 2.</b> Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos em sistemas de cultivo individual <i>well of the well</i> (WOW) e Microgota de 20µl (individual) comparados ao sistema em grupo (controle).....	32
<b>Tabela 3.</b> Estágio de desenvolvimento de embriões produzidos <i>in vitro</i> , no dia 7 e 8 de cultivo comparando o grupo controle (cultivo em grupo), cultivo no sistema <i>well of the well</i> (WOW) e em Microgotas de 20 µl (cultivo individual).....	32
<b>Tabela 4.</b> Produção <i>in vitro</i> de embriões comparando o grupo controle (cultivo em grupo) com e sem biópsia com o grupo cultivado em Microgotas de 20 µl com e sem biópsia (cultivo individual).....	33
<b>Tabela 5.</b> Estágio de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , no dia 7 e 8 de cultivo no controle (cultivo em grupo) e em Microgotas de 20 µl (cultivo individual) de complexos – <i>cumulus</i> – ovócitos submetidos (COM) ou não (SEM) à biópsia de células do <i>cumulus</i> .....	33
<b>Tabela 6</b> - Quantificação pelo Quantus Fluorometer do RNA dos cinco pools de sete biópsias de células do <i>cumulus</i> de ovócitos imaturos, que não clivaram, que clivaram mas não desenvolveram e dos que se desenvolveram até o estágio de blastocisto (embriões).....	34

## MARCADORES MOLECULARES PARA COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM CÉLULAS DO *CUMULUS* BOVINAS

**RESUMO** - O presente estudo objetivou quantificar a expressão de genes candidatos em células do *cumulus* (CC) de ovócitos com alta e baixa capacidade de produzir embriões *in vitro*. Inicialmente, foi avaliado o efeito do sistema de cultivo individual e da biópsia na produção de embriões. Os complexos cumulus ovócitos (CCOs) foram distribuídos em três grupos: controle (CCOs cultivados em grupos); WOW (CCOs cultivados individualmente no sistema WOW); e microgota (CCOs cultivados individualmente em microgotas de 20 µL). E, então foi comparada a produção de embriões do cultivo em grupo e do cultivo individual em microgota, com e sem biópsias. Foi quantificado o nível de transcritos dos genes GPC4, IGFBP4, FSHR, GHR, EGFR, FGF11, SLC2A1, SLC2A3, SPRY1, VCAN e KRT8, por PCR em tempo-real (qPCR) em biópsias de CC. As biópsias foram agrupadas de acordo com o resultado da produção de embriões individual em microgota, em: CCOs que formaram blastocisto em D7; CCOs que não clivaram e, CCOs que clivaram, mas que não chegaram a blastocisto. A produção de embriões em D7 foi inferior ( $P < 0,05$ ) nos grupos cultivados individualmente (WOW=17,9 % n=95; microgota= 26,3% n=95) do que no controle (45,0 %, n=209), entretanto a biópsia não afetou ( $P > 0,05$ ) a produção de blastocistos em nenhum dos grupos. Dos 11 genes avaliados nas CCs, três mostraram diferença no nível de RNAm. O GHR ( $p < 0,10$ ) e VCAN ( $P < 0,10$ ) tiveram maior expressão em CCs de ovócitos que chegaram a blastocistos comparado aos que não clivaram; já o GPC4 foi mais expresso ( $P = 0,007$ ) nas CCs dos que chegaram a embrião do que os que apenas clivaram. Conclui-se que a biópsia de CC não afeta a produção de embriões. A expressão dos genes GHR, VCAN e GPC4 em CC está associada a capacidade do ovócito de formar embrião e, pode ser utilizada como marcador não invasivo da competência ovocitária.

**Palavras-Chaves:** Biópsia, competência ovocitária, cultivo individual, genes, marcadores

## MOLECULAR MARKERS FOR OOCYTE COMPETENCE IN BOVINE CUMULUS CELLS

**ABSTRACT** –The present study aimed to quantify the expression of candidate genes in *cumulus* cells (CC) from oocytes with high and low potential to develop in vitro up to the blastocyst stage. Initially, the effect of the individual culture system and the biopsy on embryo development was evaluated. Cumulus-oocyte-complexes (COCs) were distributed into 3 groups: control (COCs were cultured in groups); WOW (COCs were cultured individually in the WOW system); and micro droplet (COCs were individually cultured in micro droplet of 20  $\mu$ L). Then, embryo production was compared between the control and the individual system (micro droplet) in which the COCs were submitted or not to biopsy. Expression levels of GPC4, IGFBP4, FSHR, GHR, EGFR, FGF11, SLC2A1, SLC2A3, SPRY1, VCAN and KRT8 genes were quantified by real time PCR (qPCR) in CC biopsies. Each biopsied COC was individually tracked, by culturing them in a micro droplet, and categorized based on his fate: embryo at blastocyst stage at D7, cleaved and arrested and not cleaved. Average blastocyst rates were lower in individual culture (WOW=17,9 % n=95; microdrop= 26,3% n=95) than in the control group (45,0 %, n=209) ( $P<0.05$ ), and no effect of the biopsy was observed for both groups ( $P>0.05$ ). From the 11 genes evaluated 3 showed differential expressions. Higher expression of GHR ( $p<0.10$ ) and VCAN ( $P<0.10$ ) was observed in CCs that formed embryos than those not cleaved. The GPC4 gene was overexpressed ( $P=0,007$ ) in CC from the formed embryos compared to cleaved and arrested ones. It can be concluded that biopsy do not affect embryo development. The expression of GHR, VCAN and GPC4 genes can be used as markers to distinguish COCs associated with good quality embryos from COCs with limited developmental potential.

**Keywords:** Biopsy, oocyte competence, individual culture, genes, markers

## I - INTRODUÇÃO

Dentre as técnicas de reprodução assistida (TRAs), a produção *in vitro* de embriões (PIVE), é a mais difundida e estudada em bovinos sendo utilizada para acelerar a multiplicação de animais de interesse. A aplicação comercial dessa técnica colocou o Brasil em posição de destaque no cenário mundial em uso de biotécnicas, sendo hoje o país que mais produz embriões bovinos *in vitro*.

Apesar dos avanços obtidos e de já estar sendo rotineiramente utilizados há mais de 10 anos, os índices da PIVE tem permanecido estáveis, ou seja, a taxa de blastocisto em torno de 40%, sugerindo uma considerável taxa de perdas durante o processo (PONTES et al., 2011). Um dos principais motivos dessa taxa reduzida é a baixa qualidade ou ausência de competência dos ovócitos selecionados, já que somente ovócitos competentes sofrem maturação completa e possuem um desenvolvimento embrionário normal (SIRARD et al., 2003; LONERGAN et al., 2003; DODE, 2006).

A seleção dos ovócitos de melhor qualidade baseada apenas em critérios morfológicos tem sido rotineiramente utilizada para a produção de embriões *in vitro*. Entretanto, a avaliação morfológica é insuficiente para diferenciar ovócitos mais competentes dos menos competentes (LONERGAN et al., 2003; KRISHER 2004, COTICCHIO et al. 2004). Por essa razão, torna-se fundamental a busca de outros parâmetros indicativos da qualidade ovocitária, de modo a viabilizar uma seleção mais acurada, e, conseqüentemente, um aumento na eficiência das TRAs em animais e humanos.

Vários estudos têm sido realizados no intuito de identificar as diferenças entre os ovócitos competentes e incompetentes, avaliando diferentes parâmetros tais como a quantidade e distribuição de organelas citoplasmáticas, a atividades de enzimas como *brilliant cresyl blue* (BCB)

(PUJOL et al., 2004; ALM et al., 2005; BHOJWANI et al., 2007) e análise da expressão de genes (MOUROT et al., 2006; PFEFFER et al., 2007; RACEDO et al., 2008; CAIXETA et al., 2009; ROMAR et al., 2011). Entretanto, estas formas de avaliação são invasivas e inviabilizam a utilização posterior do ovócito impedindo o seu uso na prática como marcadores de qualidade.

Uma alternativa para selecionar ovócitos mais competentes de modo não invasivo seria a identificação de marcadores para competência ovocitária nas células do cumulus (CC). A existência de uma comunicação bidirecional entre as células do *cumulus* e o ovócito (GILCHRIST et al., 2004; MAKABE et al., 2006; SIRARD et al., 2006), mostra que essas células são essenciais para competência de ovócitos de mamíferos (WEBB et al., 2002; FAIR, 2003). Isso pode ser comprovado, pelos vários estudos que associam a expressão de genes nas células do *cumulus* e a competência ovocitária (HAMEL et al., 2008; ASSIDI et al., 2010; CORDEIRO, 2011; LAGER et al., 2013).

Vários genes candidatos já foram identificados como marcadores moleculares para a competência ovocitária (DODE et al., 2005; CAIXETA et al., 2009; HAMEL et al. 2010; ASSID et al. 2011; BESSA et al., 2013; LAGER et al., 2013, UYAR et al., 2013). Entretanto, uma das limitações para o uso da maioria desses genes é a falta de comprovação de que realmente estão relacionados com a qualidade dos ovócitos e a falta de um sistema que possa ser usado na rotina.

Portanto a quantificação da expressão dos genes candidatos em CCs provenientes de CCOs que comprovadamente dão ou não origem a embriões pode confirmar a validade desses genes como marcadores. E, desta forma, contribuir para o estabelecimento de um padrão de expressão que possa ser utilizado na rotina dos laboratórios para seleção de ovócitos de forma mais acurada e não invasiva.



## **Hipótese**

A abundância relativa de genes relacionados à competência ovocitária nas células do *cumulus* podem prever a capacidade de desenvolvimento de ovócitos bovinos.

### **1.3 Objetivo Geral**

Validar marcadores moleculares para a competência ovocitária em células do *cumulus* bovinas.

### **1.4 Objetivos específicos**

- Estabelecer um método para coletar células do *cumulus* de ovócitos bovinos imaturos
- Estabelecer um sistema de cultivo individual de ovócito e embriões.
- Quantificar a expressão de genes candidatos a marcadores moleculares em células do *cumulus* de ovócitos com alta e baixa capacidade de produzir embriões *in vitro*.

## II - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Maturação e Competência Ovocitária

A maturação ovocitária compreende uma série de eventos complexos que preparam os ovócitos para a fecundação e incluem a maturação citoplasmática e a maturação nuclear.

Quando as fêmeas de mamíferos nascem e até sua puberdade, em seus ovários, os ovócitos estão retidos em diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica, estes ovócitos possuem uma baixa capacidade de retomar a meiose, permanecendo assim no estágio de Vesícula Germinativa (VG) (DOMNS, 1993; SATHANANTHAN, 1994). O ovócito permanece nesse estágio durante todo o desenvolvimento folicular e, somente após o pico pré-ovulatório de LH, será estimulado a retomar a meiose e a completar a primeira divisão meiótica. Entretanto, quando o ovócito é removido do seu ambiente folicular ele espontaneamente retoma a meiose.

A maturação nuclear compreende o processo de retomada do primeiro bloqueio meiótico que ocorre na prófase I, e a progressão até metáfase II (MII). Envolve a quebra da vesícula germinativa (VGBD) do inglês, *vesicle germinal break down*, marcando o final da prófase I, a condensação da cromatina e progressão pelos estágios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase (TI), completando a primeira divisão meiótica e, passando para metáfase MII da segunda divisão meiótica. No final da primeira divisão meiótica ocorre a divisão dos cromossomos homólogos, onde metade do número de cromossomos fica no ovócito (célula haplóide) e a outra metade é liberada no primeiro corpúsculo polar (MINGOTI, 2000; SIRARD, 2001). Após atingir a fase de metáfase MII, da segunda divisão

meiótica o ovócito é novamente bloqueado, permanecendo nesse estágio até o momento da fecundação.

A maturação citoplasmática envolve vários eventos simultâneos, dentre eles, a migração e reorganização de organelas pelos microfilamento e microtubulos. Inicialmente as mitocôndrias e o complexo de Golgi se localizam na periferia do ovócito imaturo e durante a maturação eles migram e se posicionam em uma área perinuclear. Já os grânulos corticais que são produzidos pelos complexos de Golgi e, originalmente, se situam no centro do ovócito migram para a periferia e ancoram-se na membrana citoplasmática. A reorganização e migração de organelas pelos microfilamentos e microtubulos são importantes para a fecundação, pois causam modificações na membrana plasmática e na zona pelúcida que evitam a polispermia (QUETGLAS, 2007).

Também são observadas no ovócito bovino, alterações marcantes na síntese de proteínas específicas, que estão envolvidas na regulação da retomada da meiose por desencadearem uma complexa cascata de desfosforilação e fosforilação. No período de maturação é observado o aumento dos níveis de cálcio, o aumento na atividade de proteínas quinases e a degradação da adenosina monofosfato cíclico (AMPc). A proteína denominada de fator de promoção da maturação (MPF) é responsável pelo início da maturação, atuando de forma que assegure que o ciclo celular prossiga de forma correta (KUBELKA et al., 2000).

Durante o processo de maturação também são observadas alterações nas células somáticas que circundam o ovócito, as células do complexo-*cumulus*-ovócitos que expandem, ficando suspensas em uma matriz gelatinosa devido ao acúmulo de ácido hialurônico (GONÇALVES et al., 2002).

A competência ovocitária pode ser definida como o potencial ou habilidade de um ovócito ser maturado, fecundado e se desenvolver até o estágio de blastocisto. E, apesar das condições de cultivo durante a maturação *in vitro* terem tido avanços significativos, a competência dos ovócitos maturados *in vivo* ainda é maior do que dos maturados *in vitro*

(DONNISON; PFEFFER, 2004; FARIN et al., 2007; VAN de LEEMPUT et al., 1999; RIZOS et al., 2002). Durante os estágios finais da foliculogênese é que essa competência é progressivamente adquirida, através de várias alterações moleculares e celulares que dão ao ovócito capacidade de, após a fecundação, dar origem a um embrião viável (revisado por DODE, 2006).

O ovócito precisa completar toda sua fase de crescimento para que possa adquirir competência para maturação nuclear e citoplasmática. O ovócito bovino atinge seu crescimento total quando tem em torno de 120 $\mu$ m de diâmetro e o folículo no qual está inserido em torno de 3 mm (FAIR et al., 1995). Apesar dos ovócitos de folículos a partir 6,0 mm apresentarem o diâmetro similar aos ovócitos de folículos menores que 6,0 mm, apresentam uma maior competência para o desenvolvimento com taxa de embriões superiores (CAIXETA et al., 2009). Estes resultados mostram que outros fatores, além do crescimento completo do ovócito, estão envolvidos na aquisição da competência ovocitária (CAIXETA et al., 2009). Além disso, sugerem que muitas das modificações que conferem ao ovócito a competência ocorrem na fase final de crescimento folicular. Essas modificações incluem armazenamento de RNAm, síntese de proteínas, redistribuição de organelas citoplasmáticas, desenvolvimento dos mecanismos que regulam o cálcio, alterações da proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) e da ativação do MPF (ADONA, 2002; ANGUITA et al., 2008). Em folículos pequenos entre 1,0-1,5 mm, por exemplo, os ovócitos são capazes de retomar a meiose, mas, param em metáfase I (MIYANO, 2003), pois conseguem ativar a via do MPF, porém não desencadeiam a cascata de proteínas da via MAPK (KANAYAMA et al., 2002). Somente ovócitos que completaram o seu crescimento possuem competência para ativar as duas vias do ciclo celular (ADONA, 2006), mas nem sempre esses apresentam desenvolvimento embrionário normal após a fecundação. Somente os que adquiriram a competência podem formar embrião viável (DONNISON & PFEFFER, 2004).

