

LUDYMILA FURTADO CANTANHÊDE

**INFLUÊNCIA DO FSH SOBRE OS ASPECTOS CELULARES E
MOLECULARES NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE COMPLEXOS
CUMULUS-OVÓCITOS DE BOVINOS**

**RECIFE
2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

LUDYMILA FURTADO CANTANHÊDE

**INFLUÊNCIA DO FSH SOBRE OS ASPECTOS CELULARES E
MOLECULARES NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE COMPLEXOS
CUMULUS-OVÓCITOS DE BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção de título de doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira

**RECIFE
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C229i Cantanhêde, Ludymila Furtado
Influência do FSH sobre os aspectos celulares e moleculares na
maturação *in vitro* de complexos cumulus-ovócitos de bovinos /
Ludymila Furtado Cantanhêde. – 2018.
112 f. : il.

Orientador: Marcos Antônio Lemos de Oliveira.

Coorientador: Marcelo Tigre Moura.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária,
Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Atividade energética 2. Biomoléculas 3. Fatores de
Transcrição 4. Qualidade ovocitária 5. Ruminantes I. Oliveira,
Marcos Antônio Lemos de, orient. II. Moura, Marcelo Tigre,
coorient. III. Título

CDD 636.089



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**INFLUÊNCIA DO FSH SOBRE OS ASPECTOS CELULARES E
MOLECULARES NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE COMPLEXOS
CUMULUS-OVÓCITOS DE BOVINOS**

Tese de Doutorado elaborada por
LUDYMILA FURTADO CANTANHÊDE

Aprovada em//

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antonio Lemos de Oliveira
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Dr. Marcelo Tigre Moura
Coorientador- Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Dra. Roberta Lane de Oliveira Silva
Departamento de Genética – UFPE

Dra. Joana D'arc da Rocha Alves
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que, mesmo não estando ao meu lado, vendo-me obter o título de Doutora, estiveram sempre a minha frente, guiando os meus pés, meus dedos, minha cabeça e meu coração. Uma vida não é suficiente para caber todo amor que sinto por vocês. “Vocês me deram uma eternidade dentro dos nossos dias enumerados!”

In memoriam de Maria de Fátima Diniz Furtado Cantanhêde e Raimundo Nonato Alves Cantanhêde.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fortaleza, meu porto seguro e minha esperança. Sem minha fé no Senhor eu não teria forças para enfrentar minhas limitações e meus medos. Obrigada por sempre iluminar o meu caminho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária e a todos os professores e funcionários que a compõem pela atenção e contribuição ao longo deste estudo e por permitir a aquisição de novos conhecimentos. Em especial meu agradecimento à Dona Sônia, Irmã, Dr. Joana e Alcir.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A toda minha família, por sempre estar comigo em todos os momentos.

Ao meu padrinho querido, tio lindão, por ser minha segurança em tempos sombrios, por sempre estar comigo e por ser uma pessoa difícil de encontrar por aí. O tipo de pessoa que nos faz agradecer a Deus sempre só pelo fato de lhe ter por perto.

Á minha querida tia Terezinha, por estar ao meu lado quando eu e meu pai mais precisamos.

Ao meu orientador Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira, pela atenção e oportunidade concedidas a mim mesmo antes de me conhecer. Obrigada por seu apoio e sua compreensão quando mais precisei.

Ao meu co-orientador Dr. Marcelo Tigre Moura, pelos conselhos, conversas e conhecimentos oferecidos. Por ter acreditado no meu potencial e por todo tempo a mim dedicado.

Ao Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima, Prof. Dr. Claudio Bartolomeu Coutinho, Profa. Dra. Valéria Teixeira e Profa. Dra. Ana Benko, pelos auxílios acadêmicos e pelas ajudas com a pesquisa.

À Dra. Roberta Lane e Dr. Sérgio Nascimento, pela gentileza, apoio e amizade durante os quatro anos de doutorado.

A todo Laboratório de Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal – UFRPE, em especial, minhas amigas Priscila, Maiana e Pábola. E ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal - UFPE, em especial a Jéssica, obrigada por me receberem de braços abertos e por compartilharem seus conhecimentos comigo.

A todos os amigos de Pernambuco, Bahia, Sergipe, Alagoas, Rio Grande do Norte que o doutorado me deu de presente, em especial Emanuel, Júnior Mário, Felipe Sales e Natália Albuquerque.

A todos os meus amigos de uma vida inteira, em especial Adryelle, Jéssica e Carol obrigada por entenderem a minha ausência e pela felicidade sempre demonstrada a cada regresso. Ao meu namorado Fábio, que apesar de pouco tempo nessa luta comigo, tornou-se indispensável nessa reta final, ajudando-me a manter tudo em ordem.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho. O meu eterno muito obrigada!

*“Nos momentos em que me machuquei.
Durante todas as lágrimas que caíram dos meus olhos.
Quando o chão tremeu abaixo dos meus pés.
Foi na fé que eu me agarrei e foi através da fé que eu levantei.
Deus me carregou no colo como um sopro refrescante na minha alma.
Me disse que eu seria capaz e eu acreditei.
Eu fui vencedor em todas as vezes que me encontrei com Deus e fortaleci a minha fé.”*

Edgard Abbehusen

RESUMO

As biotécnicas aplicadas à reprodução de bovinos ainda possuem limitações e muitas estão ligadas a falta de conhecimento sobre a atuação de macromoléculas adicionadas ao meio de maturação ovocitária *in vitro* (MIV), ao processo de desenvolvimento embrionário e diferenciação celular, bem como as alterações de genes relacionados à pluripotência na produção *in vitro* nesta espécie. O hormônio folículo estimulante (FSH) está presente na maioria dos protocolos de MIV, devido a sua importância na expansão das células do cumulus, síntese de estradiol e maturação citoplasmática e nuclear do ovócito. Porém, poucos estudos relatam a influência do FSH na atividade gênica durante a maturação. Visto que a identificação e elucidação das modificações bioquímicas do meio e dos mecanismos de ação desses genes contribuiriam para melhorias nas diversas biotécnicas aplicadas à reprodução e para o aumento da produção de animais de alto valor genético, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do FSH em células do cumulus durante a maturação de ovócitos bovinos. Foram feitas análises hormonal e bioquímicas do meio de maturação *in vitro* antes e após a MIV, com e sem FSH (G-FSH, G-FSHIN, G-CTL, G-CTLIN) bem como a análise da expressão de genes relacionados à pluripotência em células do cumulus de bovinos maturados com e sem FSH (G-FSH e G-CTL) coletados em abatedouros da região da Zona da Mata e Agreste de Pernambuco. Foi observada a concentração de estradiol por imunoenensaio e concentração de proteína, glicogênio, açúcar e lipídeo (análise bioquímica) através de espectrofotômetro na análise de expressão relativa por PCR em tempo real (RT-qPCR). Para análise estatística avaliou-se a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk para serem então submetidos à análise de variância (ANOVA), Teste F e, posteriormente o teste de Tukey HSD, nível de significância de 5,0%. Foi observada maior expansão das células do cumulus durante a maturação em meio contendo FSH, quando comparado ao meio sem FSH. Além disso, o FSH influenciou o consumo de glicogênio pelas células, diminuindo sua concentração no meio, sugerindo grande demanda de energia para o processo. Observou-se influência do FSH sobre a expressão de RONIN e CMYC, nos quais o hormônio estimula a atividade de RONIN e reprime CMYC. Dessa forma, o FSH influencia a maturação de ovócitos bovinos, além de atuar também na atividade energética do complexo cumulus-ovócito de nos níveis celulares e moleculares.

Palavras-chave: Atividade energética, Biomoléculas, Fatores de transcrição, Qualidade ovocitária, Ruminantes.

ABSTRACT

Biotechniques applied to bovine reproduction still have limitations and many are linked to a lack of knowledge about an update of macromolecules added to the medium of in vitro oocyte maturation (IVM), embryonic development process and cell difference, as well as genes of inhibitors related to pluripotency in in vitro production in this species. Follicle stimulating hormone (FSH) is present in most IVM protocols because of its importance in large cumulus cells, estradiol synthesis and cytoplasmic and nuclear maturation of the oocyte. However, few studies report an influence of FSH on gene activity during maturation. Considering the identification and modification of the biochemistry of the medium and mechanisms of action of the genes contributed to improvements in the various biotechniques applied to the reproduction to increase the production of animals of high genetic value, this work had the objective of evaluating an influence of FSH in cumulus during maturation of bovine oocytes. Hormonal and biochemical analyzes of the in vitro maturation medium before and MAB, with and FSH (G-FSH, G-FSHIN, G-CTL, G-CTLIN), as well as an analysis of the expression of pluripotency related genes in cumulus of cattle matured with and without FSH (G-FSH and G-CTL) collected in slaughterhouses of the Zona da Mata and Agreste of Pernambuco. A concentration of estradiol was observed by immunoassay and concentration of protein, glycogen, sugar and lipid (biochemical analysis) through a spectrophotometer in the analysis of real-time PCR (RT-qPCR). For statistical analysis, normality was assessed by Shapiro-Wilk test to be submitted to analysis of variance (Test F) and, or Tukey HSD test, level of significance of 5.0%. Increased cumulus cell amplitudes were observed during maturation in the FSH medium when compared to the non-FSH medium. In addition, FSH influences glycogen consumption by cells, decreasing their concentration not medium, due to the need for high energy demand for the process. Influence was observed in the expression of RONIN and CMYC, in which the hormone stimulates RONIN activity and represses CMYC. Thus, FSH influences a maturation of oocytes, besides also acting in the energetic activity of the cumulus-oocyte complex of bovine without cellular and molecular physics.