Ao contrário do que ocorre com qualquer outra célula somática, no ovócito, as moléculas de RNA são armazenadas em uma forma quiescente

até que sejam usadas ao longo da maturação e do desenvolvimento embrionário inicial, pois o intervalo entre a síntese e a utilização desse RNA pode ser longo (SIRARD, 2001). A eficiência desse armazenamento e uso dessas moléculas armazenadas conferem a competência ao ovócito (PICTON et al., 1998). Isso porque os estoques de RNAs são fundamentais para conduzir as primeiras divisões celulares até a ativação do genoma embrionário, que no caso dos bovinos, ocorre no estágio de 8 a 16 células (FOULADI NASHTA, 1998; BREVINI GANDOLFI & GANDOLFI, 2001; SIRARD, 2001; BREVINI et al., 2007) tanto *in vivo* como *in vitro*,

Portanto, a competência ovocitária pode ser determinada pela quantidade de RNAm de origem materna que são estocados durante o crescimento e fase final da foliculogênese. Os estoques de RNAm podem ser diferentes quando se compara ovócitos competentes e incompetentes, sendo essa diferença uma alternativa para identificação de genes marcadores da competência ovocitária (DODE et al., 2005; RACEDO et al., 2008).

## **2.2 Métodos de seleção de ovócitos**

A morfologia do complexo-*cumulus*-ovócito é rotineiramente utilizada como critério para selecionar ovócitos de melhor qualidade. Neste método de seleção são avaliadas a homogeneidade do citoplasma e a compactação e quantidade de células do *cumulus* (DE WIT et al., 2000; STOJKOVIC et al., 2001; LONERGAN et al., 2003; PUJOL et al., 2004). Stojkovic et al. (2001), classificam os CCOs em quatro categorias, grau 1 os CCOs que possuem múltiplas camadas compactas de CCs e citoplasma homogêneo, sendo estes os mais competentes para o desenvolvimento de embrião *in vitro* (PUJOL et al., 2004); grau 2 os que apresentam ao menos 5 camadas de CCs compacta e citoplasma com pequenas áreas de pigmentação irregular, os de grau 3 são os ovócitos com algumas camadas de células ou com pequenas regiões desnudas com citoplasma vacuolizado e heterogêneo. Já a categoria 4 que são os ovócitos parcialmente ou

totalmente desnudos com CCs expandidas e citoplasma heterogêneo, sendo esta categoria considerada a menos competente para a PIVE (PUJOL et al., 2004).

Apesar da morfologia dos CCOs ser um indicativo da qualidade do ovócito, por si só é incapaz de diferenciar os ovócitos competentes que têm a habilidade de levar uma gestação a termo. Portanto, vários procedimentos focando os diversos aspectos e estruturas dos ovócitos, além da morfologia têm sido estudados na tentativa de se estabelecer um sistema/método mais eficiente para avaliar o potencial de desenvolvimento dos ovócitos.

Além da morfologia, o tamanho do folículo de onde os ovócitos são recuperados também pode ser utilizado para selecioná-los. Até o momento há inúmeros trabalhos que relatam existir uma relação entre a competência do ovócito e o tamanho do folículo de origem, sendo que ovócitos de folículos maiores possuem maior potencial de desenvolvimento do que os ovócitos de folículos menores (LONERGAN et al., 1994; BLONDIN & SIRARD, 1995; FENG et al., 2007; RACEDO et al., 2008; CAIXETA et al., 2009; BESSA et al., 2013). O diâmetro do ovócito também pode estar relacionado com essa maior competência dos CCOs, pois existe uma correlação entre o diâmetro do ovócito e o tamanho do folículo (FAIR et al., 2003; GANDOLFI et al., 2005; BESSA et al., 2013).

O corante *Brilliant Cresyl Blue* (BCB) é outro método que vem sendo testado e utilizado para selecionar os ovócitos mais homogêneos e competentes. Esse teste detecta a atividade intracelular da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), enzima essa que é sintetizada durante o crescimento do ovócito, tendo sua atividade diminuída em ovócitos crescidos por completo. Essa enzima é importante para o fornecimento de energia para a formação de ácidos graxos e síntese de nucleotídeos. O citoplasma de ovócitos com baixa atividade da G6PD se coram de azul porque não reduzem o BCB a compostos incolores (RODRIGUES-GONZALES et al., 2002; PUJOL et al., 2004; BHOJWANI et al., 2007; GHANEM et al., 2007; WU et al., 2007; TORNER et al., 2008). Apesar do teste BCB ser utilizado para selecionar ovócitos mais competentes para a PIV, a competência de ovócitos positivos

para BCB pode variar com a maturidade sexual, estimulação com gonadotrofinas e com o diâmetro do ovócito. É importante ressaltar que o teste somente seleciona os ovócitos que atingiram seu crescimento total e isso caracteriza apenas um dos vários fatores que envolvem a aquisição de competência ovocitária (RODRIGUES-GONZALES et al., 2002; PUJOL et al., 2004; WU et al., 2007; TORNER et al., 2008; CATALÁ et al., 2011; SU et al., 2012).

Outra forma de selecionar ovócitos de melhor qualidade é pela identificação de genes relacionados com a competência ovocitária e, então avaliar sua expressão. Vários autores tem mostrado que a diferença entre ovócitos competentes e incompetentes pode ser atribuída ao padrão diferencial de determinados genes (ROBERT et al., 2000; GANDOLFI et al., 2001; MADDOX-HYTTEL et al., 2005; CAIXETA et al., 2009; BESSA et al., 2013).

Alguns genes já foram identificados por estarem relacionados com a competência ovocitária (DONNISON & PFEFFER, 2004; MOUROT et al., 2006; RACEDO et al., 2008; CAIXETA et al., 2009; BESSA et al., 2013). Nestes estudos foram utilizados como modelo o tamanho do folículo como indicador da qualidade do ovócito, Donnison e Pfeffer (2004) encontraram maior expressão de genes como: Oct4, Ciclina A, SLBP e GDF9 em ovócitos obtidos de folículos maiores que 5mm comparado com os de folículos menores que 2mm, já Mourot et al., (2006) observaram maior quantidade de transcritos de genes como, CDC5L, RGS16, PRDX1, PSMB2, SKIIP, CCNB2, CKS1 e PTTG1 em ovócitos de folículos maiores que 8 mm. Racedo et al.(2008) avaliando a expressão de genes entre folículos menores que 2 mm com folículos de 2 a 8 mm, encontraram maior expressão dos genes DYNLL1 e DYNC111 nos ovócitos de folículos maiores.

Caixeta et al.(2009) encontraram que a expressão de H2A aumentou gradualmente de acordo com o aumento do tamanho do folículo, sendo maior a expressão em ovócitos de folículos maiores que 8,1mm comparados com os menores de 6 mm e Bessa et al.(2013) observaram uma diminuição do

nível de transcritos do gene HDAC2 em ovócitos competentes quando comparados com o grupo de folículos antrais iniciais.

Vale lembrar que esses genes foram identificados em ovócitos e, apesar de auxiliarem no entendimento do mecanismo da aquisição da competência, ainda é inviável a utilização dos mesmos como marcadores, devido à impossibilidade do aproveitamento do ovócito após realizada a avaliação.

Diante disso, nota-se que, apesar de todas essas ferramentas ainda não se tem um método confiável e não invasivo para selecionar ovócitos competentes. Logo, a avaliação das células do *cumulus* torna-se o método mais viável de ser utilizado na rotina.

### **2.3 Interação células do *cumulus* – ovócito**

Nos ovários de mamíferos, durante o desenvolvimento folicular, os ovócitos crescem e se desenvolvem com uma relação mutuamente dependente e íntima com as células somáticas adjacentes. É durante o estágio de folículo pré-antral que a maior parte desse crescimento do ovócito ocorre, estando muito próximo às células da granulosa (CG) que ainda estão indiferenciadas. Com a formação do antro folicular as CG se diferenciam em duas linhagens funcionalmente e anatomicamente distintas: a células que se aderem à parede do folículo com papel importante na esteroidogênese, chamadas de células da granulosa murais, e as CCs, as quais possuem íntimo contato com o ovócito. As CCs possuem projeções citoplasmáticas trans-zonais que são altamente especializadas e que penetram através da zona pelúcida formando as junções *gap* quando entram em contato com o ovócito, formando assim o complexo-*cumulus*-ovócito (ALBERTINI et al., 2001; YEO et al. 2009).

Portanto, através dessas junções *gap* que o ovócito mantém com as células do *cumulus* uma comunicação bidirecional. Essa comunicação é essencial para o crescimento e maturação do ovócito (YEO et al., 2009). Isso



porque existe uma interdependência entre as duas células, sendo que fatores secretados pelo ovócito (OSF) como o Fator de Diferenciação de Crescimento 9 (GDF-9) e a Proteína Morfogenética de osso 15 (BMP-15) influenciam as células do *cumulus* regulando seu microambiente e estimulando seu crescimento, além disso, o ovócito necessita das células do *cumulus* para fornecer produtos glicolíticos, como piruvato e aminoácidos essenciais para o seu crescimento (EPPIG, 2001; GILCHRIST et al., 2008).

Através dessa interação com o ovócito que as CCs possuem a capacidade de sofrerem a expansão (DRAGOVICK et al., 2007), este processo ocorre durante a maturação onde essas células secretam ácido hialurônico formando uma matriz visco elástica e gelatinosa. A expansão é induzida pelo LH pré-ovulatório e é importante para a captação do ovócito pelas fimbrias do oviduto na fecundação *in vivo*, e, *in vitro* pode ocorrer pela estimulação do EGF e do FSH (DIAZ et al., 2007).

Um papel metabólico importante das CCs durante a maturação ovocitária é a de proteger o ovócito, pois elas reduzem cistina em cisteína e promovem a captação de cisteína nos ovócitos durante a maturação, com isso, aumenta o nível de glutathione, que protege contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo (TAKAHASHI et al., 1993; LIM et al., 1996; de MATOS et al., 1997; GESHI et al., 2000; TATEMOTO et al., 2000; FATEHI et al., 2005).

As CCs metabolizam a maior parte da glicose que é consumida pelo CCO onde via glicólise supre o ovócito com metabólicos intermediários como o piruvato (SUTTON- MCDOWALL et al., 2010). Outros substratos como ácidos nucleicos e aminoácidos são transportados das CCs e CGs para o ovócito para a síntese de suas macromoléculas como RNAm e RNAr necessários para o seu crescimento (JOHNSON, 2007).

Assim como a fecundação e o desenvolvimento de um embrião viável se limitam a um ovócito e espermatozoide de qualidade (EPPIG et al., 1993) as CCs possuem um papel determinante no desenvolvimento do ovócito de qualidade não apenas antes da ovulação como também após (TANGHE et al., 2002).

Diante dessa importante comunicação que existe entre as células do *cumulus* e o ovócito, elas podem ser utilizadas para a identificação de marcadores moleculares, pois permite prever a qualidade do ovócito sem danificá-lo, permitindo que este seja usado na produção *in vitro* de embriões tanto de animais domésticos como em humanos.

#### **2.4- Sistemas de cultivo de embriões PIVE**

Em bovinos e ovinos, o cultivo de embrião totalmente *in vitro* somente foi possível quando foram utilizadas células do oviduto em sistema de co-cultivo, onde mostraram que vários tipos de células somáticas eram capazes de proporcionar um ambiente favorável para o desenvolvimento do embrião (GORDON, 1994). Células VERO, células BRL, células da granulosa e células do oviduto foram extensivamente utilizadas em co-cultivo para produção de embriões PIV. Estas células ajudam na retirada de substâncias embriotóxicas do meio de cultivo como metais pesados, radicais livres e são benéficas para a produção de fatores embriotrópicos que auxiliam no desenvolvimento do embrião (THIBODEAUX & GODKE, 1992; REED et al., 1996; HOLM et al., 1999; GESHI et al., 1999).

Entretanto, existem algumas desvantagens da utilização do sistema de co-cultivo, como a falta de controle sobre os fatores que são produzidos pelas células utilizadas pois dependendo da fase celular utilizada as células podem diferir quanto à liberação de fatores, causando grande variação nos resultados (HOLM et al., 1999).

Tervit et al.(1972), desenvolveram um meio de cultivo denominado Fluido Sintético do Oviduto (SOF), foi desenvolvido a partir de análises do fluido do oviduto de ovelhas, e desde então, várias modificações na composição vem sendo feitas para melhorar os meios de cultivo de embriões PIV. Além do meio de cultivo, a suplementação de fonte proteica também é importante, dentre as mais utilizadas estão o Soro Fetal Bovino (SFB), Albumina Sérica Bovina (BSA) e macromoléculas como Polivinilpirrolidona

(PVP) e o Álcool Polivinílico (PVA) (WRENZYCHI et al., 2001; SERAPIÃO, 2006).

O SFB estimula o desenvolvimento de blastocistos, é benéfico durante o cultivo porque contem aminoácidos, vitaminas, substrato energético, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados, pode ser altamente tóxico mas também é utilizado como fonte fixadora de nitrogênio principalmente quando se faz co-cultivo com células somáticas (ABE et al., 2002). No entanto até hoje não se sabe a correta composição desse produto, com isso, ele é considerado um meio indefinido. Embora a composição do BSA seja mais restrita e conhecida, quando comparada com a do SFB, ele também pode variar entre os lotes e assim ocorrer variações nos resultados (KESKINTEPE & BRACKETT, 1996; GONÇALVES et al., 2002).

Outros fatores podem influenciar na produção de embriões PIV, como variação de luminosidade e temperatura, além de componentes no meio de cultivo como glicose, lactato e piruvato. Durante a fase de clivagem e desenvolvimento inicial do embrião o lactato e o piruvato são essenciais. A glicose com a presença de fosfato atrasa ou para o desenvolvimento inicial de embriões, mas durante a fase de mórula e blastocisto ela passa a ser o carboidrato mais utilizado, ajudando no desenvolvimento do blastocisto (GARDNER e LANE, 2000).

O desenvolvimento bem sucedido em cultivo de embriões em grupo pode ser atribuído à comunicação autócrina e parácrina entre os embriões. Estes importantes fatores de crescimento que melhoram o desenvolvimento *in vitro* incluem: *insulin like growth factor* I e II (IGF-I, IGF-II), *transforming growth factor*  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), interferon T (IFN-T), *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-activated factor* (PAF) e *platelet derived growth factor* (PDGF) (PARIA & DEY, 1990; THIBODEAUX et al., 1995; LIM & HANSEL, 1996; O'NEILL, 1997). A concentração e diluição de vários fatores estimulantes produzidos pelos embriões parecem ser cruciais. Gopichandran et al., (2006) observaram que a distância de 165  $\mu$ m entre zigotos foi ideal para melhorar as taxas de blastocisto de eclosão, o número de células de embriões e o metabolismo de carboidratos. Um baixo número de embriões por gota e/ou diminuir a quantidade de embrião e quantidade de meio de

cultivo pode ter uma relação negativa com o desenvolvimento embrionário (HOELKER et al, 2009).

Apesar do cultivo em grupo ser mais utilizado, o sistema de cultivo individual se tornou importante também para a pesquisa e não apenas para a produção comercial de embriões PIV, pois com esse sistema, é possível acompanhar individualmente o desenvolvimento do ovócito até embrião.

A maioria dos trabalhos publicados testam apenas o cultivo individual, fazendo a maturação e a fecundação em grupo, sendo assim, o ovócito só passa para o cultivo individual após 24h da inseminação (EYESTONE et al. 1989; PALMA et al., 1992; PEREIRA et al., 2005).

Alguns estudos utilizaram o sistema de cultivo individual obtendo resultados semelhantes aos embriões produzidos em grupo (HAGEMANN et al., 1998; FUKUI et al., 2000; MATOBA, 2014). Mas outros trabalhos obtiveram resultados onde o cultivo individual diminuiu a taxa de blastocisto (FERRY et al., 1994; HEDRIKSEN et al., 1999; VAJTA et al., 2000), alguns observaram que embriões cultivados individualmente tinham números de células mais baixo que os cultivados em grupo e menor tolerância a criopreservação (PEREIRA et al., 2005).

Vajta et al., (2000) desenvolveram um sistema de cultivo individual chamado 'well of the well' (WOW), onde foram feitos pequenos poços cilíndricos em forma de 'V' no fundo da placa de cultivo, formando assim um microambiente. Uma vantagem desse sistema é que os embriões não se aglomeram como no sistema em grupo convencional e ficam imersos sob a mesma gota de meio de cultivo, não perdendo assim todos os benefício do cultivo em grupo. Outro sistema utilizado por STOKES et al., (2005), utiliza uma proteína derivada de um molusco marinho que forma uma matriz adesiva no fundo da placa. Essa matriz faz com que as estruturas fiquem aderidas no fundo da placa, permitindo fazer o cultivo completo dos embriões imersos sob a mesma gota de meio de cultivo sem que as estruturas se misturem.

Existem ainda outras formas de cultivo individual, como em microgotas imersas em óleo (CAROLAN et al., 1996; DONNAY et al., 1997; FUJITA et al., 2006; NAGAO et al., 2008; GOOVAERTS et al., 2009), em

capilares de vidro (THOUAS et al., 2003) e entre filamentos de malha de poliéster (BOOTH et al 2007; MATOBA et al., 2010).

PEREIRA et al., (2005) testaram quatro sistemas de cultivos: em gotas de 400 $\mu$ L de meio de cultivo, em WOW imerso em gotas de 400  $\mu$ L de meio de cultivo, em WOW sob gotas de 20  $\mu$ L e isoladamente em gotas de 20  $\mu$ L. Esses autores mostraram que tanto a taxa de clivagem quanto a de produção de blastocistos foram semelhantes para todos os tratamentos. Já Vajta et al. (2000) observaram que quando o embrião é cultivado tanto em gota individual de 20  $\mu$ L como no poço do WOW coberto com gota de 20  $\mu$ L as taxas de embriões são inferiores comparada com os cultivados em WOW imersos sob a mesma gota de meio de cultivo.

Outros estudos (FUKUI et al., 2000; MATOBA et al., 2010; BUNEL et al., 2015) mostraram que o cultivo individual têm apresentado resultados melhores, por mais que as taxas de embriões cultivados individualmente sejam um pouco mais baixas dos cultivados em grupo. Mas a possibilidade de um cultivo identificado, onde se consiga acompanhar o desenvolvimento de um ovócito até o estágio de blastocisto é essencial para comprovar a competência de desenvolvimento.

## **2.5 - Genes candidatos a marcadores moleculares para qualidade ou competência de ovócito**

O estudo do perfil de transcriptoma das células do *cumulus* oferece uma oportunidade de prever a competência do ovócito de um modo não invasivo, devido à comunicação bidirecional que existe entre as duas estruturas (ASSOU et al., 2010).

Diante disto, foram escolhidos alguns genes candidatos a marcadores em células do *cumulus* para serem avaliados, dentre eles, podemos citar Fator de crescimento de fibroblasto 11 (FGF11), *Sprouty* homólogo 1, Antagonista da sinalização de FGF (*Drosophila*) (SPRY1), Receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR), Receptor do fator de crescimento

epidermal (EGFR), Receptor do hormônio de crescimento (GHR), Proteína ligadora de IGF 4 (IGFBP4), Glicana 4 (GPC4), Solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1), Solute carrier family 2 member 3 (SLC2A3), Versican (VCAN) e Keratin proteins 8 (KRT8).

A superfamília de fatores de crescimento de fibroblasto (FGF) tem sido implicada na função das células foliculares. É sabido que os FGFs podem alterar a função ovariana, inibindo secreção dos hormônios esteroides, afetando a sobrevivência das células da granulosa. Entretanto, o mecanismo pela qual agem nas células do folículo ovariano ainda não está bem caracterizado (JIANG et al., 2010).

Os FGF11-FGF14, são denominados FGFs intracelulares ou fatores homólogos ao FGF (FHF), pois possuem alta identidade de sequência com a família FGF, mas não ativam os receptores de FGF (FGFR) (BEEKEN; MOHAMMADI, 2009). RNAm de FGF11 já foi detectado em ovócitos, embriões e células-tronco de trofoblasto de camundongo, placentas humanas e linhagens celulares (ZHONG et al., 2006) e CC (CORDEIRO, 2011). O FGF11 é um regulador negativo da síntese de esteróides e da sobrevivência das células da granulosa (ZHONG et al., 2006). Apesar da extensa literatura sobre a família dos FGF, informações relacionadas ao papel do FGF11, mesmo no crescimento folicular são muito escassas. Entretanto, estudo utilizando microarranjo para avaliar a expressão diferencial de genes em CC de ovócitos mais e menos competentes foi observada uma maior expressão em CC de ovócitos mais competentes (CORDEIRO, 2011). Esses resultados sugerem que esse gene pode estar envolvido com a competência, sendo um candidato promissor a marcador molecular.

O gene Sprouty Homólogo 1 antagonista da sinalização do FGF (SPRY1) pertence a uma nova família de genes de quatro membros (SPRY1-4) induzidas pela família FGF, que através de um ciclo de feedback negativo regula negativamente seus indutores (FAEDO et al., 2010). Inicialmente foi descrito em *Drosophila* durante o desenvolvimento da traqueia. Já em mamíferos os membros da família do Spry são expressos em uma fase muito restrita do desenvolvimento do embrião, e seu padrão de expressão se assemelha a expressão da família FGF (FELFLY E KLEIN, 2013). A

regulação negativa de SPRY1 está associado com a angiogênese em células endoteliais e aumento da proliferação celular, possivelmente devido à modulação de p21 e expressão de ciclina D1 (SABATEL et al., 2010). O FGF2 também induz níveis mais elevados de mRNA de SPRY2 em células do cumulus de camundongos (SUGIURA et al., 2009), e as células da granulosa-luteinizadas em humanos (HAIMOV-KOCHMAN et al., 2005). Os níveis de mRNA para SPRY2 em células da granulosa de bovinos está negativamente correlacionada com a competência ovocitária em experimentos usando *differential display* e hibridizações subtrativas (ROBERT et al., 2001). Entretanto, estudo utilizando microarranjo relatam maior expressão de SPRY1 em CC oriundos de CCO mais competentes.

É sabido que alguns hormônios como FSH, EGF e GH exercem efeito benéfico na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos e sua ação ocorre através de ligações aos receptores localizados nas células do *cumulus* (SIMONE et al., 1997; BEVERS & IZADYAR, 2002; OYAMADA et al., 2004; CONTI et al., 2006). O FSH é necessário para o desenvolvimento gonadal e maturação na puberdade e para a produção de gametas durante a fase fértil da vida do animal, sendo assim um hormônio central na reprodução de mamíferos. É produzida e secretada em conjunto com o LH pela hipófise (SIMONE et al., 1997; WU & TIAN, 2007). O FSH é importante na aquisição da competência em ovócitos bovinos, sendo esta função primariamente associada com seu efeito no crescimento folicular *in vivo* (SIRARD, et al. 2007).

A expressão do receptor de FSH (FSHR) na fêmea é altamente célula-específica e estritamente gonadal, localizados nas células da granulosa (SIMONE et al., 1997). Cordeiro (2011) encontrou baixa expressão de FSHR em CCs de ovócitos oriundos de folículos pequenos (1 a 3 mm) comparado com os folículos maiores, o que reflete a variação no desenvolvimento da competência, já Calder et al. (2003) observaram maior expressão de FSHR em CCOs de melhor qualidade. Devjak et al. (2012) encontraram em humanos, maior expressão em CCs de ovócitos imaturos comparado com ovócitos em MII.

Outros estudos em bovinos identificaram potenciais marcadores em células do *cumulus*, pode-se destacar além do FSHR, o receptor para o fator de crescimento epidermal (EGFR) e o receptor para fator de crescimento (GHR) (ASSID et al., 2008; CAIXETA et al., 2009; ASSID et al., 2010; GEBHARDT, et al., 2011). O receptor do EGFR que age como mediador das ações do LH incrementa os sinais que estimulam os EGF, relacionados com a indução da maturação (ASSIDI et al., 2010) e sua maior expressão tem sido associado com competência ovocitária em bovinos e humanos (ROBERT et al. 2001; HAMEL et al. 2008; ASSID et al., 2011). O GH quando presente durante a maturação acelera a maturação nuclear, induz a expansão das CCs e melhor a taxa de blastocisto (IZADYAR et al., 1998; KOLLE et al., 1998; BEVERS AND IZADYAR, 2002; KOLLE et al., 2003). Estudos mostraram que EGFR e GHR foram diferencialmente expressos nas células do cumulus de CCO provenientes de diferentes tamanhos de folículos, apresentaram-se mais expressos em CCs de ovócitos oriundos de folículos maiores (CAIXETA et al., 2009). Em trabalho realizado com microarranjo, foi encontrada maior expressão em CCs de GHR de ovócitos de folículos grandes (competentes) (CORDEIRO, 2011), o mesmo foi observado por Martins et al., (2014) em CCs de ovócitos de cabras.

Outros genes candidatos foram identificados em células do *cumulus* de ovócitos oriundos de diferentes tamanhos de folículos por Cordeiro (2011), utilizando a técnica de microarranjo, entre eles a proteína ligadora de IGF4 (IGFBP4), colágeno XVIIIA1 (COL18A1) e glicana4 (GPC4).

Os IGFs são fatores de crescimento semelhantes à somatomedinas ou insulinas, são produzidos pela maioria dos tecidos e, possuem a capacidade de atuar por via endócrina, parácrinas e autócrinas (HAFEZ; HAFEZ, 2004), sendo que sua ligação com seus receptores pode ser modulada pela proteína ligante de IGF (IGFBP) (JONES E CLEMMONS, 1995; KELLEY et al., 1996) Sendo assim, ocorrendo alterações intrafoliculares dos níveis de IGFBP pode provocar alterações na biodisponibilidade de IGF e, assim, regular a ação das gonadotrofinas nas células foliculares (FORTUNE et al., 2001).

A IGFBP4 é a principal proteína ligante de IGF no antrum follicular (BURATINI, 2005). O seu papel é se ligar e sequestrar as moléculas de IGF e



assim modular o desvio e a dominância folicular (FORTUNE et al., 2004), provavelmente devido a seu efeito regulatório na esteroidogênese (KWINTKIEWICZ & GIUDICE, 2009). Alta expressão de IGFBP4 foi detectada em CC de mulheres com a síndrome de ovário policístico (Kwon et al., 2010) e seu efeito inibitório na esteroidogênese foi demonstrado em CC, granulosa e teca (CATALDO & GIUDICE, 1992; MASON et al., 1998). Uma maior expressão de IGFBP4 foi detectada em CC bovinas oriundas de CCO mais competentes comparados com os incompetentes (CORDEIRO, 2011).

A GPC4 (Glypican 4) é membro da família das glicanas, uma proteoglicana de heparan sulfato (HSPG) que é associada a superfície celular e está envolvida em vários processos biológicos incluindo a regulação dos fatores de crescimento, adesão, sinalização, proliferação e diferenciação celular (DREYFUSS et al. 2009; FICO et al., 2011). A variedade estrutural do heparan sulfato permite a sua ligação e interação com várias proteínas, como fatores de crescimento, quimiocinas, substâncias morfogênicas, componentes da matriz extracelular, enzimas, entre outros. É sabido que os FGFs são dependentes da ligação com o heparan sulfato, este age como co-receptor permitindo a interação dos FGFs com seus receptores (HAGIHARA et al., 2000; IBRAHIMI et al., 2004). Mais recentemente foi relatado que a ação do GDF-9 em induzir a expansão do cumulus também é dependente do HSPG, pois ele sequestra e facilita a interação do GDF-9 com o seu receptor presente no CCO (WATSON et al., 2012).

Em humanos, o gene GPC4 foi diferencialmente expressa nas células do *cumulus*, podendo ser um indicador da viabilidade do embrião (VAN MONTFOORT et al. 2008), já em bovinos, sua expressão foi diferencial em células do cumulus de ovócitos oriundos de folículos de diferentes tamanhos, sendo indicada como provável marcador para competência dos ovócitos (CORDEIRO, 2011).

Versican (VCAN), gene essencial para ovulação e fecundação, proteoglicano que pode ligar ao ácido hialurônico, sendo benéfico para a expansão das células do *cumulus*, por ser componente da matriz extracelular está envolvido na adesão celular, proliferação, migração e angiogênese, além de desempenhar um papel central na morfogênese e manutenção de tecidos

(RUSSELL et al., 2003; VAN MONTFOORT et al., 2008). Estudos têm relatado a alta expressão do gene VCAN em células do *cumulus* relacionado com a capacidade de desenvolvimento de embriões em humanos (WATHLET et al. 2011; XU et al., 2015) e em bovinos (MATOBA et al., 2014).

A glicose é a fonte primária de energia para a maioria das células, sendo a sua captação é essencial também para o desenvolvimento embrionário. O transporte de glicose para a célula é realizado pela membrana plasmática e mediado por dois mecanismos: o primeiro é ativo e dependente de sódio e, o segundo é passivo e depende de transportadores (SLC) para que a mesma seja internalizada (AUGUSTIN et al., 2001; PANTALEON et al., 2001). Os principais carreadores de glicose em células de mamíferos e embriões são SLC2A1, SLC2A2 e SLC2A3 (AUGUSTIN et al., 2001; HARVEY et al., 2004). A SLC2A3 é a principal e maior rota para entrada de glicose nos blastocistos (PANTALEON et al., 1997) e a SLC2A1 está relacionada com o fluxo que ocorre de glicose materna pelas células do trofoectoderma (PANTALEON et al., 2001). Vários grupos têm avaliado o padrão de expressão de genes desses transportadores de glicose durante o período pré-implantação em bovinos (BALASUBRAMANIAN et al., 2007; MACHADO et al. 2012). Diferentes sistemas de cultivo, assim como o sexo do embrião podem influenciar o padrão de expressão desses dois transportadores desses carreadores de glicose (HARVEY et al., 2004; BALASUBRAMANIAN et al., 2007; MORTON et al., 2007; MACHADO et al., 2013). Cordeiro (2011), utilizando a metodologia de microarranjo para comparar a expressão de CC provenientes de CCO com diferentes competências, encontrou uma expressão aumentada de SLC2A1 e SLC2A3 em CCs de ovócitos mais competentes. Diferença na expressão de genes que codificam esses transportadores também foram observados por Bermejo-Alvarez et al. (2010) que encontraram expressão aumentada de SLC2A1 em CCS de ovócitos maturados com baixa tensão de O<sub>2</sub>.

O gene que codifica a Keratin proteins 8 (KRT8), tem um papel importante na formação do blastocisto e, em sua posterior implantação, porque é sua responsabilidade a formação do citoesqueleto no

trofoectoderma, sua expressão foi alta em blastocistos bovinos e baixa em embriões com 2 células e mórula (EL-HALAWANY et al. 2004).