Keywords: Biomolecules, Energy activity, Oocyte quality, Ruminants, Transcription factors.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1: Cronologia da foliculogênese durante a ovogênese, ação das gonadotrofinas e ciclo celular durante a maturação ovocitária.....25
- Figura 2: Mecanismo de conversão da testosterona a partir do colesterol e através da enzima aromatase nas células do cumulus.....27
- Figura 3: Comunicações intercelulares - Representação esquemática das comunicações intermoleculares dos tipos junções GAP e projeções transzonais (TZP) entre as células do cumulus e os ovócitos.....36
- Figura 4: Mecanismos de ação do FSH sobre as células do cumulus e ovócitos durante a ovogênese37
- Figura 5: Etapas da Produção *in vitro* de embriões bovinos.....40

Artigo 1

- Figura 1: Delineamento experimental para análise dos efeitos celulares e moleculares do FSH sobre maturação *in vitro* de complexos cumulus-ovócitos de bovinos.....71
- Figura 2: Expansão das células do cumulus após maturação ovocitária *in vitro*: A) Com suplementação de FSH, B) Sem suplementação de FSH73

Artigo 2

- Figura 1: Preparação das amostras celulares nos dois grupos experimentais (meio com FSH e meio sem FSH-controle) para análise da expressão gênica por RT-qPCR.....87

Figura 2: Rank de estabilidade do programa geNorm dos sete genes referência candidatos, nos quais UBB e o YWHAZ são os mais estáveis.....93

Figura 3: Determinação do número de genes referência utilizados para normalização através do programa geNorm.....94

Figura 4: Figura 4: Expressão relativa dos genes PTGS2, HAS2, RONIN, ZFX, ZFP281 e CMYC em células do cumulus após maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.....95

LISTA DE QUADROS

Revisão Bibliográfica

Quadro 1 : Utilização do FSH durante a maturação in vitro de ovócitos em diferentes espécies.....32

Artigo 2

Quadro 1: Primers utilizados para detecção e validação dos genes alvos em células do cumulus de bovinos por RT- qPCR.....89

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Taxa de maturação nuclear ovocitária de bovinos em meios com e sem FSH após 22 horas de MIV72

Tabela 2. Comparação entre os valores obtidos de estradiol (pg/mL) em meio MIV com e sem FSH, antes e após 22 horas de maturação ovocitária de bovinos73

Tabela 3. Efeito do FSH sobre o metabolismo de complexos cumulus-ovócitos bovinos, antes e após 22 horas de maturação, observados no meio de MIV74

Artigo 2

Tabela 1: Eficiência dos genes referência utilizados para detecção dos genes alvos em células do cumulus de bovinos por RT- qPCR.....92

APÊNDICE

| | |
|--|-----|
| Apêndice 1: Eficiência dos sete genes referência em células do cumulus de bovino..... | 110 |
| Apêndice 2: Valores de melting durante eficiência dos sete genes referência em células do cumulus de bovinos | 111 |
| Apêndice 3: Curvas de amplificação durante estabilidade dos sete genes referência em células do cumulus de bovinos | 112 |

LISTA DE SIGLAS

α MEM: Alpha Minimum Essential Medium

AMPc - monofostato cíclico de adenosina

AngII – angiotensina II

AREG - anfiregulina

ATP – adenosina trifosfato

BMP-15: proteína morfogenética óssea

BSA – albumina de soro bovino

CCO – complexo cumulus oócito

CGP – células germinativas primordiais

CIV – cultivo *in vitro*

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CTE – célula-tronco embrionária

Cx - conexinas

ER- β – receptor de estradiol β

ERK1 – proteína quinase ativadora de mitose 1

ERK2 - proteína quinase ativadora de mitose 2

FGF8b – fator de crescimento de fibroblasto 8b

FSH – hormônio folículo estimulante

FT – fator de transcrição

GAP – junções comunicantes

GDF9 – fator de diferenciação de crescimento 9

GH – hormônio do crescimento

GnRh – hormônio liberador de gonadotrofinas

GRP – gene relacionado à pluripotência

hCG – gonadotrofina coriônica humana

IA – inseminação artificial

IATF – inseminação artificial em tempo fixo

IL-6 – interleucina 6

IL-1 – interleucina 1

LH – hormônio luteinizante

LHRs – receptores de hormônio luteinizante

MAPK - proteína quinase mitogênica ativada

MCI – massa celular interna

MIV – maturação *in vitro*

MOIFOPA - Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais

MPF - fator promotor de maturação

P4 - progesterona

PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular

PCR – reação em cadeia de polimerase

PGE2 - prostaglandina E2

PIV – produção *in vitro*

PKA – proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

POM: *Porcine Oocyte Medium*

PTZ - projeções transzonais

RT-qPCR – transcrição reversa seguida da PCR quantitativa

SBF – soro fetal bovino

TCM-199 - *Tissue Culture Medium 199*

TE – transferência de embriões

TN – transferência nuclear

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 Geral | 22 |
| 2.2 Específicos | 22 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| 3.1 Bovinocultura | 23 |
| 3.1.1 Produção de bovinos | 23 |
| 3.1.2 Biotécnicas aplicadas à reprodução de bovinos | 23 |
| 3.2 Oogênese e foliculogênese em bovinos | 24 |
| 3.2.1 Oogênese em folículos pré-antrais | 26 |
| 3.2.2 Oogênese em folículos antrais | 27 |
| 3.2.3 Maturação ovocitária | 28 |
| 3.2.4 Maturação ovocitária <i>in vitro</i> e ovulação | 30 |
| 3.3 Importância do oócito para o desenvolvimento embrionário | 32 |
| 3.4 Importância das células do cumulus para maturação oocitária | 33 |
| 3.4.1 Comunicação intercelular entre ovócito e células foliculares | 35 |
| 3.5 Atuação do FSH na Oogênese | 36 |
| 3.6 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos | 38 |
| 3.7 Desenvolvimento embrionário e Pluripotência | 39 |
| 3.7.1 Genes relacionados à pluripotência (GRP) | 40 |
| 3.7.2 GRPs expressos em células do cumulus | 43 |
| 4. REFERÊNCIAS | 43 |
| 5. ARTIGOS CIENTÍFICOS | 67 |
| 5.1 Artigo 1 - Efeito do FSH sobre a atividade dos complexos cumulus-ovócitos de bovinos durante a maturação <i>in vitro</i> | 67 |
| 5.2 Artigo 2 - Identificação de fatores de transcrição modulados pelo FSH no cumulus de bovinos durante a maturação <i>in vitro</i> | 82 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 108 |

| | |
|----------------------------|-----|
| 7. APOIO FINANCEIRO | 109 |
| 8. APÊNDICE | 110 |

1. INTRODUÇÃO

A pecuária bovina ocupa um importante papel no setor econômico brasileiro, tanto na exportação quanto no abastecimento do mercado interno de carne, leite e couro. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture* - USDA) divulgou que o Brasil é responsável por 22,2% do rebanho mundial e ocupa a segunda colocação no ranking dos países com maior rebanho de bovinos do mundo. Além disso, o país foi responsável por 15,4% da produção global de carne bovina, sendo o segundo maior produtor mundial (IBGE, 2016). A pecuária brasileira é impulsionada pelas biotecnologias ligadas à reprodução que ajudam a aumentar a produção bovina e a obter rebanhos com material genético superior.

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma técnica reprodutiva bastante utilizada, porém, condições diferentes de maturação *in vitro* (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV) *in vivo*, como temperatura, concentração de gases, composição de meio e tempo de maturação, podem acarretar em mortalidade embrionária, baixa qualidade de gametas, morte celular e alterações na expressão gênica, diminuem o potencial de desenvolvimento dos embriões em relação às condições *in vivo*. Dessa forma, a PIV ainda possui fatores limitantes para otimização da produção devido a condições diferentes das observadas *in vivo*, principalmente no processo da MIV (LONERGAN, 2008).

A MIV de ovócitos é considerada uma etapa crucial da PIV, pois neste processo o gameta feminino adquire competência para desempenhar suas funções como retomada da meiose I, para fertilização e começo do desenvolvimento embrionário até ativação do genoma do embrião. Porém, para que aconteça maturação do ovócito durante o crescimento folicular é necessária uma interação complexa entre ovócito e as células do cumulus, envolvendo fatores de crescimento, citocinas, hormônios e outras moléculas (ARAÚJO et al., 2014; SILVA et al., 2016). As células do cumulus são importantes para maturação do ovócito e a retirada delas reduz significativamente a maturação e o posterior desenvolvimento do embrião devido a sua estreita ligação com o ovócito através das junções GAP que permitem a passagem de componentes químicos que regulam a maturação ovocitária (GONÇALVES et al., 2002). Mesmo com a grande quantidade de informações e descobertas nos últimos anos (HULSHOF et al., 1995; ADRIAENS et al., 2004; ORISAKA et al., 2009; PROCHAZKA et al., 2012; KHAN et al., 2015), ainda é necessário mais investigações sobre a fisiologia ovariana de bovinos

para compreensão de seus possíveis fatores endócrinos, autócrinos, parácrinos e possíveis interações. Dessa forma, pesquisas relacionadas à função de biomoléculas importantes, como hormônio folículo estimulante (FSH), suas vias de atuação e genes envolvidos na maturação ovocitária contribuíram para o desenvolvimento de biotecnologias úteis para o aumento e melhoramento da produção animal (SILVA et al., 2002; SARAIVA et al., 2010).

O FSH é um dos principais fatores necessários para competência ovocitária. Esse hormônio é responsável pelo crescimento e dominância do folículo antral, bem como pelo desenvolvimento de ovócitos competentes durante o cultivo *in vitro* dos complexos cumulus-ovócito (CCOs) (ADRIAENS et al., 2004). O FSH também é uma das principais substâncias presentes nos protocolos de produção *in vitro* (PIV) devido à sua importância no crescimento folicular, maturação do ovócito e produção de estradiol, tanto *in vivo* como *in vitro* (GILCHRIST et al., 2004). Adicionado ao meio de maturação *in vitro* (MIV), este hormônio estimula a produção de substâncias sinalizadoras que induzem à retomada da meiose, preparando o gameta para fecundação (YOUNIS e BRACKETT, 1992; SIRARD et al., 2007). Para melhor compreensão desses mecanismos torna-se necessário o desenvolvimento de métodos que possibilitem avaliar os efeitos de substâncias envolvidas no processo. Os estudos *in vivo* e *in vitro* em bovinos vêm sendo utilizados na identificação de fatores envolvidos na ativação, desenvolvimento, seleção folicular, maturação ovocitária, ovulação e luteólise (BEZERRA et al., 2016).

Apesar do conhecimento sobre os efeitos celulares do FSH sobre os CCOs, foram feitos poucos relatos sobre a expressão gênica do ovócito, incluindo os genes relacionados à pluripotência (GRPs). Os GRPs possuem um papel essencial no desenvolvimento embrionário e também são necessários para a propagação de células-tronco embrionárias (CTE). De acordo com alguns estudos, além de embriões, os GRPs podem ser detectados também em tecidos e órgãos, podendo gerar modelos experimentais em células somáticas, facilitando a análise da função destes genes (LENGNER et al., 2008; GALAN-CARIDAD et al., 2007). A elucidação de aspectos relacionados ao desenvolvimento embrionário e à genética de bovinos impulsionaria avanços na qualidade e quantidade da produção e de biotécnicas ligadas à produção de embriões.

A biologia molecular surge como ferramenta para esclarecer a ação do FSH durante a maturação ovocitária. A análise em nível molecular dos GRPs em diferentes tipos celulares, como por exemplo, em células diretamente ligadas ao ovócito, como as células do cumulus, permitiria avaliar os efeitos e mudanças na expressão desses genes durante a maturação ovocitária e correlacioná-las a determinados eventos celulares durante a MIV e ao desenvolvimento embrionário subsequente. Assim, tanto no contexto molecular quanto nos aspectos bioquímicos e metabólicos, maiores estudos são necessários para aumentar o conhecimento sobre os processos fisiológicos durante a maturação ovocitária sob condições *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do FSH em nível celular e molecular durante a maturação *in vitro* (MIV) de complexos cumulus-ovócito (CCO) bovino.

2.2 Objetivos específicos

Validar o protocolo de PIV com adição de FSH sobre os CCOs a partir da produção de estradiol, expansão das células do cumulus e maturação nuclear de ovócitos;

Avaliar o efeito do FSH sobre a composição do meio de MIV (proteína, lipídeo, açúcar e glicogênio) após exposição aos CCOs bovinos;

Validar genes apropriados para normalização dos dados de RT-qPCR em células do cumulus após a MIV e sobre efeito do FSH;

Avaliar o efeito do FSH sobre a atividade de genes relacionados à pluripotência (GRPs) em células do cumulus através da RT-qPCR.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Bovinocultura

3.1.1 Produção de bovinos

A bovinocultura tem relevância no cenário socioeconômico mundial, pela produção de carne, leite e derivados de alto valor nutricional, aproveitamento de couro e carcaças, por ser fonte de renda para criadores e também por contribuir com pesquisas relacionadas à reprodução animal.