Machado et al., (2011) relataram superexpressão de KRT8 em embriões D14 fêmea. BUNEL et al. (2015) avaliaram a expressão de genes em CCs oriundas de CCO que chegaram ao estágio de blastocisto comparados com os embriões que pararam no início do desenvolvimento embrionário, em 2-8 células, e tiveram como resultado a alta expressão de KRT8 em CCs do grupo de embriões que pararam no estágio de 2-8 células.

### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Recuperação e Seleção dos ovócitos

Ovários de fêmeas mestiças (*Bos indicus* X *Bos taurus*) foram coletados em abatedouros locais e transportados em solução salina 0,9% (NaCl), suplementada com antibióticos (estreptomicina - 100µg/mL e penicilina G - 100 UI/ mL) à temperatura de 35-36° C. Os complexos-*cumulus*-ovócitos (CCO) foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro com auxílio de seringa 10mL e agulha 40x12. O material aspirado foi depositado em tubos plásticos de 15 mL (TPP®, Trasadingen, Suíça) e, após a formação do pellet, foram retirados 10 mL do líquido folicular que foram centrifugados por 5 minutos, à 37°C e à 700g, e utilizado para procura e seleção dos CCOs. O pellet contendo os ovócitos foi transferido para placas estéreis de poliestireno de 96 mm de diâmetro (TPP®) contendo líquido folicular e avaliado em lupa estereoscópica (Stemi SV6, Zeiss®, Germany). Os ovócitos com *cumulus* compacto, citoplasma homogêneo e possuindo pelo menos quatro camadas de células foram selecionados para serem utilizados para a maturação.

#### 3.2 Maturação *in vitro*

Imediatamente após a seleção, os CCOs foram transferidos, em número máximo de 30, para gotas de 200µL de meio de maturação cobertas com óleo mineral e foram cultivados por 22 horas à 38,5°C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O meio de maturação consistia de TCM-199 com sais de Earl's, suplementado com 250 mg/mL de amicacina, 10% de SFB, 10 mg/mL de L-glutamina, 1000 UI/mL de hormônio luteinizante (LH Sigma<sup>®</sup>) 1 UI/mL de FSH, 0,1µM/ mL de cisteamina (Sigma<sup>®</sup>) De acordo com o tratamento, os

ovócitos foram maturados individualmente em Microgotas de 20  $\mu$ L ou em sistema WOW. Para o sistema WOW, foi utilizada uma placa de cultivo celular de 4 poços (Placa 2004 WON, INGÁMED<sup>®</sup>, Maringá, Brasil), em que dois dos poços continham 36 micropoços. Após a seleção cada CCO, era lavado individualmente em gotas de meio MIV, e alojado dentro de um micropoço da placa, que era imediatamente identificado. Os micropoços eram cobertos com uma única gota de 200 $\mu$ L de meio MIV coberta com óleo mineral, e cultivados por 22 horas a 38,5°C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar (Figura 1).

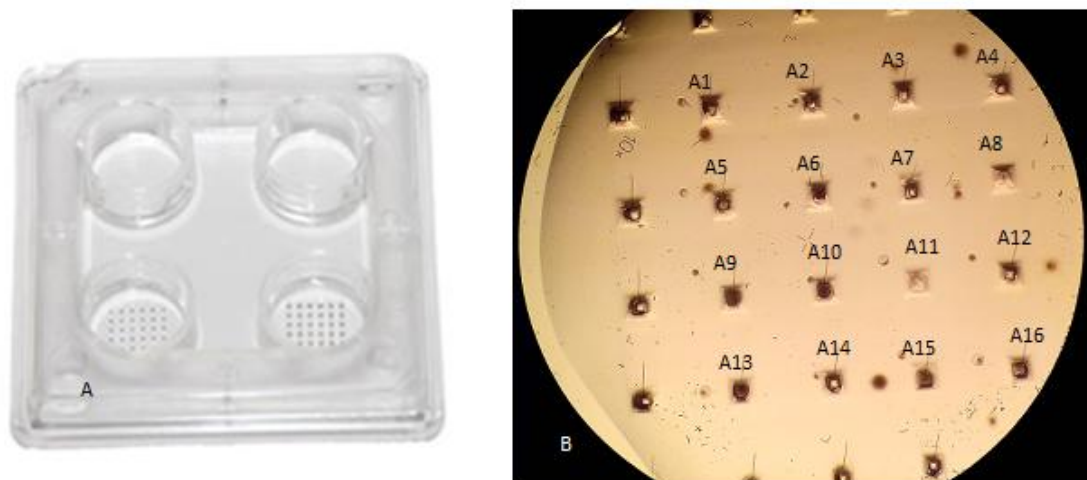


Figura 1. A) Placa utilizada para cultivo individual no sistema *Well of the Well* (WOW); B) Cultivo de Complexos – *Cumulus* - Ovócitos (CCO) individual no sistema WOW, em que cada poço recebeu um número de identificação.

No cultivo individual em Microgotas de 20  $\mu$ L, eram feitas 16 Microgotas devidamente identificadas em uma placa de Petri de 60 mm de diâmetro, cobertas com óleo mineral. Os CCOs eram lavados individualmente e transferidos um para cada gota, e maturados por 22 horas a 38,5°C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar (Figura 2).

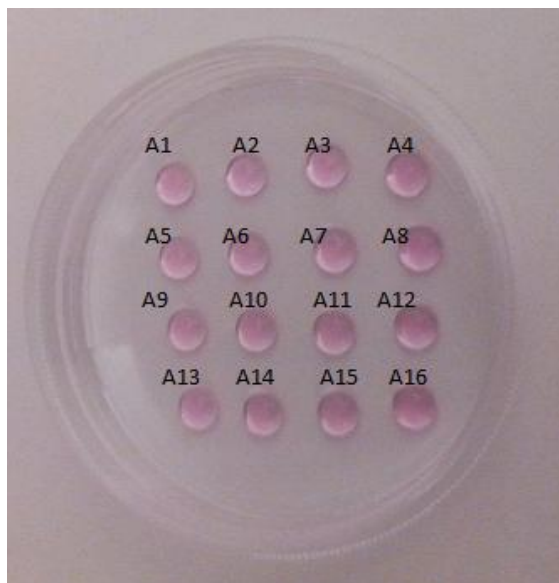


Figura 2. Cultivo individual de Complexos-cumulus-ovócitos em Microgota de 20 $\mu$ L.

### 3.3 Fecundação *in vitro*

Após a MIV os CCOs foram transferidos para gotas de meio de fecundação que consistia de meio *Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate* (TALP) (PARRISH et al., 1995) suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25 mM de hipotaurina, 25mM de epinefrina e 10 $\mu$ g/mL de heparina. Sêmen congelado da mesma partida de um touro da raça Nelore, previamente testado para a produção *in vitro* de embriões, foi utilizado para todos os tratamentos e réplicas.

Após o descongelamento os espermatozoides foram selecionados pelo método de gradiente de Percoll (GE® Healthcare, Piscataway, NJ, USA), utilizando 90% (400 $\mu$ L) e 45% (400 $\mu$ L) em microtubos de 1,5 mL, centrifugado por 5 minutos a 9.000g. O pellet obtido foi ressuspenso com meio TALP, e após a avaliação da concentração esse foi adicionado na gota de fecundação de forma a se obter uma concentração final de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL.

Os ovócitos ao serem retirados da MIV foram lavados duas vezes, e transferidos para gotas de meio de fecundação, cobertas com óleo mineral. Ovócitos e espermatozoides foram co-incubados a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em

ar por um período de 18 horas. O dia da inseminação foi considerado como D0.

No sistema WOW, os ovócitos maturados permaneceram na placa, sendo que o meio de maturação foi substituído pelo meio de fecundação por aspiração. Para o sistema em Microgotas de 20  $\mu$ L, como o volume utilizado para a inseminação era muito pequeno, foi preparado um volume de 350  $\mu$ l em que os espermatozoides foram adicionados de forma a manter a concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A partir desse meio contendo os espermatozoides eram então preparadas as Microgotas de FIV de 20  $\mu$ L em que os ovócitos maturados eram adicionados e levados para o co-cultivo.

### **3.4 Cultivo embrionário *in vitro***

Após o período de fecundação, os prováveis zigotos foram gentilmente pipetados para a remoção das células do *cumulus*, lavados duas vezes e transferidos para o meio de cultivo embrionário em gotas de 200 $\mu$ L cobertas por óleo mineral. O cultivo foi realizado a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 8 dias. O meio de cultivo era constituído de fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de sódio tri citrato, 2,77 mM de myo-inositol e 5% de SFB (SOFaaci– Holm et al., 1999). Os embriões foram avaliados em D2 para avaliação da clivagem e em D6, D7 e D8 pós-inseminação para a produção de blastocitos e taxa de eclosão.

Para o cultivo no sistema WOW, uma gota de 200 $\mu$ L de meio SOF foi adicionada em 1 poço da placa de 4 poços, e foi coberta por óleo mineral. Os prováveis zigotos foram retirados individualmente dos poçinhos da placa de FIV, lavados em SOF e transferidos para a nova gota de cultivo, mantendo a mesma posição que ocupavam no poço de maturação e fecundação. Para o cultivo em Microgota de 20 $\mu$ L, os prováveis zigotos foram retirados do meio FIV, lavados em meio SOF e transferidos para a nova placa de cultivo contendo 16 Microgotas de meio SOF, na mesma posição que ocupavam na placa de fecundação.

### 3.5 Biópsias das células do *cumulus*

As biópsias das células do *cumulus* foram realizadas com o auxílio de uma lâmina oftálmica (Straight 15°, ACCUTOME®®, Malvern, Pensilvânia, USA). Os CCO's foram colocados individualmente em gotas de 50µl de líquido folicular (previamente centrifugado à 700g por 5 minutos) e com o auxílio da lâmina um pequeno fragmento das células do *cumulus* foi retirado, evitando danificar o ovócito (Figura 3). Após a micromanipulação, os ovócitos foram colocados para maturar no devido sistema de cultivo e as biópsias foram individualmente lavadas em gotas de 50mL de solução salina em tampão fosfato (PBS), identificadas e armazenadas em microtubos contendo RNAlater (Ambion® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) -20°C, até serem utilizadas.

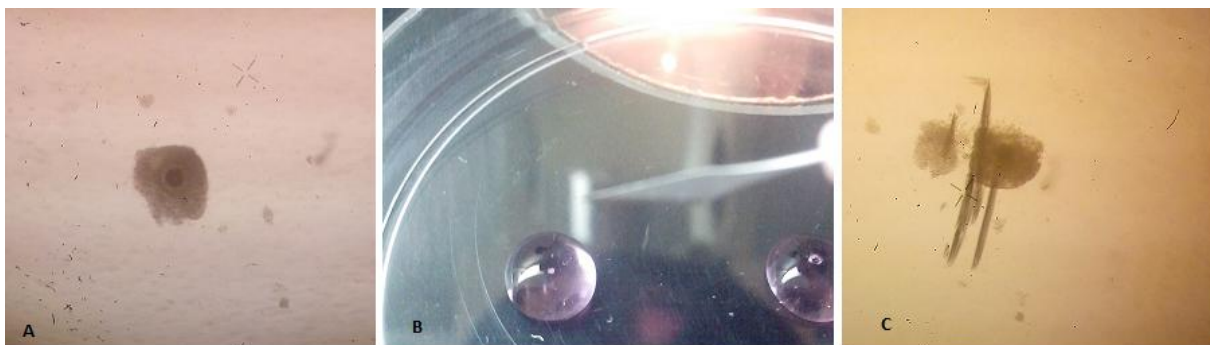


Figura3. A- Complexo *cumulus* ovócito (CCO) aspirado de folículo presente em ovários oriundo de abatedouro antes da biópsia, B- Gota com meio contendo CCO antes da biópsia; C- CCO após a biópsia das células do *cumulus*.

### 3.6 Quantificação pelo PCR em tempo-real (qRT - PCR)

Dos 11 genes avaliados neste trabalho, sete (GHR, FSHR e EGFR, GPC4, FGF11, IGFBP4, SPRY1, SLC2A1 e SLC2A3) foram selecionados a partir de resultados obtidos em nosso laboratório utilizando o modelo de tamanho de folículo como indicativo de competência (Caixeta et al., 2009, Cordeiro 2011). Os demais genes foram escolhidos por sua função e/ou por terem sido identificados em outros estudos como possíveis marcadores



(SLC2A1, SLC2A3, VCAN e KRT8) (NAKAMICHI et al., 2005; MORTON et al., 2007; BALASUBRAMANIAN et al., 2007; BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010; CORDEIRO, 2011; MACHADO et al., 2011; WATHLET et al., 2011; MATOBA et al., 2013; BUNEL et al., 2015; XU et al., 2015).

### **Extração do RNA e produção do cDNA**

O RNA total foi isolado usando o Kit RNeasy Plus Micro (Quiagen<sup>®</sup>, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante (com pequenas modificações). O volume total de RNA isolado foi utilizado para a síntese de cDNA, que foi realizada usando o kit First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante em um volume final de 40 µL. As reações foram realizadas a 65°C por 5 minutos e 50°C por 50 minutos, seguido pela inativação da enzima a 85°C por 5 minutos. As reações de qRT-PCR foram realizadas usando o kit Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima para cada par de primers (76 – 110%). Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e tamanho do amplicon em gel de agarose. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL usando cDNA correspondente a 0,175 biópsias de células do *cumulus*. As condições da PCR foram 95 °C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos e então anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos. O nome, a sequência, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento de cada gene estão listados na Tabela 1.

Em um experimento prévio, os perfis de amplificação para os três genes constitutivos, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH),  $\beta$ -Actin (ACTB) e Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) foram submetidos ao programa de análise GeNorm (VANDESOMPELE, 2002), que indicou o GAPDH como o gene mais estável. Este gene foi usado como referência para normalização dos dados. A expressão relativa de cada gene foi calculada

usando o método de  $\Delta\Delta Ct$  com correção da eficiência pelo método Pfaffl (Pfaffl 2001).

TABELA 1 - Sequência dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos em pares de base (pb) e referência de acesso ao *GenBank*.

Gene	Sequência	Temperatura de Anelamento	Fragmento amplificado (pb)	Número de acesso GenBank/Referência
<b>GAPDH</b>	F 5' GGCCTGAACACGAGAAGTATAA-3' R 5' CCCTCCACGATGCCAAAGT - 3'	60°C	119	NM_001034034.2
<b>EGFR</b>	F 5' AAAGTTTGCCAAGGGACAAG 3' R 5' AAAGCACATTTCTCGGATG 3'	53°C	253	XM_002696890.3
<b>GHR</b>	F 5' AGAGATTCATGCCGACATCC 3' R 5' CGTTGTCTGGTTCTCACACG 3'	54°C	210	JQ711177.1
<b>IGFBP4</b>	F 5' TGTGTGCGTGTGTGTTAATGAGCC 3' R 5' TTGGAAACATACCAGGGCTCTCCT 3'	60°C	108	NM_174557.4
<b>GPC4</b>	F 5' TGGTGAATCCCACAACCCAGTGTA 3' R 5' TCTCAGCCACCATCAGCATAGCAT 3'	60°C	192	NM_001205784.1
<b>SLC2A1</b>	F 5' CAGGAGATGAAGGAGGAGAGC 3' R 5' CACAAATAGCGACACGACAGT 3'	59°C	258	(BT029806)
<b>SLC2A3</b>	F 5' ACTCTTCACCTGATTGGCCTTGGA 3' R 5' GGCCAATTTCAAAGAAGGCCACGA 3'	62°C	145	(NM_174603.3)
<b>FGF11</b>	F 5' TTCACCCACTTCAACCTGATCCCT 3' R 5' AGACGCACTCCTTAAAGCGACACT 3'	60°C	148	XM_005220239.2
<b>SPRY1</b>	F 5' CATGTGCTTGGTCAAGGGCATCTT 3' R 5' TGTGACTGTGAACAGGAGCAAGGA 3'	60°C	93	XM_005217601.2
<b>FSHR</b>	F 5' GGATGCCATCATCGACTCTG 3' R 5' TGA CT CGAAGCTTGGTGAGAAC 3'	60°C	133	(NM_174061)
<b>VCAN</b>	F 5' TCATAGCCACCCCAGAGC 3' R 5' TTCCTTCCCACATCATGTCTC 3'	60°C	143	(NM_181035)
<b>KRT8</b>	F 5' TGTGAAGAAGATTGAGACCCGCGA 3' R 5' AAACCTCAGGTCTCCTGTGCAGAT 3'	60°C	160	(X12877/El-Sayed et al., 2006)

## IV - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. Experimento 1 Efeito da biópsia de células do *cumulus* de complexos - *cumulus*-ovócitos imaturos e do cultivo individual na produção *in vitro* de embriões.

Na primeira etapa deste experimento, foram testados vários tipos de lâminas oftálmicas, para escolher aquela que melhor se adaptava à manipulação. Foram testadas as lâminas Micro Feather® (OSAKA, JAPAN) 15° n° 715, 2.75mm Slit SHARPOINT®, 15° Stab EAGLE®, Slit Angled 2,75mm ACCUTOME®, (Malvern, PA, USA) e a Straight 15° ACCUTOME®, (Malvern, PA, USA), onde foram realizadas 50 biópsias de CCO com cada tipo de lâmina. Os CCO's eram colocados individualmente em gotas de 50µl de líquido folicular (previamente centrifugado à 700g por 5 minutos), para a realização das biópsias e assim escolher a lâmina que seria usada nos próximos experimentos. Para determinar o sistema de cultivo individual a ser utilizado no experimento 2, 399 CCOs foram distribuídos em três grupos: controle (C) em que os CCOs foram cultivados em grupos; WOW em que os CCOs foram cultivados individualmente no sistema WOW; e microgota, em que os CCOs foram cultivados em Microgotas de 20 µL. Após o período de maturação, os ovócitos de ambos os grupos foram fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV). No D2 os embriões foram avaliados para a taxa de clivagem e em D7 e D8 para a taxa de blastocisto e de eclosão.

Após escolher o sistema de cultivo, foi avaliado o efeito da biópsia na produção de blastocisto. Foram utilizados 4 grupos, o cultivo em grupo com e sem biópsias, e o cultivo em Microgotas de 20 µL com e sem biópsias, utilizando um total 478 CCO's.

As biópsias realizadas nos CCOs do grupo de cultivo individual biopsiado foram individualmente identificadas, lavadas em PBS, e armazenadas em microtubos com RNAlater a -20°C.

Após o período de maturação, os ovócitos de ambos os grupos foram fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV). No D2 os embriões foram

avaliados para a taxa de clivagem e em D7 e D8 para a taxa de blastocisto e de eclosão.

#### **4.2 EXPERIMENTO 2. Expressão de genes candidatos em células do *cumulus* de ovócitos capazes ou não de produzir embriões *in vitro***

Esse experimento visou validar a expressão de genes candidatos a marcadores moleculares para competência ovocitária em células do *cumulus* bovina. Para isso as biópsias de CCO's foram separadas em 3 grupos de acordo com o resultado da PIV: 1) oriundas de CCOs que formaram Blastocisto Expandido em D7; 2) oriundas de CCOs que clivaram após a FIV, mas que não chegaram ao estágio de blastocisto 3) oriundas de CCOs que não clivaram após a FIV..

Foram coletados 5 *pools* de cada grupo, sendo cada *pool* formado por 7 biópsias. Esses foram utilizados para a quantificação da expressão dos genes, GPC4, IGFBP4, FSHR, GHR, EGFR, FGF11, SLC2A1, SLC2A3, SPRY1, VCAN e KRT8, por PCR em tempo-real (qRT-PCR). Cada amostra foi analisada em triplicata, usando GADH como gene constitutivo.

#### **V - Análise estatística**

Os resultados obtidos de taxa de maturação e desenvolvimento embrionário foram analisados pelo teste do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Os dados de quantificação do padrão de expressão gênica foram avaliados para normalidade, e após foi feita análise de variância e teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney se apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Todas as análises foram avaliadas utilizando-se o programa Prophet Statistics, versão 5.0 (BBN Systems & Technologies, Cambridge, MA, 1996).

## VI - RESULTADOS

**Experimento 1** - Efeito da biópsia de células do cumulus de complexos - *cumulus*-ovócitos imaturos e do cultivo individual na produção *in vitro* de embriões.

No primeiro experimento foi estabelecido um método para a obtenção de biópsia de Complexos-*cumulus*-ovócitos imaturos, em que laminas com diferentes graus de inclinação foram testadas e, devido à praticidade de manipulação, foi escolhida a lâmina Straight 15° ACCUTOME®.

Para o estabelecimento do sistema de cultivo individual que foi utilizado para o experimento 2, foram testados dois sistemas, o cultivo em placas de 4 poços WOW e microgotas de 20 µL, os resultados de taxas de embriões em D2, D7 e D8 são apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os dois tipos de cultivo individual (WOW e Microgotas), quanto a produção de embriões sendo que ambos apresentaram taxas inferiores ao grupo controle.

Quando a velocidade de desenvolvimento foi avaliada, os resultados mostraram que em D8, os embriões cultivados individualmente eram mais atrasados apresentando menores taxas de embriões eclodidos em D8 comparados ao grupo controle (Tabela 3).

A biópsia não afetou ( $P>0,05$ ) a produção de embriões nem no grupo controle nem no grupo cultivado individualmente (Tabela 4). Mas a menor taxa de produção de embriões no grupo do cultivo individual foi mantida, ou seja, foi semelhante à observada na etapa anterior. Além disso, os embriões cultivados em Microgotas eram mais atrasados em seu desenvolvimento, apresentando em D8, menores taxas de embriões eclodidos em relação aos grupos controle cultivados em grupo (Tabela 5).

**Tabela 2.** Produção *in vitro* de embriões bovinos em sistemas de cultivo individual *well of the well* (WOW) e Microgota de 20µl (individual) comparados ao sistema em grupo (controle).

GRUPO	N. Ovócitos	Clivagem D2 (%)		Blastocisto D7 (%)		Blastocisto D8 (%)		Blastocisto Eclodido D8 (%)	
Controle	209	174	(83,3) <sup>a</sup>	94	(45) <sup>a</sup>	101	(48,3) <sup>a</sup>	29	(28,7) <sup>a</sup>
WOW	95	62	(65,3) <sup>b</sup>	17	(17,9) <sup>b</sup>	17	(17,9) <sup>b</sup>	1	(5) <sup>b</sup>
Microgota de 20 µl	95	61	(64,2) <sup>b</sup>	25	(26,3) <sup>b</sup>	26	(27,4) <sup>b</sup>	1	(3,8) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos. Por  $\chi^2$  (P≤0,05).

**Tabela 3.** Estágio de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*, no dia 7 e 8 de cultivo comparando o grupo controle (cultivo em grupo), cultivo no sistema *well of the well* (WOW) e em Microgotas de 20 µl (cultivo individual).

Grupo	Blastocistos (D7)						Blastocistos (D8)				
	Bi (%)	Bl (%)	Bx (%)	Bn (%)	Be (%)	TOTAL	Bl (%)	Bx (%)	Bn (%)	Be (%)	TOTAL
I controle LRA	9 (9.5) <sup>a</sup>	24 (25.5) <sup>a</sup>	47 (50) <sup>a</sup>	11 (11.7) <sup>a</sup>	3 (3.1) <sup>a</sup>	94	7 (6.9) <sup>a</sup>	53 (52.4) <sup>a</sup>	12 (11.8) <sup>a</sup>	29 (28.7) <sup>a</sup>	101
WOW	2 (11.7) <sup>a</sup>	5 (29.4) <sup>a</sup>	10 (58.8) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	17	3 (17.6) <sup>a</sup>	12 (70.5) <sup>a</sup>	1 (5.8) <sup>a</sup>	1 (5.8) <sup>b</sup>	17
Microgota de 20µL	4 (16) <sup>a</sup>	9 (36) <sup>a</sup>	12 (48) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	25	5 (19.2) <sup>a</sup>	16 (61.5) <sup>a</sup>	4 (15.3) <sup>a</sup>	1 (3.8) <sup>b</sup>	26

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos. Por  $\chi^2$  (P≤0,05).

Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl), Blastocisto expandido (Bx), Blastocisto em eclosão (Bn) e Blastocisto eclodido (Be)

**Tabela 4.** Produção *in vitro* de embriões comparando o grupo controle (cultivo em grupo) com e sem biópsia com o grupo cultivado em Microgotas de 20 µl com e sem biópsia (cultivo individual).

Grupo	Número ovócitos	Clivagem D2 (%)	Blastocistos D7 (%)	Blastocistos D8 (%)
Controle SEM	115	98 (85,2) <sup>a</sup>	55 (47,8) <sup>a</sup>	57 (49,6) <sup>a</sup>
Controle COM	121	109 (90,1) <sup>a</sup>	52 (43) <sup>a</sup>	58 (47,9) <sup>a</sup>
Microgota de 20 µl SEM	119	81 (68,1) <sup>b</sup>	24 (20,2) <sup>b</sup>	25 (21) <sup>b</sup>
Microgota de 20 µl COM	123	78 (63,4) <sup>b</sup>	31 (25,2) <sup>b</sup>	31 (25,2) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos. Pelo teste  $\chi^2$  ( $P \leq 0,05$ ).  
SEM- grupo sem biópsia, COM – grupo com biópsia

**Tabela 5.** Estágio de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, no dia 7 e 8 de cultivo no controle (cultivo em grupo) e em Microgotas de 20 µl (cultivo individual) de complexos – *cumulus* – ovócitos submetidos (COM) ou não (SEM) à biópsia de células do *cumulus*.

Grupo	Blastocistos (D7)					Blastocistos (D8)							
	Bi (%)	Bl (%)	Bx (%)	Bn (%)	Be (%)	TOTAL	%	Bl (%)	Bx (%)	Bn (%)	Be (%)	TOTAL	%
Controle SEM	2 (3.6)	10 (18.1) <sup>b</sup>	38 (69.0) <sup>a</sup>	2 (3.6)	3 (5.4)	55	47.8%	1 (1.7) <sup>a,b</sup>	30 (52.6) <sup>a</sup>	11 (19.2) <sup>a,b,c</sup>	15 (26.3) <sup>a,b</sup>	57	49.6%
Controle COM	1 (1.9)	14 (26.9) <sup>a,b</sup>	31 (59.6) <sup>a,b</sup>	5 (9.6)	1 (1.9)	52	43.0%	0 (0) <sup>a</sup>	33 (56.8) <sup>a</sup>	5 (8.6) <sup>a,c</sup>	20 (34.4) <sup>a</sup>	58	47.9%
Microgota 20 SEM	2 (8.3)	11 (45.8) <sup>a</sup>	11 (45.8) <sup>b</sup>	0 (0)	0 (0)	24	20.2%	1 (4) <sup>a,b</sup>	20 (80) <sup>b</sup>	1 (4) <sup>a,c</sup>	3 (12) <sup>b</sup>	25	21.0%
Microgota 20 COM	3 (9.6)	6 (19.3) <sup>b</sup>	21 (67.7) <sup>a,b</sup>	1 (3.2)	0 (0)	31	25.2%	2 (6.4) <sup>b</sup>	17 (54.8) <sup>a</sup>	8 (25.8) <sup>b</sup>	4 (12.9) <sup>b</sup>	31	25.2%

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos. Pelo teste  $\chi^2$  ( $P \leq 0,05$ ).

Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl), Blastocisto expandido (Bx), Blastocisto em eclosão (Bn) e Blastocisto eclodido (Be).

**Experimento 2** - Expressão de genes candidatos em células do *cumulus* de ovócitos capazes ou não de produzir embriões *in vitro*

A quantidade de RNA extraído de cada *pool* para ser utilizado na quantificação da expressão dos 11 genes selecionados está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Quantificação pelo Quantus Fluorometer (Promega) do RNA dos cinco pools de sete biópsias de células do *cumulus* de ovócitos imaturos, que não clivaram, que clivaram mas não desenvolveram e dos que se desenvolveram até o estágio de blastocisto (embriões).

POOLS	Embriões		Clivados		Não Clivados	
	$\eta/\mu\text{l}$	RNA TOTAL AMOSTRA ( $\eta\text{g}$ )	$\eta/\mu\text{l}$	RNA TOTAL AMOSTRA ( $\eta\text{g}$ )	$\eta/\mu\text{l}$	RNA TOTAL AMOSTRA ( $\eta\text{g}$ )
1	0.61	7.93	0.33	4.1	2.3	32.2
2	0.59	6.7	0.58	7.1	0.73	9.9
3	2.3	28.2	0.29	3.9	0.53	7.4
4	1	12	0.56	7.84	0.92	12.88
5	0.61	7.93	1.1	15.07	0.93	13.02
Média $\pm$ DP	1.02 $\pm$ 0,73	12.55 $\pm$ 8,97	0.57 $\pm$ 0,32	7.60 $\pm$ 4,52	1.08 $\pm$ 0,70	15.08 $\pm$ 9,84

A expressão de três dos 11 genes selecionados variou de acordo com os grupos (Figura 4). A abundância relativa de transcritos do gene GHR ( $P<0,10$ ) e VCAN ( $P<0,10$ ) foi maior nas CCs de ovócitos que chegaram a blastocisto, comparado com o grupo de ovócitos que não clivaram. Para o gene GPC4, as CCs dos que chegaram a blastocisto apresentavam maior expressão do que as CCs dos que clivaram mas não continuaram seu desenvolvimento ( $P=0,007$ ).