O Brasil é um dos maiores exportadores de carne bovina do mundo, com mais de 212,34 milhões de cabeças (IBGE, 2015). Entre os principais importadores de carne bovina do Brasil, destaca-se Hong Kong com um volume de 214 mil toneladas, importadas entre os meses de janeiro a setembro de 2016, apresentando um faturamento de US\$ 750 milhões. O Brasil, os Estados Unidos e a União Europeia, são responsáveis por quase metade da carne bovina produzida no mundo (IBGE, 2016). Os Estados Unidos é o maior produtor mundial, desta forma a abertura do mercado norte-americano para carne bovina brasileira contribuiu ainda mais para uma melhor visibilidade do produto brasileiro no exterior (CNA BRASIL, 2016).

Juntamente com a produção de bovinos e ruminantes em geral, as biotecnologias reprodutivas vêm se destacando por favorecerem o aumento da produtividade dos rebanhos de elevado potencial genético e econômico.

3.1.2 Biotécnicas aplicadas à reprodução de bovinos

A demanda crescente por animais de alto valor genético tem motivado pesquisas para o avanço das biotecnologias reprodutivas. Nas últimas décadas, algumas biotecnologias foram desenvolvidas e outras foram aperfeiçoadas com o intuito de melhorar a produção animal. A Inseminação Artificial (IA), a Produção *in vitro* de embriões (PIV) e a Transferência de Embriões (TE) são as biotecnologias utilizadas com maior frequência, porém ainda permanecem pouco eficientes em ruminantes, incluindo bovinos, quando comparadas as taxas *in vivo* (WILMUT et al., 2002; HE et al., 2006; MELLO et al., 2016). Além dessas biotécnicas existem outras técnicas que apresentam boas perspectivas como a Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), clonagem por TN e a transferência nuclear (TN).

Maior conhecimento sobre o desenvolvimento embrionário da espécie solucionaria alguns problemas relacionados ao desenvolvimento de biotécnicas.

Investigações em nível molecular também têm elucidado alguns mecanismos de ativação de genes relacionados à pluripotência (GRP) durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo*, permitindo o aperfeiçoamento dos protocolos de diversas biotécnicas.

3.2 Oogênese e foliculogênese em bovinos

O ovário tem duas funções principais: a produção cíclica de ovócitos fertilizáveis e a produção de hormônios esteroides. Estes hormônios atuam no desenvolvimento do trato genital, facilitam a migração de embriões nas fases iniciais do desenvolvimento participando da implantação e da gametogênese. A estrutura funcional que permite o desenvolvimento das duas principais funções do ovário, gametogênese e esteroidogênese, é o folículo. A oogênese e a foliculogênese são processos que ocorrem simultaneamente, porém, a foliculogênese, encontra-se inserida no processo de oogênese, por ter início com formação do folículo primordial e culminar com a formação do folículo pré-ovulatório. Por sua vez, a oogênese começa antes do desenvolvimento folicular com o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) e termina somente após a ovulação do folículo pré-ovulatório, com o ovócito haploide fecundado (Figura 1; HAFEZ, 1995).

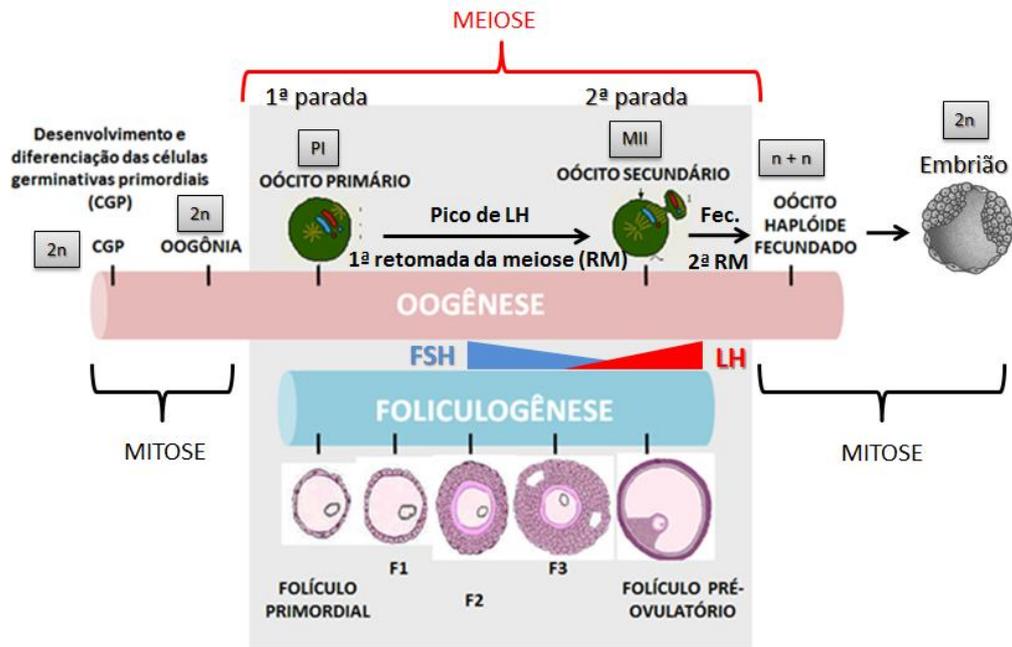


Figura 1: Cronologia da foliculogênese durante a oogênese, ação das gonadotrofinas e ciclo celular durante a maturação ovocitária. $2n$: núcleo diploide; n : núcleo haploide; PI: núcleo em prófase da primeira meiose; MII: núcleo em metáfase da segunda meiose; Fec: Fecundação; F1: Folículo primário; F2: Folículo secundário; F3: Folículo terciário; FSH: Hormônio folículo estimulante; LH: hormônio luteinizante. Fonte: Arquivo pessoal.

Todo o processo de desenvolvimento dos folículos e do ovócito, desde o recrutamento até a ovulação, acontece nos ovários, o que vai desde o início na vida fetal, continuando na puberdade, passa pela fase reprodutiva e vai até a senilidade. Na região medular do ovário estão presentes vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, e na região cortical são encontrados ovócitos circundados por células somáticas (células da granulosa e células da teca), constituindo o folículo ovariano. Os folículos presentes nos ovários são classificados em pré-antrais e antrais (AERTS e BOLS, 2010; LIMA-VERDE et al., 2011). Os folículos pré-antrais são caracterizados pelos folículos iniciais, de pequeno diâmetro, com poucas células ao redor do ovócito. Seu desenvolvimento é estimulado por fatores intraovarianos, parácrinos e endócrinos, não dependentes das gonadotrofinas FSH e LH (Figura 1), sendo classificados em folículos primordiais, primários e secundários (MAGALHÃES et al., 2012). Por sua vez, os folículos antrais são caracterizados pela formação do antro, cavidade contendo fluido folicular, são dependentes do FSH e LH e classificados em folículos terciários ou de Graaf (HAFEZ e

HAFEZ, 2004; MAGALHÃES et al., 2012). Parte dos folículos recrutados se desenvolve até os estádios antrais, porém, a maioria desses folículos entram em atresia pelo processo de apoptose (MARTINS et al., 2008; AERTS e BOLS, 2010) e poucos são ovulados (YANG et al., 1998).

3.2.1 Oogênese em folículos pré-antrais

Durante o desenvolvimento dos folículos pré-antrais, são observadas modificações, tais como, a diferenciação e proliferação das células da teca e da granulosa, síntese de hormônios esteroides, vascularização, modificações na membrana basal e na matriz extracelular e atresia folicular (MELLO et al., 2013). Em princípio, após a redistribuição das organelas citoplasmáticas e perda das características de motilidade, as células germinativas primordiais (CGPs), oriundas da porção caudal do saco vitelínico do embrião, se diferenciam em oogônias e, através de mitoses e com o desenvolvimento das gônadas, formam os folículos primordiais (DINIZ et al., 2005). Os folículos primordiais, em média, possuem diâmetro de 40 µm e consiste em um ovócito ovoide/esférico, sem zona pelúcida, rodeado de uma camada de células da granulosa ainda achatada (LIMA-VERDE et al., 2011). Em bovinos, a reserva ovariana de folículos primordiais se forma entre o 150 e 180 dias de gestação, com o gameta em estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica, chamado de ovócito primário ou vesícula germinativa (DINIZ et al., 2005) e permanecem em prófase I até o crescimento do folículo e pico de LH para posterior ovulação na puberdade.

A retomada da gametogênese se inicia pela ativação dos folículos primordiais. Ocorrem então alterações bioquímicas e funcionais, atuação de hormônios e de fatores de crescimento para aumento do metabolismo e de transcrição nas células da granulosa acarretando em mudanças morfológicas nestas células somáticas. Ocorre então a formação de uma camada completa de células da granulosa, de formato cuboide, ao redor do gameta dando origem aos folículos primários. A segunda fase é a transição de folículo primário para secundário caracterizado pelo crescimento do ovócito, onde seu núcleo assume uma posição excêntrica e as organelas começam a mover-se para a periferia, e pela multiplicação por mitose das células da granulosa em duas ou mais camadas pela expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (SILVA et al., 2014), mas independente de LH e FSH. Porém, estudos *in vitro* demonstraram que o

FSH (HULSHOF et al., 1995) e a testosterona estimulam o crescimento ovocitário (Figura 2) e a formação dos folículos secundários em bovinos.

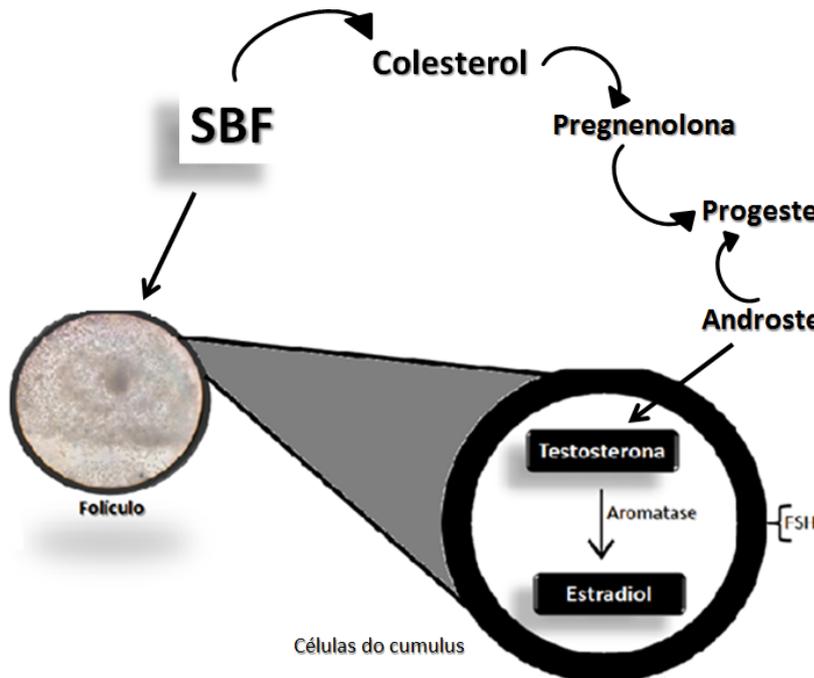


Figura 2: Mecanismo de conversão da testosterona a partir do colesterol e através da enzima aromatase nas células do cumulus. SBF: Soro Bovino Fetal; FSH: Hormônio Folículo Estimulante. Fonte: Arquivo pessoal.