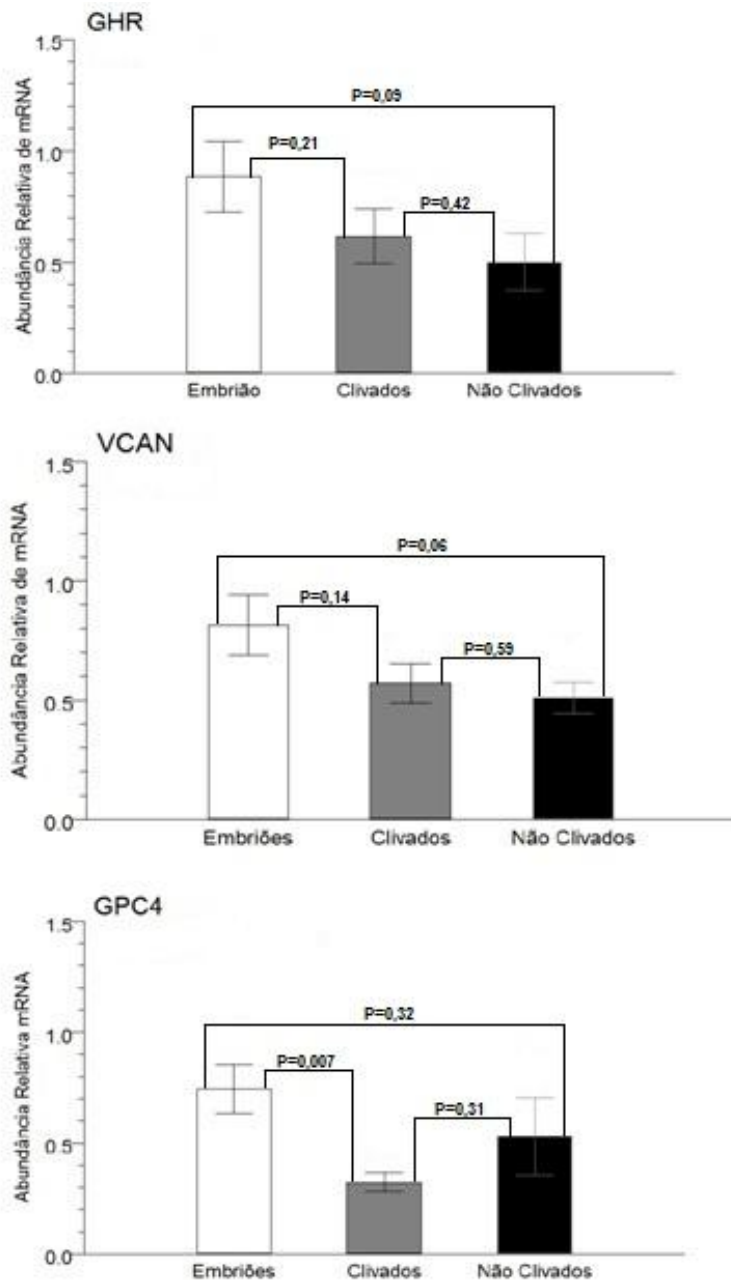


Figura 4. Nível de transcritos dos genes GHR, VCAN e GPC4 analisados por qRT-PCR em células do *cumulus* bovinas de complexos-*cumulus*-ovócitos de 3 grupos: CCOs que chegaram a blastocisto (Embriões), CCOs que clivaram mas não chegaram a blastocisto (Clivados) e CCOs que não clivaram (Não Clivados). Cada grupo possuía 5 *pools* de amostras e avaliados em triplicata. Os dados são referentes à média±EP.

Os níveis de transcritos para os genes IGFBP4, SPRY1, FSHR, SLC2A1, KRT8, FGF11, EGFR e SLC2A3 não diferiram entre as células do

*cumulus* obtidas de ovócitos que produziram blastocistos, que clivaram mas não chegaram ao estágio de blastocisto e os que não clivaram (Figura 5).

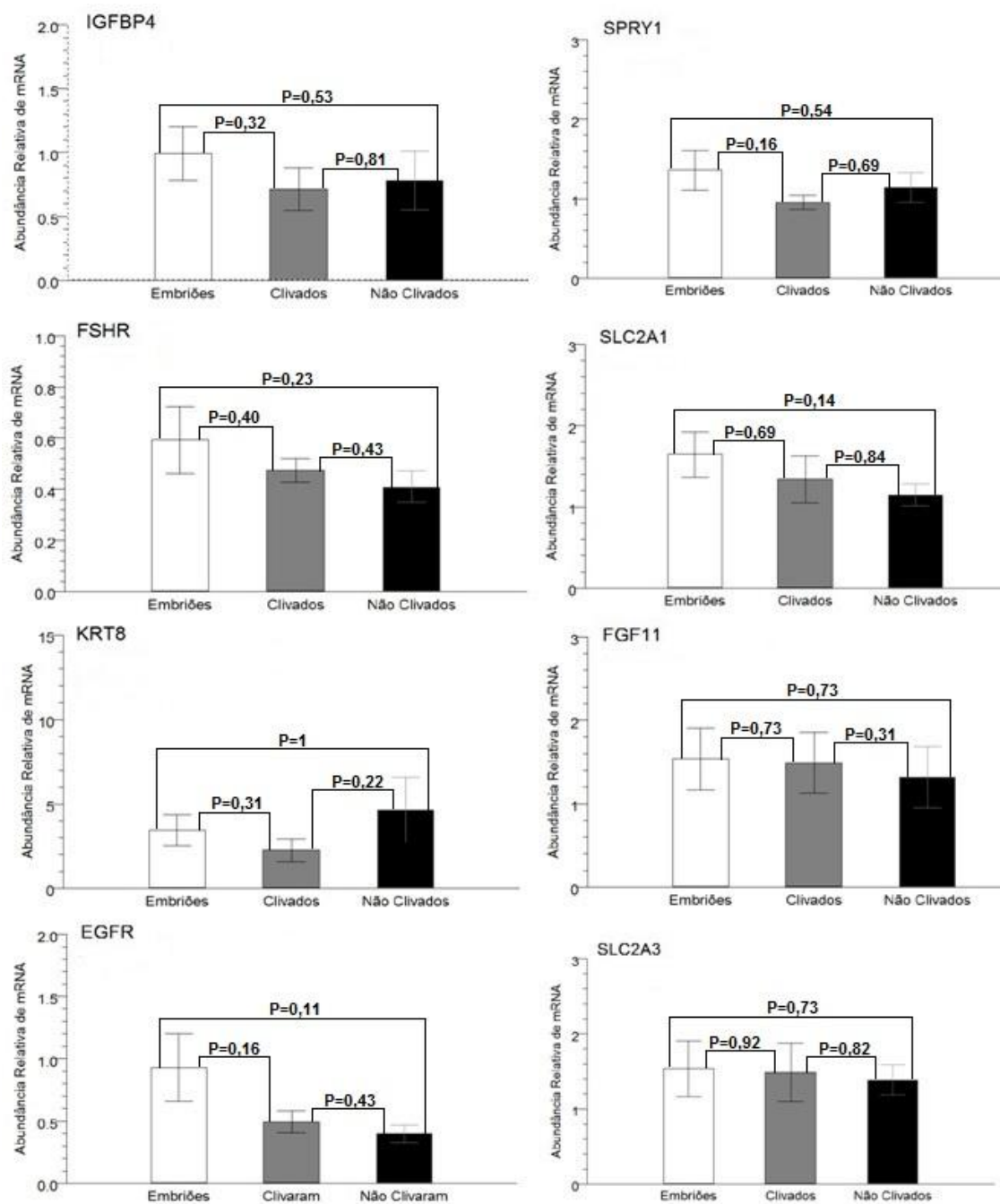


Figura 5. Nível de transcritos dos genes IGFBP4, SPRY1, FSHR, SLC2A, KRT8, FGF11, EGFR e SLC2A3 analisados por qPCR em células do *cumulus* bovinas de complexos-*cumulus*-ovócitos de 3 grupos: CCOs que chegaram a blastocisto (Embriões), CCOs que clivaram mas não chegaram a blastocisto (Clivados) e CCOs que não clivaram (Não Clivados). Cada grupo possuía 5 pools de amostras e avaliados em triplicata. ( $P < 0,10$ ). Os dados são referentes à média  $\pm$  EP.

## VII – DISCUSSÃO

As células do cumulus por manterem uma comunicação bidirecional com o ovócito (GILCHRIST et al., 2004; MAKABE et al., 2006; SIRARD et al., 2006), tem um papel importante na mediação de sinais parácrinos e na aquisição do potencial de desenvolvimento (ALBERTINI et al. 2001; SU et al., 2009; SUTTON-MCDOWALL et al., 2010). Portanto, a identificação de marcadores para competência ovocitária nessas células é uma alternativa para selecionar ovócitos mais competentes de modo não invasivo. Estudos em nosso laboratório utilizando CCs de CCOs com diferentes graus de competência identificaram, por análise de microarranjo, vários genes candidatos a marcadores para a competência ovocitária. E, apesar de alguns terem sido validados quanto à coincidência com os achados do microarranjo (CORDEIRO, 2011; manuscrito em preparação), para que possam ser efetivamente utilizados é necessário conferir a concordância com a capacidade de formar embrião. No presente estudo, alguns desses genes foram avaliados quantificando a sua expressão em biópsias de CCOs, que foram acompanhados individualmente para verificar a capacidade ou não de formar embriões.

Inicialmente foi estabelecido um método de coleta das CCs. Isso porque, trabalhos que utilizaram biópsia como forma de coletar uma pequena amostra de CCs de ovócitos imaturos são escassos e, não descrevem claramente o procedimento e seu possível efeito no ovócito (MATOBA et al., 2014; BUNEL et al., 2015). Além disso, um efeito negativo da biópsia de CCO imaturo no desenvolvimento embrionário também já foi relatado por Matoba et al. (2014).

Para o estabelecimento da biópsia, foram testadas lâminas oftálmicas com diferentes graus de inclinação, levando-se em conta, a praticidade da manipulação. Desta forma a lâmina selecionada foi a Straight 15° ACCUTOME®, pois após vários testes foi a mais prática de manipular.

Para que se possa avaliar marcadores para qualidade de ovócitos em CC, é necessário associar sua expressão com a capacidade dos CCOs de produzir embriões ou mesmo de estabelecer a gestação. Esse procedimento tem sido utilizado em humanos por vários grupos de pesquisa (FEWERSTEIN et al., 2007; van MONTFOORT et al., 2008; ASSOU et al., 2008; ANDERSON et al., 2009; ASSOU et al., 2010; WATHLET et al., 2011). Em bovinos, a maioria dos estudos avaliando a expressão de genes em CC utilizam outros modelos para obter CCs de ovócitos com diferentes competências, tais como ovócitos de vacas e bezerras (BETTEGOWDA et al., 2008; DORJI et al., 2012), folículos grandes e pequenos (LONERGAN et al., 1994; BLONDIN & SIRARD, 1995; FENG et al., 2007; RACEDO et al., 2008; CAIXETA et al., 2009; BESSA et al., 2013) e folículos expostos ou não ao LH (ASSIDI et al., 2010; BUNEL et al., 2013), em que os ovócitos foram cultivados em grupo.

No presente estudo, o acompanhamento individualizado de cada CCO era indispensável para atingir os objetivos. Portanto, foi necessário escolher um sistema de cultivo individual que melhor se adaptasse as condições do laboratório. Considerando que os relatos de cultivo individual em bovinos apresentam resultados variáveis (FERRY et al., 1994; HAGEMANN et al., 1998; HEDRIKSEN et al., 1999; FUKUI et al., 2000; VAJTA et al., 2000; MATOBA, 2014), foram testados dois sistemas, o sistema de cultivo individual chamado 'well of the well' (WOW) desenvolvido por Vajta e colaboradores (2000) e o sistema de Microgotas de 20 µL. No sistema WOW o cultivo é feito em pequenos poços cilíndricos em forma de 'V' no fundo da placa, de forma que os embriões ficam individualmente alocados, mas imersos sob a mesma gota de meio de cultivo não perdendo assim todos os benefícios do cultivo em grupo. O cultivo individual em microgotas imersas em óleo foi testado em vários estudos (CAROLAN et al., 1996; DONNAY et al., 1997; PEREIRA et al., 2005; FUJITA et al., 2006; NAGAO et al., 2008; GOOVAERTS et al., 2009) e apresenta como vantagem a praticidade.

Os resultados mostraram que as taxas de embriões não diferiram entre o sistema WOW e Microgotas de 20 $\mu$ L, mas foram inferiores ( $P < 0,05$ ) às taxas obtidas no grupo controle (Tabela 2). Esse resultado é justificável, pois segundo Gardner & Lane (2000), os embriões produzem fatores que favorecem o seu desenvolvimento e o dos embriões que estão a sua volta, sendo que no cultivo individual esse efeito benéfico é perdido. Entretanto, o grupo WOW, que deveria estar usufruindo desse benefício por estarem todos os embriões na mesma gota de cultivo não apresentou aumento na produção. Esses resultados discordam de resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório em que a produção de embriões foi similar para os cultivados em grupo, no sistema WOW ou em Microgota de 20  $\mu$ L (PEREIRA et al. 2005). É importante ressaltar que nesse estudo apenas o cultivo embrionário foi feito individualmente. Já no presente estudo todas as etapas, MIV, FIV e cultivo embrionário, foram feitos individualmente. Portanto, é possível que os resultados inferiores se devam, não só pela MIV e FIV terem sido feitas individualmente, mas também pelo aumento no tempo de manipulação de cada ovócito e embrião. Esses achados são similares ao relatados por Matoba et al. (2010), que testaram vários tipos de sistema para cultivo individual e todos apresentaram produção de blastocisto inferior ao cultivo em grupo.

Devido a maior facilidade de manipulação, o sistema de Microgota de 20 $\mu$ L foi escolhido para ser utilizado nos demais experimentos deste trabalho. A biópsia não interferiu no desenvolvimento embrionário, nem no cultivo em grupo nem no individual (Tabela 4). Matoba et al. (2014) testaram a biópsia de células do cumulus em ovócitos imaturos e maturados *in vitro*, e observaram uma queda significativa no desenvolvimento de blastocistos no grupo biopsiado de ovócitos imaturos em relação ao grupo controle. Não se sabe exatamente o porquê das diferenças nos resultados, mas alguns fatores como a maneira de retirar a biópsia e a quantidade de células recuperadas, certamente podem afetar o desenvolvimento posterior.

Dos genes avaliados três genes foram diferencialmente expressos entre as células do *cumulus* oriundas de CCOs que formaram Blastocisto Expandido em D7, de CCOs que não clivaram após a FIV e/ou de CCOs que clivaram após a FIV, mas que não chegaram ao estágio de blastocisto (Figura 4). Os genes VCAN e GHR apresentaram maior quantidade de transcritos em CCs oriundas de ovócitos que formaram blastocisto expandido em D7 do que nas CCs dos não clivados (Figura 4).

O VCAN é um proteoglicano que se liga ao ácido hialurônico na matriz do *cumulus* expandido. Além disso, o VCAN estabiliza o ácido hialurônico nas matrizes pericelulares e está envolvido na proliferação, migração e adesão celular, desempenhando papel central na manutenção de tecidos e morfogênese (RUSSELL et al., 2003; VAN MONTFOORT et al., 2008). Vários estudos em humanos relatam uma maior expressão desse gene em CCs de ovócitos que geraram embriões e/ou tiveram sucesso na gestação (GEBHARDT et al. 2011; WATHLET et al. 2011; EKART et al., 2013; XU et al., 2015), corroborando os achados do presente estudo da associação do VCAN com a competência ovocitária. Entretanto, Matoba et al. (2014), também trabalhando com bovino, não obtiveram expressão diferencial desse gene em CCs de ovócitos que formaram embriões e os que degeneraram no cultivo. Entretanto, no estudo de Matoba et al., (2014) as CCs utilizadas foram obtidas de ovócitos maturados *in vitro*, ou seja em estágio de MII. A diferença de expressão em diferentes estágios da meiose foi relatada por Wathlet et al. 2011 que observaram ser mais baixa em CCs de CCOs maturados (MII) comparados com os imaturos (VG). É possível que a quantidade de transcritos desse gene já esteja menor em ovócitos maturados devido a sua tradução que é necessária durante a maturação para processos tais como a expansão das CCs, e por isso Matoba et al. (2014) não detectaram diferenças na sua expressão.