A terceira fase da foliculogênese é o desenvolvimento de folículos secundários até o estágio antral. Nesta etapa ocorre o espessamento da zona pelúcida e começa a formação das células da teca (HONDA et al., 2007). O início do processo de diferenciação das células da teca é independente de gonadotrofinas, pois não expressam receptores para LH (LHRs) ou enzimas esteroideogênicas. Após a formação de duas camadas, ao contrário das células indiferenciadas da teca externa, a teca interna diferencia-se e passa a secretar esteroides (GOUGEON et al., 2010).

3.2.2 Oogênese em folículos antrais

Com a proliferação das células da granulosa formando várias camadas e o crescimento do folículo secundário, ocorre a formação de uma cavidade contendo fluido folicular denominada de antro, caracterizando o início da fase antral e a formação dos folículos terciários. Nesta fase acontece o aumento mais acelerado do diâmetro folicular devido ao crescimento do ovócito, a multiplicação das células da granulosa, da teca e

principalmente pelo acúmulo de fluido folicular (DRIANCOURT, 2001). O fluido folicular é repleto de macronutrientes produzidos pelas células da granulosa como proteínas séricas, eletrólitos, estradiol, inibina e água (MARTINS et al., 2008). Desta forma, o fluido folicular, fornece fatores importantes para viabilidade dos ovócitos, tais como a interleucina-6 (IL-6), AREG (anfiregulina) e GDF-9 (DUMESIC et al., 2015).

O ovócito controla a expressão de proteínas do ciclo celular e secreta fatores parácrinos que ajudam na proliferação das células da granulosa (GILCHRIST et al., 2006). Com a formação do antro, ocorre a diferenciação das células da granulosa formando duas classes distintas: as células próximas ao ovócito diferenciam-se em células do cumulus e as mais periféricas formam as células da granulosa murais (GINTHER et al., 2003; MIHM & BLEACH, 2003; PETER et al., 2009). Em seguida o folículo de maior tamanho continuará crescendo e exercerá dominância, inibindo o desenvolvimento dos demais (atresia) e o recrutamento de um novo grupo de folículos. A partir deste estágio, os folículos tornam-se dependentes dos hormônios gonadotróficos até o estágio de folículo pré-ovulatório atingir 10 a 15 mm em bovinos (GINTHER, 2003). O aumento da ação do FSH estimula a conversão da testosterona em estradiol através da ação da enzima aromatase (Figura 2) e, por feedback negativo, o folículo dominante reduz de forma passiva a responsividade ao FSH. A ovulação ocorrerá após o pico de LH com o folículo em estágio pré-ovulatório, porém na presença de níveis elevados de progesterona, o folículo dominante tornar-se-á anovulatório (GINTHER; KNOPF & KASTELIC, 1989; GINTHER et al., 1996). Após o pico pré-ovulatório de LH, ocorre a retomada da meiose no ovócito. Com a maturação nuclear e citoplasmática do gameta, ocorre então a ovulação. Essas mudanças acontecem durante o desenvolvimento folicular, principalmente quando o folículo se torna dominante (DIELEMAN et al., 2002).

3.2.3 Maturação ovocitária in vivo e ovulação

Durante o processo de maturação, o ovócito é capacitado para o desenvolvimento de funções que podem culminar na fertilização, com a retomada da meiose I, e no desenvolvimento embrionário subsequente (SIRARD et al., 2007). O desenvolvimento do folículo e a maturação do ovócito são processos que acontecem simultaneamente de maneira gradual e sincronizada (SILVA et al., 2016). Durante o estágio de vesícula germinativa acontece intensa atividade transcricional no ovócito

para estoque de RNA mensageiro (RNAm) que será utilizado durante a ovulação, fecundação e primeiras clivagens até ativação do genoma do embrião (GANDOLFI & GANDOLFI, 2001; SIRARD et al., 2007). Na vida fetal dos mamíferos, o ovócito começa a sofrer modificações nucleares, com o início da meiose. Na fase de diplóteno da prófase da primeira meiose ocorre a primeira parada até que o folículo se desenvolva suficientemente para que ocorra o pico de LH e posteriormente a ovulação e retomada da meiose I na puberdade (LONERGAN & FAIR, 2015). A meiose em bovinos começa por volta de 72-82 dias de gestação, até o estágio de dictióteno ou vesícula germinativa quando o ovócito encontra-se em quiescência (RICHARDS, 1980).

A quiescência da vesícula germinativa em meiose I é mantida pelas células do cumulus através da produção de concentrações elevadas de monofostato cíclico de adenosina (AMPc) transferido para o oócito via junções comunicantes do tipo GAP. Os níveis de AMPc começam a baixar devido a ruptura das junções GAP ocasionadas pelo pico pré-ovulatório de LH e também pela redução da produção pelas células do cumulus (KAWAMURA et al., 2004). A queda de AMPc provoca a ruptura do envelope nuclear, condensação de cromatina, reorganização do citoesqueleto e bloqueio da atividade transcricional devido a desfosforilação e ativação do fator promotor da meiose (MILLER; RUSSELL, 1992). Estes processos são essenciais para maturação e competência ovocitária (ANGUITA et al., 2007). Esta competência está correlacionada com o diâmetro do ovócito e do folículo. Em bovinos, os ovócitos considerados competentes para reinício da meiose possuem entre 110-120 μm de diâmetro e estão inclusos em folículos de 2 a 3 mm (LEQUARRE et al., 2005). Os folículos dominantes responsivos ao LH e preparados para ovulação tem diâmetro igual ou maior que 12 mm (SARTORI et al., 2001). As células foliculares expressam fatores inibidores da progressão meiótica (LEIBFRIED & FIRST 1979), porém, sob condições *in vitro*, a remoção do ovócito do ambiente folicular desencadeia espontaneamente o reinício da divisão meiótica (BEZERRA et al., 2016).

Durante a maturação, são estocados no ovócito fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanas e lipoproteínas, considerados fundamentais para a determinação da qualidade ou competência oocitária (WU et al., 2007) além de grande quantidade de RNAm e proteínas. O ovócito é o principal responsável por assegurar o desenvolvimento embrionário inicial (FAIR et al., 2007, HAMATANI et al., 2008), pois

a ativação do genoma embrionário de bovinos acontece somente durante o estágio de transição de oito para dezesseis células (MEMILI e FIRST, 1999).

A glândula hipófise é estimulada a liberar LH devido ao aumento da concentração de estrógeno durante a fase pré-ovulatória, culminando no aumento do nível de LH na corrente sanguínea. Com o pico da concentração deste hormônio, ocorre a ruptura do ápice folicular em função do fluxo sanguíneo elevado, colapso do tecido conectivo e contrações ovarianas até ovulação. Estes processos são controlados por citocinas (IL-1), histamina e prostaglandina E2 (PGE2) (GÉRARD et al., 2004; ACOSTA e MIYAMOTO, 2004). O pico de LH modifica a matriz extracelular e desencadeia a quebra de proteínas da membrana celular através enzimas como proteases, collagenases e o oócito reinicia a meiose (ESPEY, 1980).

Os processos ovulatórios acontecem devido às alterações moleculares que orquestram a expressão gênica nas células da granulosa e teca. A ligação do LH ao seu receptor induz a ativação da via adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e da proteína quinase (PKA) dependente de AMPC, que por sua vez influencia a expressão de fatores parácrinos e autócrinos (CONTI, 2002). A ativação de PKA que catalisa a fosforilação de proteína ligante do elemento de resposta ao AMPC, um fator de transcrição nuclear que aumenta a transcrição de genes envolvidos no processo de ovulação (RICHARDS, 2001).

As proteínas quinases ativadoras de mitose (ERK 1 e ERK 2) são expressas em células da granulosa no período ovulatório através da indução do LH e são importantes para que ocorra a ovulação. Em bovinos, os folículos com diâmetro maiores que 12 mm possuem maior quantidade de receptores para LH e conseqüentemente maior capacidade ovulatória (SARTORI et al., 2001). Nessa espécie, a ovulação ocorre aproximadamente 28 horas após o pico de LH e de 24 a 32 horas após o início do estro (SENGER, 2003).

3.2.4 Maturação ovocitária *in vitro*

A maturação do ovócito é considerada uma etapa crucial da produção *in vitro* de embriões. Porém, as condições *in vitro* não são as mesmas que as *in vivo*, sendo este um dos principais motivos da menor competência ovocitária após a maturação *in vitro*. Com o intuito de mimetizar as condições *in vivo*, algumas etapas e substâncias foram identificadas para suprir as necessidades da PIV como: meio base para maturação, fatores de crescimento e hormônios, fonte de proteínas (MINGOTI et al., 2000), co-

cultivo com células foliculares (ANCIOTO et al., 2004a; ANCIOTO et al., 2004b), controle da atmosfera gasosa durante a maturação (CAIADO CASTRO et al., 2003) e duração da maturação.

Um dos pontos cruciais da MIV está relacionado com o meio base utilizado. Em bovinos, o meio base mais utilizado MIV de ovócitos é o *Tissue Culture Medium* (TCM-199; Quadro 1). Geralmente, é utilizado como meio base e, dependendo da espécie e da rotina de cada laboratório, é modificado com adição de tampões, aminoácidos, vitaminas, nutrientes, além de hormônios (LH, FSH e estradiol) e uma fonte de proteína como soro bovino fetal (SBF) ou albumina sérica bovina (BSA). A suplementação com fontes protéicas de origem animal tem demonstrado grande eficácia na maturação ovocitária e conseqüentemente no desenvolvimento *in vitro* de embriões. O SFB contém componentes como fatores de crescimento, aminoácidos e proteínas proporcionando nutrientes importantes para competência ovocitária e à maturação nuclear (MINGOTI et al., 2000). O BSA possui a mesma função que o SBF, porém, suas funções são relacionadas à sua capacidade de quelar metais pesados, equilibrar o pH e prevenir a adesão das células a superfícies plásticas ou de vidro, devido a sua propriedade surfactante.

O FSH é um hormônio utilizado em diferentes concentrações e em diversas espécies (Quadro 1). É considerado essencial durante a MIV devido ao seu papel importante na foliculogênese inicial de animais mamíferos de maneira geral. Os resultados de sua ação também podem variar de acordo com a espécie, concentração e suplementação utilizada no meio de MIV.