A presença de GH no meio de maturação *in vitro* acelera a maturação nuclear, induz a expansão das CCs e melhora a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos, aumentando a produção de embriões *in vitro* (IZADYAR et al., 1998; KOLLE et al., 1998; BEVERS & IZADYAR, 2002; KOLLE et al., 2003). Sendo que esse efeito benéfico na maturação e no desenvolvimento embrionário

*in vitro* só ocorrem na presença das CCs, indicando que a sua ação se dá pela ligação com o seu receptor presente nessas células. No presente estudo foi detectada uma maior quantidade de transcritos para o gene GHR nas células do *cumulus* de CCOs que deram origem a blastocistos comparado com os CCOs que não clivaram (Figura 4). A associação da expressão do GHR e a competência ovocitária foi sugerida em estudos realizados em nosso laboratório, que mostraram que o nível de transcritos do GHR aumenta de acordo com o tamanho do folículo, sendo maior nas células do *cumulus* de folículos  $\geq 8,1$  mm (CAIXETA et al., 2009, CORDEIRO, 2011). O mesmo padrão de expressão foi demonstrado em folículos de cabras, em que os maiores folículos apresentavam maior expressão (MARTINS et al., 2014). É possível que a ligação do GH a seu receptor possa gerar um sinal, 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. Diante disso, pode-se supor que no presente estudo as CCs que apresentavam maior expressão desse gene foram obtidas de CCOs recuperados de uma população de folículos maiores e, que continham ovócitos mais competentes que originaram embriões de qualidade no D7.

Membro da família das glicanas, o GPC4 (Glypican 4) é uma proteoglicana de heparan sulfato (HSPG) associada a superfície celular que está envolvida em vários processos biológicos incluindo a regulação de fatores de crescimento, adesão, sinalização, proliferação e diferenciação celular (DREYFUSS et al., 2009; FICO et al., 2011). Essas ações se devem a variedade estrutural do heparan sulfato, que permite a sua ligação e interação com uma ampla gama de proteínas, como fatores de crescimento, quimiocinas, substâncias morfogênicas, componentes da matriz extracelular, enzimas, entre outros (DREYFUSS et al., 2009). Está bem estabelecido que os FGFs são dependentes da ligação com o Heparan sulfato, que age como co-receptor, permitindo a interação dos FGFs com seus receptores (HAGIHARA et al., 2000; IBRAHIMI et al., 2004). Mais recentemente, foi relatado que a ação do GDF-9 em induzir a expansão do *cumulus* também é dependente do HSPG, que o

sequestra e facilita a sua interação com o seu receptor presente no CCO (WATSON et al., 2012).

No presente estudo, a quantidade de transcritos de GPC4 em CCs de CCOs que formaram blastocistos expandidos foi maior do que nas CCs dos que clivaram mas não seguiram seu desenvolvimento (Figura 4). Resultados similares aos nossos foram relatados por Van Montfoort et al. (2008), que avaliaram a expressão do GPC4 em CCs humanas e observaram menor expressão em CCs de embriões que tiveram uma clivagem atrasada comparado com embriões que clivaram no momento esperado. Esses dados indicam que a expressão desse gene pode ser um indicador da viabilidade embrionária.

A expressão diferencial desse gene foi detectada em CCs de ovócitos de diferentes competências utilizando o modelo de tamanho do folículo em análise de microarranjo e, posteriormente validada por qRT-PCR em nosso laboratório (CORDEIRO, 2011; manuscrito em preparação). O padrão de expressão do GPC4 refletiu a qualidade do ovócito e seu grau de competência, diminuindo à medida que aumentou o tamanho do folículo e a competência do ovócito. Considerando que esse gene está envolvido na proliferação celular e controle de fatores de crescimento, os resultados são coerentes, pois folículos menores contendo ovócitos menos competentes, precisam ainda crescer e, portanto, necessitam de maior expressão de GPC4.

Mesmo parecendo conflitante os resultados encontrados no nosso laboratório por Cordeiro (2011; manuscrito em preparação) e os do atual estudo, os achados de ambos são justificáveis pela função biológica da GPC4 de proliferação celular e controle de fatores de crescimento, importantes para a qualidade do ovócito. Pois folículos pequenos (1 a 3 mm) precisam ainda crescer e, portanto, necessitam de maior expressão de GPC4 (CORDEIRO, 2011), já no modelo do nosso trabalho onde foram utilizados nos três grupos testados uma população de CCOs heterogênea obtida de folículos de 3-8 mm, pode-se supor que independente do tamanho do folículo de origem do ovócito, apresentou expressão aumentada de GPC4 aquelas CCs oriundas de folículos competentes, ou seja, os CCOs que chegaram a embrião foram aqueles com maior expressão de GPC4. Hipoteticamente, um CCO de um folículo de 6 mm



do grupo que chegou a embrião, vai apresentar expressão maior de GPC4 comparado com um CCO de um folículo de 6 mm do grupo que clivou mas não seguiu seu desenvolvimento, assim como um CCO de um folículo pequeno terá expressão mais alta nas CCs dos ovócitos que viraram blastocistos comparado com o folículo pequeno do grupo que clivou e não chegou à blastocisto expandido.

Além disso, dentre os genes avaliados o GPC4 foi o único que foi detectado tendo expressão diferencial em CCOs que clivaram e não se desenvolveram e, não foi associado com os que não clivaram. Em termos práticos, um biomarcador não invasivo deve indicar os que têm competência para o desenvolvimento e os que não têm potencial para se desenvolverem. Essa diferenciação é mais importante do que a com os não clivados, já que esses últimos podem ser facilmente identificados logo no início do cultivo embrionário. Portanto, apesar dos outros dois genes terem sido confirmados como marcadores, o GPC4 parece ser o mais indicado para selecionar CCOs, o que é consistente com achados anteriores de nosso laboratório.

Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento de um sistema de padrão de expressão gênica que possa identificar os ovócitos mais competentes utilizando as CCs. Essa possibilidade de prever a qualidade do ovócito e de sua capacidade de desenvolvimento de forma não invasiva trará muitos benefícios para PIVE, incluindo redução de custos e aumento das taxas de gestação.

## VIII – CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

A biópsia de células do *cumulus* de ovócitos imaturos não afeta a produção de embriões. Portanto, associada ao cultivo individual pode ser utilizada para obter RNA para estudos de validação de marcadores moleculares, mesmo com a redução da produção de blastocisto devido ao sistema de cultivo.

Os genes GHR, VCAN e GPC4 foram diferencialmente expressos em células do cumulus de ovócitos que deram origem a blastocisto expandido em D7.

Entretanto, o gene GPC4 é o que melhor indica o grau de competência e a qualidade do ovócito, podendo este gene ser um marcador não invasivo de competência ovocitária.

## IX – REFERÊNCIAS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.57-66, 2002.

ADONA, P. R. **Efeito de diferentes inibidores específicos do fator promotor da maturação (MPF) na retenção da meiose em ovócitos bovinos in vitro**. Rio de Janeiro: Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2002, 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Norte Fluminense, 2002.

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-653, 2001.

ALM, H.; TORNER, H.; LÖHRKE, B.; VIERGUTZ, T.; GHONEIM, I.M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v. 63, p. 2194-2205, 2005.

ANDERSON, R.A.; SCIORIO ,R.; KINNELL, H.; BAYNE, R.A.L.; THONG, K.J., DE SOUSA, P.A.; PICKERING, S. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilization, embryo development and competence to establish a pregnancy. **Reproduction**, v.138, p.629–637, 2009.

ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; MORATÓ, R.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 290-303, 2008.

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

ASSIDI, M.; DIELEMAN, S. J.; SIRARD, M. A. Cumulus cells gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: Potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, v. 140, p. 835–852, 2010.

ASSIDI, M.; MONTAG, M.; VAN DER VEN, K.; SIRARD, M. A. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, p.173-188, 2011.

ASSOU, S.; HAOUZI, D.; MAHMOUD, K.; AOUACHERIA, A.; GUILLEMIN, Y.; PANTESCO, V.; et al. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. **Molecular Human Reproduction**, v.14, p. 711-719, 2008.

ASSOU, S.; HAOUZI, D.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S. “Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes,” **Molecular Human Reproduction**, v.16, n. 8, p. 531–538, 2010.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally regulated *in vitro* derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, p.370-376, 2001.

BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W.J.; MOHANA KUMAR, B.; OCK, S.A.; YOO, J.G.; IM, G.S.; CHOE, S.Y.; RHO, G.J. Expression pattern of oxygen and stress-

responsive gene transcripts at various developmental stages of *in vitro* and *in vivo* preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v. 68, p. 265-275, 2007.

BESSA, I.R.; NISHIMURA, R.C.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N . Transcription Profile of Candidate Genes for the Acquisition of Competence During Oocyte Growth in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. n/a-n/a, 2013.

BEENKEN, A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, Mar, v. 8, n. 3, p. 235-253, 2009.

BERMEJO-A´LVAREZ, P.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. **Reproductive BioMedicine Online** , v.20 , n.3, p. 341 – 349, 2010.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O.V.; LEE, K.B.; PARK, K.E.; SALEM, M.; YAO, J.; IRELAND, J.J.; SMITH, G.W. Identification of novel bovine cumulus cells molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. **Biology of Reproduction**, v.79, p.301-309, 2008.

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.

BHOJWANI, S.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 67, p. 341-345, 2007.

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.

BOLS, P. E. J.; JORSSEN, E.P.A.; GOOVAERTS, I.G.F.; LANGBEEN, A.; LEROY, J.L.M.R. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction**, v.9, p.420-425, 2012.

BOOTH, P.J.; WATSON, T.J.; LEESE, H.J. Prediction of porcine blastocyst formation using morphological, kinetic and amino acid depletion and appearance criteria determined during the early cleavage of *in vitro*-produced embryos. **Biology of Reproduction**. v. 77, p. 765–779, 2007.

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

BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Cytoplasmic remodeling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 23–38, 2007.

BUNEL, A.; NIVET, A.L.; BLONDIN, P.; VIGNEAULT, C.; RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Cumulus cell gene expression associated with pre-ovulatory acquisition of developmental competence in bovine oocyte. **Reproduction, Fertility and Development**, v.26, n.6, p.855-865, 2013.

BUNEL, A.; JORSSEN, E.P.; MERCKX, E.; LEROY, J.L.; BOLS, P.E.; SIRARD, M.A. Individual bovine *in vitro* embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. **Theriogenology**, v. 83, p.228–237, 2015.

BURATINI JR, J.; TEIXIRA, A.B.; COSTA, I.B. et al., Expression of Fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**. v.130, p. 343-350, 2005

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.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. *In vitro* production of bovine embryos using individual oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.145-150, 1996.

CATALA, M.G.; IZQUIERDO, D.; UZBEKOVA, S.; MORATO, R.; ROURA, M.; ROMAGUERA, R.; PAPILLIER, P.; PARAMIO, M.T. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. **Reproduction**, v.142, p.517–527, 2011.

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

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

CAIXETA, E. ; SUTTON-MCDOWALL, M. ; GILCHRIST, R. B. ; THOMPSON, J. G. ; PRICE, C. ; MACHADO, M. F. ; LIMA, P. F. ; BURATINI, J. . Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake and expression of genes in the ovulatory cascade

during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. **Reproduction**, v. 146, p. 27-35, 2013.

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

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.

CORDEIRO, D. M. **Identificação de marcadores moleculares para a competência ovocitaria em células do cumulus bovinas**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 135 p. Tese de Doutorado.

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

DEVJAK, R.; FON TACER, K.; JUVAN, P.; VIRANT KLUN, I.; ROZMAN, D.; et al. Cumulus Cells Gene Expression Profiling in Terms of Oocyte Maturity in Controlled Ovarian Hyperstimulation Using GnRH Agonist or GnRH Antagonist. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, e47106, 2012.



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

DIAZ, F.J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.J. Oocytes determine *cumulus* cell lineage in mouse ovarian follicles. **Journal of Cell Science**, v. 120, 1330-1340, 2007.

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.

DONNAY, I.; VAN LANGENDONCKT, A.; AUQUIER, P.; GRISART, B.; VANSTEENBRUGGE, A.; MASSIP, A.; DESSY, F. Effects of coculture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.47, p.1549-1561, 1997.

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.

DORJI.; OHKUBO, Y.; MIYOSHI, K.; YOSHIDA, M. Gene expression differences in oocytes derived from adult and prepubertal japanese black cattle during *in vitro* maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.392-402, 2012.

DOWNS, S.M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.39, p. 65-79, 1993.

DRAGOVIC, R.A.; RITTER, L.J.; SCHULTZ, S.J.; AMATO, F.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRST, R.B. Secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse *cumulus* cell expansion. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 848-857, 2007.

DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V.; JARROUGE, T. R.; et al.. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, Sept., 2009.

EKART, J.; MCNATTY, K.; HUTTON, J.; PITMAN, J. Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. **Human Reproduction**, v.28, n.11, p. 2930–2942, 2013.

EL-HALAWANY, N.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K. Quantitative expression analysis of blastocyst – derived gene transcripts in preimplantation developmental stages of in vitro produced bovine embryos using real polymerase chain reaction technology. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 753-762, 2004.

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

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

EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. **Journals of Reproduction & Fertility**, v. 85, 1989.

FAEDO, A.; BORELLO, U.; RUBENSTEIN, J.L. Repression of FGF signaling by sprout 1-2 regulates cortical patterning in two distinct regions and times. **Journal of Neuroscience**, Mar 17, v. 30, n.11, p. 4015-4023, 2010.

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.

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.

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

FELFLY, H., & KLEIN, O. D. Sprouty genes regulate proliferation and survival of human embryonic stem cells. **Scientific Reports**, v.3, p.2277, 2013.

FENG, W.G.; SUI, H.S.; HAN, Z.B.; CHANG, Z.L.; ZHOU, P.; LIU, D.J. 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.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural

and biochemical modification and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009.

FERRY, L.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. **Theriogenology**, v. 42, p. 445-453, 1994.

FEUERSTEIN, P.; CADORET, V.; DALBIES-TRAN, R.; GUERIF, F.; BIDAULT, R.; ROYERE, D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. **Human Reproduction**, v. 22, p. 3069–3077, 2007.

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

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

FORTUNE, F.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.

FOULADI NASHTA, A.A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K.H.S. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development in vitro: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biology of Reproduction**. v. 59, p. 255-262, 1998

FUJITA T, UMEKI H, SHIMURA H, KUGUMIYA K, SHIGA K. Effect of group culture and embryo-culture conditioned medium on development of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 137-142, 2006.

FUKUI, Y.; KIKUCHI, Y.; KONDO, H.; MIZUSHIMA, S. Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 1553-1565, 2000.

GANDOLFI, T.A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, p. 1255-76, 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 et Technique (Paris)**, v. 24, p. 413-423, 2005.

GARDNER, D. K.; LANE, M. **Embryo culture systems**. IN: THOUNSON, A. O. and GARDNER, D. K. (Ed.) Handbook of in vitro fertilization, CRC, 2 ed., cap 11, 558 p., 2000.

GEBHARDT, K.M.; FEIL, D.K.; DUNNING, K.R.; LANE, M.; RUSSELL, D.L. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 96, n.1, July, 2011.

GESHI, M.; YONAI, M.; SAKAGUCHI, M.; NAGAI, T. Improvement of in vitro co-culture system for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol. **Theriogenology**, v.51, p.551-558, 1999.

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

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

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. 431-46, 2004.

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

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. 340p.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryo**. CAB International, University Press, Cambridge, 640p, 1994.

GOTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência para aquisição de competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 82-94, 2009.