Quadro 1 : Utilização do FSH durante a maturação in vitro de ovócitos em diferentes espécies.

| Animal | Meio base | FSH (concentração) | Maturação nuclear (%) | Referência |
|------------|------------------------|--|--------------------------------|--|
| Bovino | TCM 199 | 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hFSH; 0,02 a 0,05 UI hFSH mL^{-1} 0.5 mg mL^{-1} r-pFSH | 81,8%; 8,39% | Tol et al. 1996; Camargo et al. 1997; Alves et al., 2001; Nuttinck et al. 2004; Khan et al. 2015; Tetsuka et al. 2016 |
| Suíno | TCM199; POM | 0,1 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 1 UI mL^{-1} hFSH; 20 a 100 ng mL^{-1} oFSH | 76,1%; 83,9% | Bing et al. 2001; Kawashima et al. 2008; Mito et al. 2013; Blaha et al. 2015; Nagyova et al. 2016. |
| Camundongo | α MEM | 50 mUI FSH | 94% | Downs et al. 1991; Kind et al. 2012 |
| Caprino | α MEM TCM199 | 100 ou 1000 ng mL^{-1} de r-FSH | 53.55 (16/30) 60.00 (18/30) | Saraiva et al. 2010; Almeida et al. 2010. |
| Búfalo | TCM199 | 5 mg mL^{-1} pFSH 1000 ng mL^{-1} | 60,3% | Jain et al. 2012 Pandey et al. 2010 |
| Equino | TCM199 | 0,5 mg mL^{-1} pFSH | 53,9% (55/102) | Borges et al. 1998 |
| Ovino | TCM199 | 0.1 UI mL^{-1} r-hFSH | 81.9% | Accardo et al. 2004 |

r: recombinant; hFSH: Hormônio folículo estimulante da pituitária de humano; pFSH: Hormônio folículo estimulante da pituitária de suíno; oFSH: Hormônio folículo estimulante da pituitária de ovino; TCM199: *Tissue Culture Medium*; α MEM: *Alpha Minimum Essential Medium*; POM: *Porcine Oocyte Medium*.

3.3 Importância do ovócito para o desenvolvimento embrionário

A maturação e viabilidade do oVócito estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento embrionário, principalmente nos estágios iniciais. Portanto, para que um sistema de MIV possibilite a produção de embriões viáveis é necessário que os ovócitos passem por alterações nucleares e citoplasmáticas fora do ovário. De acordo com MEINECKE et al. (2001), os principais eventos nucleares que resultam na maturação é a quebra da quiescência na fase de vesícula germinativa, desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, formação do primeiro corpúsculo polar e do

segundo fuso meiótico. Ovócitos inviáveis possuem deficiência de RNAm que codificam fator promotor de maturação envolvidos com a retomada da meiose e maturação celular (GONÇALVES et al., 2002). A progesterona também faz a intermediação da retomada da meiose após o estímulo das gonadotrofinas semelhantemente a AngII e prostaglandinas (SIQUEIRA et al., 2013).

No citoplasma do ovócito ocorre principalmente a síntese de proteínas e mudanças moleculares (SIRARD et al., 1998; KUBELKA et al., 2000), algumas organelas citoplasmáticas movem-se para a periferia (STOJKOVIC et al., 2001) e fosforilações e desfosforilações de proteínas envolvidas no reinício da meiose (DEKEL, 2005). Para retomada da meiose, além da atividade do MPF, observa-se a ação da proteína quinase mitogênica ativada (MAPK). Após a maturação os ovócitos encontram-se em metáfase da meiose II e são mantidos nessa fase por ação de fatores citostáticos até que ocorra a retomada pela fecundação ou ativação partenogenética.

Durante as primeiras divisões, o desenvolvimento embrionário é coordenado por fatores estocados no ovócito durante a maturação, pois não ocorre transcrição da maioria dos genes do embrião (LI et al., 2010). Até o período de implantação, o genoma do embrião passa por mudanças e é ativado com o término dos transcritos presentes no citoplasma do gameta feminino (STITZEL & SEYDOUX, 2007; LI et al. 2010). Com ativação do genoma, o embrião começa o processo de compactação celular, no estágio de mórula, e a polarização de células caracterizando a primeira diferenciação celular (COCKBURN & ROSSANT, 2010; LI et al., 2010).

3.4 Importância das células do cumulus para maturação ovocitária

As células do cumulus são essenciais para maturação do ovócito tanto *in vivo* como *in vitro*. A retirada dessas células reduz significativamente a maturação e o desenvolvimento do embrião, demonstrando a estreita ligação entre o ovócito e as células do cumulus através das junções intercomunicantes (GAP) que permitem a passagem de nutrientes e componentes químicos que regulam a maturação (ZHANG et al., 1995; SHIOYA et al., 1998 GONÇALVES et al., 2002). Para sobrevivência oocitária durante a FIV é essencial que o complexo cumulus-ovócito (CCO) selecionado tenha algumas camadas de células do cumulus. Em ovinos, a ausência da conexão entre

ovócitos e células do cumulus favorece a interrupção da retomada da meiose (SHIRAZI et al., 2007).

Em bovinos, foi constatado que a ativação da proteína quinase C (PK-C) na regulação da maturação de ovócitos em meiose I e II é mediada pelas células do cumulus (BERTAGNOLLI et al., 2004). A PK-C participa de alguns processos celulares e, além de regular a maturação do ovócito, também regula a transição de ovócito maduro para zigoto (COLONNA et al., 1997). De acordo com MONDADORI (2010), o recomeço da meiose também está relacionado com o aumento do metabolismo e com a localização mais periféricas das organelas, podendo contribuir com a transmissão de sinais entre ovócitos e células do cumulus. Algumas, como prostaglandina sintase 2 (PTGS2) e hyaluronan syntase 2 (HAS2), são expressas nas células do cumulus e contribuem para a maturação ovocitária e expansão dessas células que circundam o ovócito.

A expressão de PTGS2 é induzida por LH nas células da granulosa (LIM et al., 1997). PTGS2 codifica a enzima COX2, a qual está envolvida na síntese de prostaglandinas; sua expressão nas células do cumulus está relacionada com o tempo de MIV e a qualidade dos ovócitos (GEBHARDT et al., 2011). A prostaglandina E possui efeitos similares ao LH nas células do cumulus, atuando na ativação das células da granulosa e no processo de ovulação, ao induzir a síntese de fatores de crescimento da família do fator de crescimento epidérmico (EGF), via AMPc/PKA e MAPK (NUTTINCK et al., 2011). Estudos *in vitro* demonstraram que FSH também induz a expressão de PTGS2 e expansão das células do cumulus em CCOs (BEN-AMI et al., 2006). As células do cumulus de ovócitos maturados *in vivo* apresentam maior expressão de PTGS2 do que ovócitos imaturos ou submetidos à MIV. Foi observado também que meios contendo SBF tem maior atividade de PTGS2 nas células do cumulus do que em meios suplementados com outras macromoléculas (CÓRDOVA et al., 2011; PROCHAZKA et al., 2012).

HAS2 é um gene com grande atividade nas células do cumulus e o responsável pela produção de ácido hialurônico, principal componente para expansão dessas células (FÜLÖP et al., 1997), além de estar relacionado com o desenvolvimento e a competência do ovócito *in vitro* (MCKENZIE et al., 2004; CILLO et al., 2007), sendo considerado um bom marcador de competência ovocitária. A expressão de HAS2 aumenta com a adição de FSH, que por sua vez, influencia uma variedade de genes

envolvidos na formação da matriz extracelular e remodelação (YAMASHITA et al. 2011). A estimulação do FSH na expressão de HAS2 acontece através da via AMPc/PKA (TIRONE et al., 1997; NAGYOVA et al., 2004).

3.4.1 Comunicação intercelular entre ovócito e células do cumulus

No ovário, durante o crescimento e o desenvolvimento do ovócito há uma conexão contínua do gameta da fêmea com as células foliculares circundantes através de junções de oclusão, aderentes e GAP, relatando a importância das junções intercelulares para ovogênese (EPPIG & O'BRIEN, 1996; ACKERT et al., 2001). Nos folículos, as junções de adesão e do tipo comunicantes (GAP) se formam entre o ovócito em crescimento e as células foliculares formando uma rede funcional bidirecional importante para os dois tipos celulares (EPPIG & O'BRIEN, 1996; ORISAKA et al., 2009). A morfologia celular pode ajudar a regular a síntese de DNA, expressão gênica, diferenciação e apoptose (MITCHELL & BURGHARDT, 1986). Por sua vez, o ovócito também sintetiza e secreta fatores que afetam a expressão gênica nas células da granulosa, exemplificado pela supressão da atividade dos genes codificantes dos LHR nas células do cumulus. A produção de energia nos folículos antrais através de processos como a glicólise, essencial para produção de ATP, é regulada pelos ovócitos para as células da granulosa e que a produção de sinais para essa regulação é dependente do estágio de desenvolvimento das células (SUGIURA et al., 2005).

As projeções transzonais (PTZ) presentes nas células da granulosa facilitam a comunicação com o ovócito em desenvolvimento através do contato com a superfície do ovócito atravessando a zona pelúcida e possibilitando a passagem de fatores de crescimento e a síntese de receptores nas membranas entre as células da granulosa e do ovócito (MOTTA et al., 1995). O número e a estrutura dessas PTZ variam de acordo com o crescimento folicular, partem da superfície das células da granulosa e entram em contato com a membrana plasmática do ovócito, onde estão presentes as junções comunicantes do tipo GAP e junções aderentes ou de oclusão (Figura 3). As PTZ são estruturas ricas em proteínas estruturais dos microtúbulos, chamadas de conexinas (Cx37; Cx43) e dão suporte ao movimento ativo de organelas dentro das células somáticas e permitindo maior contato com a superfície do oócito.

Algumas substâncias utilizadas na PIV podem afetar a atividade das conexinas. Foi observado em camundongos que a adição de insulina ao meio de cultivo *in vitro* de

ovário era reduzida a expressão de RNAm para conexina (MORITA et al., 2003). Por outro lado, ao adicionar FSH, sem a presença de insulina, aumentava a expressão do RNAm para a Cx37. A expressão de Cx43 e das junções GAP nos ovários também são afetadas por hormônios como FSH, LH, seus análogos gonadotrofina coriônica de égua prenhe e hCG, hormônio do crescimento (GH) ou estradiol (GRAZUL et al., 1997; GRANOT & DEKEL, 2002; JOHNSON et al., 2002; KOLLE et al., 2003). Porém, em folículos antrais, a expressão de Cx43 é regulada principalmente pelos hormônios FSH e LH. Enquanto o FSH estimula a expressão de Cx43, o LH reduz a atividade do FSH através da via de ativação de PKA dependente de AMPc (Figura 4). Desta forma o FSH aumenta as comunicações intercelulares ocasionando o aumento da expressão dessas proteínas e a formação das junções GAP (GRAZUL et al., 1997).