GOOVAERTS, I.G.; LEROY, J. L.; VAN SOOM, A.; DE CLERCQ, J.B.; ANDRIES, S.; BOLS, P.E. Effect of cumulus cell co-culture and oxygen tension on the *in vitro* developmental competence of bovine zygotes cultured singly. **Theriogenology**, v. 71, p.729–738, 2009.

GOOVAERTS, I.G.F.; LEROY, J.L.M.R.; JORSSSEN, E.P.A., BOLS, P.E.J. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture (review). **Theriogenology**, v.74, p. 1509-1520, 2010.

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

HAGEMANN U.; WEILERT, L.L.; BEAUMONT, S.E.; TERVIT, H.R. Development of bovine embryos in single *in vitro* production (sIVP) systems. **Molecular Reproduction and Development** , v.51, p.143-147, 1998.

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

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

HAMEL, M.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; GRAVEL, C.; LEVEILLE M. C.; LEADER, A. & SIRARD, M. A. 2008. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. **Human Reproduction**, v. 23, p. 1118–1127, 2008.

HAMEL, M.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; LEVEILLE, M.C.; LEADER, A.; SIRARD, M.A. Genomic assessment of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, p.87–96, 2010.

HANAFUSA, H.; TORII, S.; YASUNAGA, T.; NISHIDA, E. Sprouty1 and Sprout2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signaling pathway. **Nature Cell Biology**, Nov, v. 4, n.11, p. 850-858, 2002.

HARVEY, A. J.; KIND, K. L.; PANTALEON, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1108–1119, 2004.

HENDRIKSEN, P.J.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S. Single IVP using BRL cell co-culture and serum yields a lower blastocyst rate than group culture. **Theriogenology**, v.51, p.319, 1999.

HOELKER, M.; RINGS, F.; LUND, Q.; GHANEM, N.; PHATSARA, C.; GRIESE, J.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Effect of microenvironment and embryo density on developmental characteristics and gene expression profile of bovine preimplantative embryos cultured *in vitro*. **Reproduction**, v. 137, p.415-425, 2009.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHIMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683-700, 1999.

IBRAHIMI, O. A.; ZHANG, F.; HRATKA, S. C.; MOHAMMADI, M.; LINHARDT, R. J. Kinetic model for FGF, FGFR and proteoglycan signal transduction complex assembly. **Biochemistry**, v. 43, n.16, p. 4724-4730, 2004.

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.

JIANG, Z.; RIPAMONTE, P.; BURATINI, J.; PORTELA, V.; PRICE, C. Fibroblast growth factor-2 regulation of sprouty and NR4A genes in bovine ovarian granulosa cells. **Journal of Cellular Physiology**, Nov 10, p. 1820-1827, 2010.

JOHNSON, M.H. **Ovarian function in the adult**. In: Johnson and Everitt (eds). *Essential Reproduction*, 6<sup>th</sup> edn. Blackwell Scientific Ltd, Oxford, UK, p.82-91, 2007.



JONES, J.I.; CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 3-34, 1995.

KANAYAMA, N.; MIYANO, T.; LEE, J. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 Kinase and MAP kinase. **Zygote**, v. 10, p. 261-270, 2002.

KELLEY, K.M.; OH, Y.; GARGOSKY, S.E.; GUCEV, Z.; MATSUMOTO, T.; HWA, V.; NG, L.; SIMPSON, D.M.; ROSENFELD, R.G. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. **International Journal Biochemistry and Cell Biology**, v.28, p.619-637, 1996.

KESKINTEPE, L. & BRACKETT, B. In vitro developmental competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and culture in completely defined media. **Biology of Reproduction**, v.55, p. 333-339, 1996.

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 hormonerelated 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 of Animal Science**, v. 82 (Suppl. E):E14–E23, 2004.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v.62, p.292-302, 2000.

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

KWON, H.; CHOI, D.; BAE, J., et al. mRNA expression pattern of insulin-like growth factor components of granulosa cells and cumulus cells in women with and without polycystic ovary syndrome according to oocyte maturity. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2417-2420, 2010.

LAGER, A. E.; KOCABAS, A. M.; OTU, H. H.; RUPPEL, P.; LANGERVELD, A.; SCHNARR, P.; SUAREZ, M.; JARRETT, J. C.; CONAGHAN, J.; ROSA, G. J. M.; FERNANDEZ, E.; RAWLINS, R. G.; CIBELLI, J. B.; CRESBY, J. A. Identification of a novel gene set in human cumulus cells predictive of an oocyte's pregnancy potential. **Fertility and Sterility**, v. 99, p. 745-752, 2013.

LIM, J.M.; HANSEL, W. Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized *in vitro* and cultured singly in a defined medium. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p.1199-1205, 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.

MACHADO, G.M.; CAIXETA, E.S.; LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N . Post-hatching development of bovine embryos in vitro: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, v. 20, p. 123-134, 2012.

MACHADO, G. M.; FERREIRA, A.R.; GUARDIEIRO, M.M.; BASTOS, M.R.; Carvalho, J. O.; LUCCI, C. M. ; DIESEL, T.O. ; Sartori, R.; Rumpf, R.; Franco, M. M.; Dode, M. A. N.. Morphology, sex ratio and gene expression of Day 14 in vivo and in vitro bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 600, 2013.

MADDOX-HYTTEL, P.; BJERREGAARD, B.; LAURINCIK, J. Meiosis and embryo technology: renaissance of the nucleolus. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p. 3-13, 2005.

MAKABE, S.; NAGURO, T.; STALLONE, T. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. **Microscopy Research and Technique**, Review, Jun; 69, v. 6, p. 436-439, 2006.

MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M. ; ALMEIDA, A.P.; CELESTINO, J.J.H.; PADILHA, R.T.; CUNHA, R.M.S.; SILVA, J.R.V.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Presence of growth hormone receptor (GH-R) mRNA and protein in goat ovarian follicles and improvement of in vitro preantral follicle survival and development with GH. **Theriogenology**, v.82, n.1, p. 27-35, 2014.

MASON, H. D.; CWYFAN-HUGHES, S.; HOLLY, J. M.; FRANKS, S. Potent inhibition of human ovarian steroidogenesis by insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4). **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, p. 284-287, 1998.

MATOBA, S.; FAIR, T.; LONERGAN, P. Maturation, fertilisation and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: a tool for studying oocyte developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 839–851, 2010.

MATOBA, S.; BENDER, K.; FAHEY, A. G.; SOLOMON, M.; BRENNAN, L.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. **Reproduction, Fertility and Development**, v.26, n.2, p. 337-345, 2014.

MINGOTI, G.Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides.** São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo, 2000. 135p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo, 2000.

MIYANO, T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. **Theriogenology**, v. 59, p. 61-72, 2003.

MORTON, K. M., HERRMANN, D., SIEG, B., STRUCKMANN, C., MAXWELL, W. M. C., RAHT, D., EVANS, G., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H., AND WRENZYCKI, C. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 931–940, 2007.

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.

NAGAO, Y.; IJIMA, R.; SAEKI, K. Interaction between embryos and culture conditions during *in vitro* development of bovine early embryos. **Zygote**, v.16, p.127-133, 2008.

NAKAMICHI, I.; TOIVOLA, D.M.; STRNAD, P.; MICHIE, S.A.; OSHIMA, R.G.; BARIBAUT, H.; et al. Keratin 8 overexpression promotes mouse Mallory body formation. **Journal of Cell Biology**, v.171, p. 931-937, 2005.

O'NEILL, C. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.56, p.229-237, 1997.

ONGERI, E.M. & KRISHER, R.L. Glucose and pyruvate metabolism and preimplantation goat blastocist following *in vitro* fertilization and pathernogenetic activation. **Cloning Stem Cells**, v. 3, p. 115-123, 2001.

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.

PALMA, G.A.; CLEMENT-SENAEWALD, A.; BERG, U.; BREM, G. Role of the embrvo number in the development of *in vitro* produced bovine'kmbryos. **Theriogenology**, v.37, p. 271, 1992.

PANTALEON, M.; HARVEY, M.B.; PASCOE, W.S.; JAMES, D.E.; KAYE, P.L. Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. **Developmental Biology**, v. 94, p. 3795-3800, 1997.

PANTALEON, M.; RYAN, J.P.; GIL, M.; KAYE, P.L. An unusual subcellular localization of GLUT1 and link with metabolism in oocyte and preimplantation mouse embryo. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1247 – 1254, 2001.

PARIA, B.C.; DEY, S.K. Preimplantation embryo development *in vitro*. cooperative interactions among embryos and role of growth factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p:4756-4760, 1990.

PEREIRA, D.C.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 63, p. 1131-1141, 2005.

PFEFFER, P.L.; SISCO, B.; DONNISON, M.; SOMERS, J.; SMITH, C. Isolation og genes associated with developmental competency of bovine oocyte. **Theriogenology**, v. 68, p. S84-S90, 2007.

PICTON, H.M.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R.G. The molecular basis of oocyte growth and development. [Review]. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. (1-2), p. 27-37, 1998.

PICTON, H.M.; HARRIS, S.E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E.L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, p. 703–715, 2008.

PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M.T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v. 61, p.735-44, 2004.

PONTES, J.H.F.; MELO-STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBNIC, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-1646, 2011.

QUETGLAS, M. D. **Efeito do bloqueio meiótico na expressão, atividade e distribuição do fator promotor da meiose (MPF) e da proteína cinase ativada por mitose (MAPK) em oócitos bovinos.** Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2007. 90p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2007.

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.

REED, W.A.; SUH, T.K.; BUNCH, T.D.; WHITE, K.L. Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver (BRL) cells, or BRL-cell-conditioned medium. **Theriogenology**, v.45, p.439-449, 1996.

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.

ROBERT, C.; GAGNE, D.; BOUSQUET, D.; BARNES, F. L.; SIRARD, M-A. Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger RNA associated with bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1812-1820, 2001.

RODRÍGUEZ-GONZÁLES, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; VELILLA, E.; PARAMIO, M.T. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. **Theriogenology**, v.57, p. 1397-409, 2002.

ROMAR, R.; DE SANTIS, T.; PAPILLIER, P.; PERREAU, C.; THELIE, A.; DELL' AQUILA, M.E.; MERMILLOD, P.; DALBIES-TRAN, R. Expression of maternal transcripts during bovine oocyte in vitro maturation is affected by donor age. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. e23-30, 2011.

RUSSELL DL, OCHSNER SA, HSIEH M, MULDER S, RICHARDS JS. Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. **Endocrinology**, v. 144, n.3, p. 1020-1031, 2003.

RUSSELL, D. L.; SALUSTRI, A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. **Seminars in Reproductive Medicine**, Sep., v. 24, n.4, p. 217-227, 2006.

SABATEL, C.; CORNET, A.M.; TABRUYN, S.P.; MALVAUX, L.; CASTERMANS, K.; MARTIAL, J.A.; STRUMAN, I. Sprouty1, a new target of the angiostatic agent 16k prolactin, negatively regulates angiogenesis. **Molecular Cancer**, Sep 2, v.9, p.231, 2010.

SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, M.; HASCALL, V. C. Synthesis and accumulation of Hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle stimulating hormone-induced maturation. **Journal of Biological Chemistry**, Aug 15, v. 264, n.23, p. 13840-13847, 1989.

SATHANANTHAN, A. H. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: unique aspects of the human oocyte. **Microscopy Research and Technique**, v. 27, p. 145-164, 1994.



SERAPIÃO, R.V. Sistemas de cultivo e qualidade embrionária. **O Embrião**, p.4-7, ABR/MAI/JUN de 2006.

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, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.

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

SIRARD, M. A.; DUFORT, I.; COENEN, K.; TREMBLAY, K.; MASSICOTTE, L.; ROBERT, C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. **Reproduction**, suppl. 61, p. 117-129, 2003.

SIRARD, M. A.; 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.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; SOTOJKOVIC, 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.

STOKES, P.J.; ABEYDEERA, L.R.; LEESE, H. J. Development of porcine embryos *in vivo* and *in vitro*; evidence for embryo 'cross talk' *in vitro*. **Developmental Biology**, v. 284, p.62–71, 2005.

SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; EPPIG, J.J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. **Semin Reprod Med**, v.27, p. 32–42, 2009.

SU, J.; WANG, Y.; LI, R.; PENG, H.; HUA, S.; et al. Oocytes Selected Using BCB Staining Enhance Nuclear Reprogramming and the In Vivo Development of SCNT Embryos in Cattle. **PLoS ONE**, v. 7, n.4, e36181, 2012.

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

SUTTON-MCDOWALL ML, GILCHRIST RB, THOMPSON JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, p.685–95, 2010.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S. et al. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 49, n.2, p.228-232, 1993.

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

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

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.30, p. 493-497, 1972.

THIBODEAUX, J.K.; GODKE, R.A. *In vitro* enhancement of early-stage embryos with co-culture. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.116, p.364-371, 1992.

THIBODEAUX, J.K.; MYERS, M.W.; HANSEL, W. The beneficial effects of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived growth factor. **Theriogenology** v. 43, p.336, 1995.

THOUAS, G.A.; JONES, G.M.; TROUNSON, A.O. The "GO"system - a novel method of microculture for *in vitro* development of mouse zygotes to the blastocyst stage. **Reproduction**, v. 123, p. 161-169, 2003.

TORNER, H.; GHANEM, N.; AMBROS, C.; HOLKER, M.; TOMEK, W.; PHATSARA, C.; et al. Molecular and subcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Reproduction**, v. 135, p.197- 212, 2008.

UYAR, A.; TORREALDAY, S.; SELI, E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility and Sterility**, v. 99, p. 979–997, 2013.

VAJTA, G.; PEURA, T. T.; HOLM, P.; PALDI, A.; GREVE, T.; TROUNSON, A. O.; CALLESEN, H. New method for culture of zona-included or zonafree embryos: the Well-of-the-Well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 256–264, 2000.

VANDERHYDEN, B. C.; MACDONALD, E. A.; NAGYOVA, E.; DHAWAN, A. Evaluation of members of the TGF $\beta$  superfamily for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. **Reproduction**. Supplement, v. 61, p. 55-70, 2003.

VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C.; BEVERS, M.M.; VAN DERWEIJDEN, 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.

VANDESOMPELE, J.; De PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; De PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n. 7, 2002.

VAN MONTFOORT, A. P.; GERAEDTS, J.P.; DUMOULIN, J.C. STASSEN, A.P.M.; EVERS, J.L.H.; AYOUBI, T.A.Y. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. **Molecular Human Reproduction**, Mar, v. 14, n.3, p. 157-168, 2008.

XU, X.; CHEN,D.; ZHANG, Z.; WEI, Z.; CAO,Y. Molecular signature in human cumulus cells related to embryonic developmental potential. **Reproductive Sciences**, v.22, n.2, p.173-180, 2015.

YEO, C.; GILCHRIST, R.B.; LANE, M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 1072-1080, 2009.

WANG, W.; DAY, B.N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microsc Res Tech**, v.61, p.335-341, 2003.

WATHLET, S.; ADRIAENSSENS, T.; SEGERS, I.; VERHEYEN, G.; VAN DE VELDE, H.; COUCKE, W.; et al. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. **Human Reproduction**, v.26, p.1035-1051, 2011.

WATSON, L. N.; MOTTERSHEAD, D. G.; DUNNING, K. R.; ROBKER, R. L.; GILCHRIST, R. B.; RUSSELL, D. L. Heparan Sulfate Proteoglycans Regulate Responses to Oocyte Paracrine Signals in Ovarian Follicle Morphogenesis. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4544–4555, 2012.

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

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v.16, p. 893-901, 2001.

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.

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

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