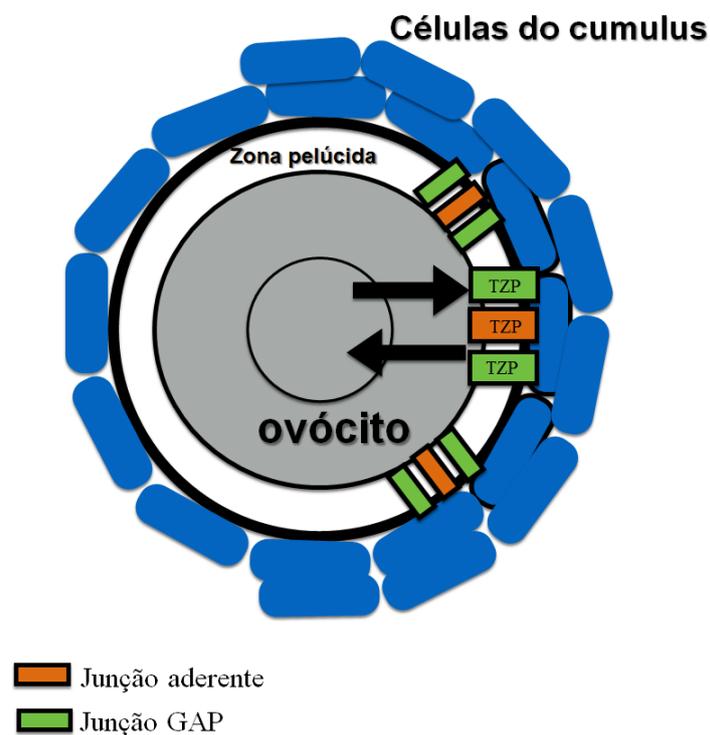


Figura 3: Comunicações intercelulares - Representação esquemática das comunicações intermoleculares dos tipos junções GAP e projeções transzonais (TZP) entre as células do cumulus e os ovócitos. Fonte: Arquivo pessoal

3.5 Atuação do FSH na Oogênese

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), secretado pelo hipotálamo, através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, atinge a hipófise e estimula a

liberação de FSH e LH pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário, hormônios que desempenham funções fundamentais na regulação do desenvolvimento folicular (Figura 4). Em bovinos, os folículos podem atingir o diâmetro de 8 mm independente do LH, mas o crescimento além de 9 mm requer LH endógeno ou FSH exógeno (DRIANCOURT, 2001).

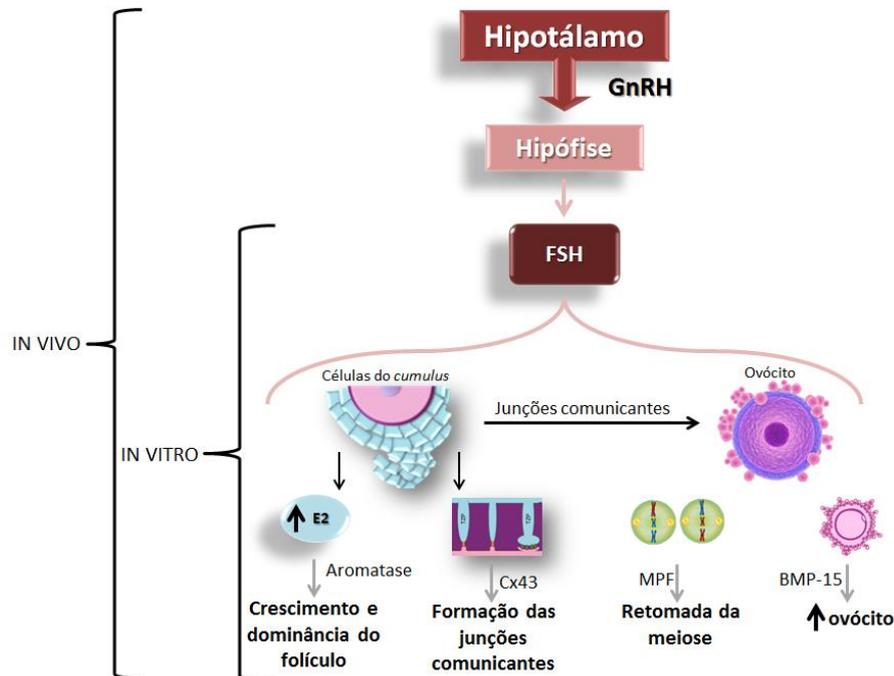


Figura 4: Mecanismos de ação do FSH sobre as células do cumulus e ovócitos durante a ovogênese. GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas; FSH: hormônio folículo estimulante; E2: estradiol; PKA: proteína quinase A; MPF: fator promotor de maturação; BMP-15: proteína morfogenética óssea. Fonte: Arquivo pessoal.

O recrutamento e as ondas foliculares são estimulados pelo aumento das concentrações plasmáticas de FSH (FORTUNE, 1994). Em bovinos, já foi demonstrado que a dinâmica folicular acontece com quatro ondas de desenvolvimento folicular por ciclo estral (BARUSELLI et al., 2007). Com uma nova onda folicular, um grupo de folículos é recrutado e com o estímulo do FSH tem crescimento simultâneo constante até que um seja selecionado como dominante (GINTHER et al., 2003; MIHM & BLEACH, 2003; PETER et al., 2009). O folículo dominante inibirá o desenvolvimento dos folículos subordinados e o recrutamento de um novo grupo de folículos (GINTHER; KNOPF & KASTELIC, 1989; GINTHER et al., 1996). Um grupo de folículos recrutados torna-se dependente das gonodrotrofinas e inicia seu desenvolvimento (BARROS et al., 1995). Em bovinos, durante o crescimento simultâneo, também se

observa a diminuição do número de folículo no grupo recrutado até o completo estabelecimento da dominância. Esta redução do número de folículos está relacionada com a regulação da secreção de FSH e conseqüentemente ao aumento da capacidade secretória de estradiol pelos folículos em desenvolvimento (PRICE & WEBB, 1988; MIHM et al., 2000).

O estradiol atua sobre o receptor de estrógeno β (ER- β) inibindo a expressão de fosfodiesterase 1 C (PDE1C) que, por sua vez, aumenta AMPc facilitando a ação do FSH (DEROO et al., 2009). Em folículos menores, a baixa concentração de FSH interrompe o desenvolvimento dos folículos subordinados, mas ainda é suficiente para promover o crescimento do folículo dominante (ALVES et al., 2002). O FSH também é responsável pela modulação da expressão de proteína morfogenética óssea (BMP-15), que por sua vez atua durante o crescimento dos ovócitos e desenvolvimento folicular (THOMAS et al., 2005; Figura 4).

3.6 Produção in vitro de embriões bovinos

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma biotecnologia aplicada à reprodução que aumenta a produção da pecuária devido à interação do espermatozoide e do oócito fora do trato reprodutivo da fêmea e auxilia na obtenção de rebanhos com material genético superior. A PIV envolve quatro etapas para a formação do novo indivíduo: aspiração e seleção dos ovócitos, MIV, fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões (Figura 5; GONÇALVES et al., 2008). A FIV e a CIV são eventos que dependem das modificações sofridas pelos ovócitos durante o processo de MIV, permitindo que o gameta expresse seu potencial máximo para realizar sua função reprodutiva. Deste modo, a MIV é uma das fases mais importantes da PIV de embriões, pois é nesse período que o ovócito imaturo torna-se hábil à fecundação e ao desenvolvimento de um embrião viável. Além disso, condições inadequadas de MIV podem acarretar em mortalidade embrionária, baixa qualidade de gametas, morte celular e alterações na expressão gênica (LONERGAN, 2008).

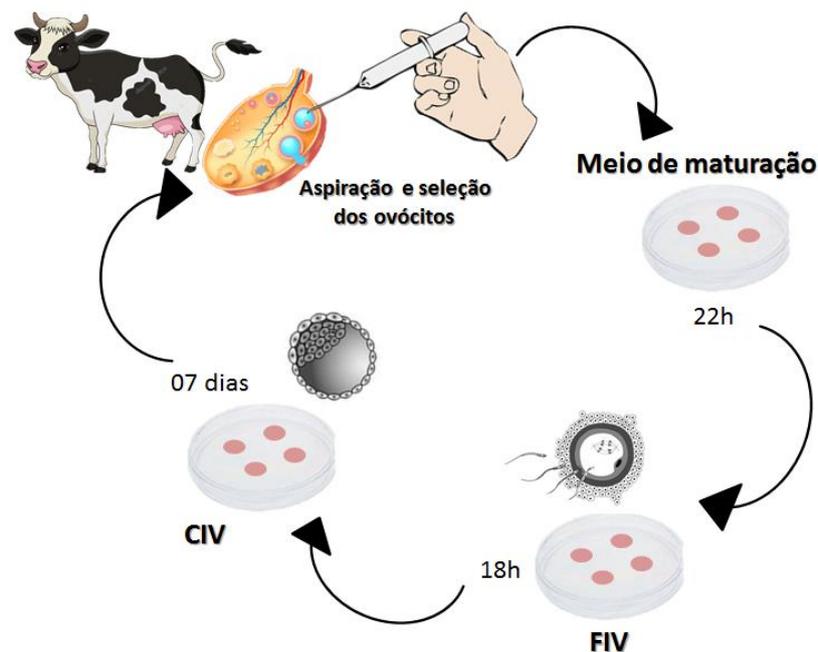


Figura 5: Etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos. FIV: Fertilização in vitro; CIV: cultivo in vitro. Fonte: Arquivo pessoal.

Apesar da importância das biotécnicas aplicadas à reprodução na produção de embriões, suas aplicações ainda possuem baixa eficiência. A PIV de embriões também possui qualidade inferior aos produzidos *in vivo* e, dentre uma das causas, são citadas mudanças no genoma, como modificações em fatores de transcrição e fatores epigenéticos (LONERGAN et al., 2006).

3.7 Desenvolvimento embrionário e Pluripotência

O embrião, após fecundação, passa por diversas clivagens. Em bovinos, a ativação do genoma embrionário tem início na fase de 8-16 células (STITZEL & SEYDOUX, 2007). Após a ativação e formação do blastocisto, o embrião possui dois tipos celulares distintos denominados de embrioblasto e trofoblasto. O embrioblasto, também denominado de massa celular interna (MCI), é formado por células pluripotentes, isto é, células com capacidade de se diferenciar em todos os tipos celulares que formam o feto (COCKBURN & ROSSANT, 2010).

A primeira diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário é um processo irreversível e coordenado por GRPs (HENG et al., 2010; STEPHENSON et al., 2012). Muitos desses genes são fatores de transcrição (FT) que regulam genes alvos

através da ativação ou inibição das sequências promotoras. A identificação dos genes alvo desses FT tem permitido detectar os mecanismos de ação que determinam o fenótipo de uma célula (BOYER et al., 2005; DEJOSEZ et al., 2008).

Para o desenvolvimento de mamíferos é necessário que ocorra a especificação de mais de 200 tipos celulares a partir de uma única célula totipotente. A capacidade que algumas células possuem de se diferenciar em diversos tipos celulares pertencentes aos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma) está ligada à propriedade da pluripotência. Esta propriedade está presente em células da massa celular interna (MCI).

Devido à característica da pluripotência e dos GRPs, células da MCI vêm sendo isoladas para cultivo e estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias (CTE). As CTEs podem também contribuir para elucidar mecanismos relacionados ao desenvolvimento embrionário, diferenciação celular e impulsionar melhorias nas biotécnicas aplicadas à reprodução (PIEDRAHITA et al., 1998). Podendo assim ser aplicada para terapia gênica, produção de animais geneticamente superiores, produção de animais transgênicos, clonagem e também para pesquisa de marcadores moleculares de embriões PIV com viabilidade semelhante à de embriões produzidos *in vivo*. A elucidação dos mecanismos ligados aos GRPs são fundamentais para se obter eficiência máxima nas biotécnicas reprodutivas. O sucesso do isolamento e cultivo de CTE a partir da MCI de camundongos em 1981 (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; SILVER et al. 1983), impulsionou pesquisas sobre os GRPs em diversos outros mamíferos. HANDYSIDE e colaboradores isolaram células do embrioblasto em 1987 e, após cultivo, observaram características semelhantes às das CTE. Porém, até os dias atuais, ainda não se tem muitas informações sobre a diferenciação celular em pequenos ruminantes (HE et al., 2006), sendo camundongos e humanos as espécies mais elucidadas.

3.7.1 Genes relacionados à pluripotência (GRPs)

Genes relacionados à pluripotência são os responsáveis pelo estado de indiferenciação, pela capacidade de diferenciação e proliferação do embrioblasto e das CTE. Além de manterem a diferenciação celular, alguns fatores de transcrição também são responsáveis pelo silenciamento de genes pro-diferenciação celular, impedindo a especialização precoce (BOYER et al., 2005). A extensa aplicação das CTE em

pesquisas é atribuída ao seu potencial de manter o estado indiferenciado e de formar todos os tipos celulares do indivíduo. A correlação dos GRPs com o cultivo de CTE tem demonstrado ser um bom modelo para responder diversas perguntas sobre o desenvolvimento embrionário precoce em diferentes espécies (PERA & TROUNSON, 2004). Alguns trabalhos demonstraram que quando introduzidos em blastocistos, as CTE formavam células somáticas e germinativas (SMITH, 2001; BUEHR et al., 2008). Sendo assim, é de fundamental importância a elucidação dos fatores de transcrição relacionados com potencial de diferenciação celular. A análise da expressão dos GRPs é importante para avaliar e aperfeiçoar métodos e biotécnicas que podem ter como resultado o crescimento e melhoramento da produção animal.

Já foram descritos fatores de transcrição, relacionados à pluripotência como, por exemplo, *Sox2*, *Oct4*, *Nanog*, *Ronin*, *Sall4*, *Stat3*, *Nr5a2* (NICHOLS et al., 1998; NIWA et al., 2000; CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003; WELSTEAD et al., 2008). A maior parte do desenvolvimento sobre o conhecimento embrionário de mamíferos foram obtidos em camundongos (PERA & TROUNSON, 2004). Porém, sabe-se que alguns mecanismos não podem ser aplicados a todas as espécies, visto que a maioria dos genes ligados à reprodução estão sob forte pressão evolutiva (WATERSTON et al., 2002). Foram observadas diferenças na expressão de genes em ovócitos e embriões clivados, em estádios de mórula e blastocistos em camundongos e primatas. Também já foi relatado diferenças entre os padrões da expressão do genes SOX9 e SRY em estágios mais avançados de embriões humanos e de camundongos (FOUGEROUSSE et al., 2000; HANLEY et al., 2000). PAYEN et al. (1997) observaram que a sequência de SOX2 em ovinos é altamente conservada quando comparada às sequências de humanos e camundongos e que seu padrão de expressão influencia linhagens de células germinativas.

Os genes SOX2, OCT4 e NANOG são os principais fatores de transcrição responsáveis pela manutenção da pluripotência celular e que regulam a expressão de genes alvos (TAY et al., 2008; LI, 2010). Em camundongos, a expressão de OCT4 e NANOG estão relacionados com o desenvolvimento inicial do embrião, principalmente com a formação do feto (NICHOLS et al., 1998; CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003; ZAEHRES et al., 2005) e apesar de terem papéis isolados também podem ter atividades co-relacionadas (CHAMBERS, 2004). Foi relatado que alterações em OCT4 ou NANOG implicam na formação de anexos placentários a partir da MCI, não havendo

formação dos tecidos embrionários (NICHOLS et al., 1998; CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003).

Pesquisas feitas em bovinos demonstraram que existem diferenças quanto à expressão espaço-temporal nas ativações espaço-temporal dos GRPs, nas primeiras diferenciações embrionárias, diferem das de camundongos e humanos (BERG et al., 2011; ROSSANT, 2011; GOISSIS e CIBELLI, 2014; BOYER et al., 2005). Estes fatos suportam a necessidade de investigar o controle da pluripotência em diferentes organismos. O embrioblasto está relacionado com a expressão do fator de transcrição Oct4. Também já foi observada expressão de fatores restritos no trofoblasto ou trofotoderme como Cdx2 (ROSSANT, 2011). Esta análise foi constatada por BERG et al. (2011) em bovinos sendo proposto então um modelo nos quais células da MCI expressariam Oct4 e não expressariam Cdx2 e contribuiriam para formação do botão embrionário, enquanto que as células da trofoblasto expressariam Cdx2 e não Oct4, formando a placenta (NICHOLS et al. 1998). Por sua vez, sem a expressão de Cdx2, não ocorre implantação em decorrência da ausência dos anexos placentários (STRUMPF et al., 2005, MEISSNER & JAENISCH, 2006). Porém, em humanos, suínos e caprinos ocorre co-expressão de OCT4 e CDX2 no trofoblasto (DU PUY et al., 2011; HE et al., 2006). Em bovinos, a formação do trofoblasto é determinada pela ausência da expressão de CDX2 (BERG et al., 2011; ROSSANT, 2011). SANNA et al., (2009) relataram expressão de OCT4 tanto em células do embrioblasto como também do trofoblasto de ovinos, porém, com maior expressividade no trofoblasto.

Em relação aos pequenos ruminantes, nosso grupo de pesquisa analisou a expressão de um grupo de GRPs (OCT4, DAX1, ZFP281, NAC1 e RONIN) em ovócitos, células do cumulus e embriões caprinos. Foi observada a expressão de OCT4 e DAX1 em ovócitos, embriões clivados e em estágio de blastocisto. O gene ZFP281 foi expresso em ovócitos, durante o desenvolvimento embrionário e também nas células do cumulus. Também foi observada expressão de RONIN nas células do cumulus e no estágio de blastocisto e NAC1 é expresso somente em embriões com oito células (MOURA, 2014a). Em ovinos, ainda se tem pouca informação sobre o controle molecular durante o desenvolvimento embrionário e sabe-se que o isolamento de CTE é mais complicado, tornando difícil sua comparação com o desenvolvimento de outros mamíferos (DATTENA et al., 2006; ZHU et al., 2007; TALBOT & BLOMBERG, 2008).

3.7.2 GRPs expressos em células do cumulus

O fator de transcrição ZFP281 ou Zinc Finger Protein 281 é um GRP que controla a pluripotência juntamente com NANOG (WANG et al., 2006), OCT4 e SOX2 (WANG et al., 2006, 2008). Sua função principal é silenciar outros genes, inclusive GRPs como NANOG (WANG et al., 2008; FIDALGO et al., 2011), dessa forma é considerado um gene que, quando ativo, reduz a eficiência de reprogramação celular (FIDALGO et al., 2012). Entre as espécies de pequenos ruminantes, ZFP281 possui um perfil conservado de expressão já detectado em fibroblastos, células do cumulus, gametas e embriões (MOURA et al., 2014a).

ZFX, outro GRP necessário para a manutenção da pluripotência comprovado em camundongos e humanos (GALAN-CARIDAD et al., 2007; HAREL et al., 2012), também já foi estudado em bovinos (PEIPPO et al., 2002). No entanto, embriões sem atividade de ZFX atingem o estágio de blastocisto e conseguem implantar na parede uterina (LUOH et al., 1997; GALAN-CARIDAD et al., 2007).

Por sua vez, C-MYC é um fator de transcrição que apresenta diversas funções nas células indiferenciadas como: ciclo celular, metabolismo, modulação de vias sinalizadoras (FAGNOCCHI & ZIPPO, 2017). Em bovinos, C-MYC foi detectado em ovócitos e blastocistos (MILES et al., 2012; MADEJA et al., 2013).

RONIN (THAP11) é um GRPs relacionado com a proliferação das CTE, nos quais, juntamente com o fator de transcrição HCF-1, aumenta a expressão de genes necessários para produção de energia celular e síntese de proteínas (DEJOSEZ et al., 2010). Foi descoberto durante pesquisas feitas com proteínas do domínio de NANOG e a partir desses estudos, perceberam que RONIN atua em vias diferentes de outros GRPs, como OCT4, NANOG e SOX2 (BOYER et al., 2005; DEJOSEZ et al., 2008; ZWAKA, 2008). RONIN também controla o início da transcrição, splicing alternativo e metabolismo celular (DEJOSEZ et al., 2010). Em bovinos e caprinos, foi detectado em cultivos de células do trofoblasto, ovócitos e células do cumulus (HUANG et al., 2014; MOURA et al., 2018).

8. REFERÊNCIAS

ACCARDO, C.; DATTENA, M.; PILICHI, S.; MARA, L.; CHESSA, B.; CAPPAL, P. Effect of recombinant human FSH and LH on *in vitro* maturation of sheep oocytes:

embryo development and viability. **Animal Reproduction Science**. v.81, p.77–86, 2004.

ADRIAENS, I.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. **Human Reproduction**, v.19, p.398–408, 2004.

ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.127-140, 2004.

ACKERT, C. L.; GITTENS, J. E. I.; O'BRIEN, M. J.; EPPIG, J. J.; KIDDER, G. M. Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Dev Biol**. v.70, p.233:258, 2001.

AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and preantral follicle development. **Reprod Dom Anim**, v.45, p.171-179, 2010.

ALMEIDA, K.C.; PEREIRA, A.F.; ALCÂNTARA NETO, A.S.; AVELAR, S.R.G.; BERTOLINI, L.; BERTOLINI, M.; FREITAS, V.J.F.; MELO, L.M. Real-time qRT-PCR analysis of EGF receptor in cumulus oocyte complexes recovered by laparoscopy in hormonally treated goats. **Zygote**. v.19, p.127–136, 2011.

ALVES, N. G.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D. Atividade ovariana em fêmeas bovinas da raça holandesa e mestiças Holandês x Zebu, durante dois ciclos estrais normais consecutivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 627-634. 2002.

ALVES, H. D. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; CALDAS, J. G. L.; SANTOS FILHO, A. S.; BARRETO, M. B. P. Altas concentrações de FSH-p na maturação *in vitro* de oócitos *bos indicus*. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p.645-649, 2001.

ANCIOTO, K. L.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M.; MINGOTI, G. Z. Influência das células do cumulus e do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32,p.118,2004a.

ANCIOTO, K. L.; VANTINI, R.; RONCOLETA, M.; MINGOTI, G. Z. Análise de proteínas por eletroforese bi-dimensional de oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença ou ausência de células do cumulus. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32 (Supl.), p.114, 2004b.

ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence; embryo development; p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 526- 536, 2007.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n. 2, p.205- 211, 2007.

BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; PINHEIRO, O. L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, p. 9-22, 1995.

BEN-AMI, I.; FREIMENN, S.; ARMON, K.; DANTES, A.; STRASSBURGER, D.; RAZIEL, A.; SEGER, R.; RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insight into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. **Mol Hum Reprod**. v.12, p.593–599, 2006.

BERTAGNOLLI, A. C.; GONÇALVES, P. B. D.; GIOMETTI, I. C.; COSTA, L. F. S.; OLIVEIRA, J. F. C.; GONÇALVES, I. D. V.; BARRETO, K. P.; EMANUELLI, I. P.; BORGES, L. F. K. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase

C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.4, p.488-496, 2004

BERG, D. K.; SMITH, C. S.; PEARTON, D. J.; WELLS, D. N.; BROADHURST, R.; DONNISON, M., PFEFFER, P. L. Trophectoderm lineage determination in cattle. **Developmental Cell**. v.20, n.2, p.244-255, 2011.

BEZERRA, F. T. G.; SILVA, A. W. B.; RISSI, V. B; ROSA, P. A.; DE CESARO, M. P.; COSTA, J. J. N.; GONÇALVES, P. B. D.; SILVA, J. R. V. Cilostamide and follicular hemisections inhibit oocyte meiosis resumption and regulate gene expression and cAMP levels in bovine cumulus-oocyte complexes. **Livestock Science**, v. 184, p. 112–118, 2016.

BING, Y. Z.; NAGAI, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of cysteamine, FSH and estradiol-17 β on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**. v.55, p.867--876, 2001.

BLAHA, M.; NEMCOVA, L.; PROCHAZKA, R. Cyclic guanosine monophosphate does not inhibit gonadotropin-induced activation of mitogen-activated protein kinase 3/1 in pig cumulus-oocyte complexes. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.13, p.1, 2015.

BORGES, J. M. L.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M.; GONÇALVES, P. B. D.; RIECK, A. C. Influência das gonadotrofinas na regulação da maturação nuclear de oócitos equinos. **Ciência Rural**, v.28, p.293-297, 1998.

BOYER, L. A. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v.122, p.947-956, 2005.

BUEHR, M.; MEEK, S.; BLAIR, K.; YANG, J.; URE, J.; SILVA, J.; MCLAY, R.; HALL, J.; YING, Q. L.; SMITH, A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. **Cell**, v.135, p.1287-1298, 2008.

CAIADO CASTRO, V. S. D.; SÁ BARRETTO, L. S.; GARCIA, J. M.; MINGOTI G. Z. Influência do suplemento de macromoléculas e da atmosfera gasosa na maturação de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31 (Supl.), p.272-273, 2003.

CAMARGO, L. S.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; ALBUQUERQUE, F. T. et al. Criopreservação de Ovócitos Bovinos Imaturos com 1,2 Propanediol. **Pesq. agropec. bras**, v.32, n.12, p.325-331, 1997.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**. v.113, p.643-655, 2003.

CHAMBERS, I. The Molecular Basis of Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells. **Cloning and Stem Cells**. v.6, n.4, p.386-391, 2004.

CHIAMENTI, A.; AGUIAR FILHO, C. R.; FREITAS NETO, L. M.; CHAVES, R. M.; PAULA-LOPES, F.; LIMA, P. F.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L. Effects of retinoids on the *in vitro* development of Capra Hircus embryos to blastocysts in two different culture systems. **Reprod. Domest. Anim**. v.45, p.68-72, 2010.

CILLO, F.; BREVINI, T.A.; ANTONINI, S.; PAFFONI, A.; RAGNI, G.; GANDOLFI, F. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. **Reproduction**. v.50, p.134:645, 2007.

CNA BRASIL. Pecuária de corte: Balanço 2016, Perspectivas 2017. 2016. Disponível em:http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/13_pecuaria_decorte.pdf. Acesso 03 de dezembro de 2017.

COCKBURN, K.; ROSSANT, J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. **Journal of Clinical Investigation**. v.120, n.4, p.995-1003, 2010.

COLONNA, R.; TATONE, C.; FRANCIONE, A. et al. Protein kinase C is required for disappearance of MPF upon artificial activation in mouse eggs. **Mol. Rep. Dev.**, v.48, p.292-299, 1997.

CONCEIÇÃO, J. C.; MOURA, M. T.; FERREIRA-SILVA, J. C.; RAMOS-DEUS, P.; SILVA, P. G.; CANTANHÊDE, L. F.; CHAVES, R. M.; LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A. Use of retinoids during oocyte maturation diminishes apoptosis in caprine embryos. **Acta Vet Hung.** v.63, n.2, p.234-42, 2015.

CONTI, M. Specificity of the cyclic adenosine 3', 5''-monophosphate signal in granulosa cell function. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1653-61, 2002.

CORDOVA, B.; MORATO, R.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; PARAMIO, T.; GUTIERREZADAN, A.; MOGAS, T. Effect of leptin during *in vitro* maturation of prepubertal calf oocytes: embryonic development and relative mRNA abundances of genes involved in apoptosis and oocyte competence. **Theriogenology**, v.76, p.1706-1715, 2011.

DATTENA, M.; CHESSA, B.; LACERENZA, D.; ACCARDO, C.; PILICHI, S.; MARA, L.; CHESSA, F.; VINCENTI, L.; CAPPAL, P. Isolation, culture, and characterization of embryonic cell lines from vitrified sheep blastocysts. **Mol Reprod Dev** v.73, p.1-9, 2006.

DEJOSEZ, M. et al. Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells. **Cell**. v.133, p.1162-1174, 2008.

DEKEL, N. Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol**, v.234, p.19-25, 2005

DEROO, B. J.; RODRIGUEZ, K. F.; COUSE, J. F.; HAMILTON, K. J.; COLLINS, J. B.; GRISSOM, S. F.; KORACH, K. S. Estrogen receptor beta is required for optimal cAMP production in mouse granulosa cells. **Molecular and Endocrinology**, v. 23, n. 7, p. 955-65, 2009.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final

maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 5-20, 2002.

DINIZ, E. G.; ESPER, C.R.; JACOMINI, J.O.; VIEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.57, p.70-76, 2005.

DOWNS, S.M.; DOW, M.P.; FAGBOHUN, C.F. The meiotic response of cumulus cell-enclosed mouse oocytes to follicle-stimulating hormone in the presence of different macromolecules. **J Exp Zool**. p.258, p.373-83, 1991.

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

DU PUY, L.; LOPES, S. M.; HAAGSMAN, H. P.; ROELEN, B. A. Analysis of co-expression of OCT4, NANOG and SOX2 in pluripotent cells of the porcine embryo, *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology** v.75, n.3, p.513-526, 2011.

DUMESIC, D. A.; MELDRUM, D. R.; KATZ-JAFFE, M. G.; KRISHER, R. L.; SCHOOLCRAFT, W. B. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 2, p. 303-16, 2015.

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M. J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**. v.54, p.197-207, 1996.

ESPEY, L. L. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. **Biology of Reproduction**, v. 22, n. 1, p. 73-106, 1980.

EVANS, M. J; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, p. 154-156, 1981.

FAIR, T.; CARTER, F.; PARK, S.; EVANS, A.; LONERGAN, P. Global gene expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 68, p. 591–597, 2007.

FAGNOCCHI, L.; ZIPPO, A. Multiple Roles of MYC in Integrating Regulatory Networks of Pluripotent Stem Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, p. 7, 2017.

FIDALGO, M.; SHEKAR, P. C.; ANG, Y. S.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S. H.; WANG, J. ZFP281 functions as a transcriptional repressor for pluripotency of mouse embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 29, n. 11, p. 1705-1716, 2011.

FIDALGO, M.; FAIOLA, F.; PEREIRA, C. F.; DING, J.; SAUNDERS, A.; GINGOLD, J.; SCHANIEL, C.; LEMISCHKA, I. R.; SILVA, J. C.; WANG, J. ZFP281 mediates NANOG autorepression through recruitment of the NuRD complex and inhibits somatic cell reprogramming. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 40, p. 16202-16207, 2012.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction** v. 50, p. 225-232, 1994.

FOUGEROUSSE, F., BULLEN, P., HERASSE, M., LINDSAY, S., RICHARD, I., WILSON, D., SUEL, L., DURAND, M., ROBSON, S., ABITBOL, M. et al. Human-mouse differences in the embryonic expression patterns of developmental control genes and disease genes. **Hum. Mol. Genet.** v. 9, p.165-173, 2000.

FÜLÖP, C.; SALUSTRI, A.; HASCALL, V.C. Coding sequence of a hyaluronan synthase homologue expressed during expansion of the mouse cumulus-oocyte complex. **Arch Biochem Biophys.** v.6, p.337:261, 1997.

GALAN-CARIDAD, J. M.; HAREL, S.; ARENZANA, T. L.; HOU, Z. E.; DOETSCH, F. K.; MIRNY, L. A.; REIZIS, B. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. **Cell Cycle.** v.129 (2). p. 345-357. 2007.

GANDOLFI, T. A.; GANDOLFI E. F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1255-76. 2001.

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, p.47-52, 2011.

GÉRARD, N.; CAILLAUD M.; MARTORIATI A.; GOUDET, G.; LALMANACH, A. C. The interleukin-1 system and female reproduction. **The Journal of Endocrinology**, v. 180, n. 2, p. 203-212, 2004.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci.** v.82/83, p.431-46, 2004.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; MYLLYMAA, S.; KAIVO-OJA, N.; DRAGOVIC, R. A.; HICKEY, T. E.; RITVOS, O.; MOTTERSHEAD, D. G. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 18, p. 3811-3821, 2006.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; KOT, K.; MEIRA, C.; BERGFELT, D. F. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 524-529, 2003.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

GOISSIS, M. D., SYBILLE, J. B. Functional characterization of Sox2 in bovine preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**. v.90, n.2, p.30, 2014.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda. 2002.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008.

GOUGEON, A.; DELANGLE, A.; AROUCHE, N.; STRIDSBERG, M.; GOTTELAND, J. P.; LOUMAYE, E. Kit Ligand and the Somatostatin Receptor Antagonist, BIM-23627, Stimulate *in vitro* Resting Follicle Growth in the Neonatal Mouse Ovary. **Endocrinology**, v.151, p. 1299–1309, 2010.

GRANOT, I.; DEKEL, N. The ovarian gap junction protein connexin43: regulation by gonadotropins. **Trends Endocrinol Metab**. v.13, p.310, 2002.

GRAZUL-BILSKA, A.T.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Gap junctions in the ovaries. **Biol Reprod**. v.57, p.947–57, 1997.

HAFEZ, E.S.E Diagnóstico de gestação. Reprodução animal. 6 ed. São Paulo: Manole. p.95-114, 1995.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: Hafez ESE, Hafez B. Reprodução animal. 7.ed. Barueri, SP: Manole, p.37-38, 2004.

HAMATANI, T.; YAMADA, M.; AKUTSU, H.; KUJI, N.; MOCHIMARU, Y.; TAKANO, M.; TOYODA, M.; MIYADO, K.; UMEZAWA, A.; YOSHIMURA, Y. What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes. **Reproduction**, v. 135, p. 581–592, 2008.

HANDYSIDE, A.; HOOPER, M.L.; KAUFMAN, M.H.; WILMUT, I. Towards the isolation of embryonal stem cell lines from the sheep. **Roux's Arch Dev Biol.** v.196, p.185-190, 1987.

HANLEY, N. A.; HAGAN, D. M.; CLEMENT-JONES, M.; BALL, S. G.; STRACHAN, T.; SALAS CORTES, L.; MCELREAVEY, K.; LINDSAY, S.; ROBSON, S.; BULLEN, P. et al. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. **Mech. Dev.** v.91, p.403-407, 2000.

HAREL, S.; TU, E. Y.; WEISBERG, S.; ESQUILIN, M.; CHAMBERS, S. M.; LIU, B.; CARSON, C. T.; STUDER, L.; REIZIS, B.; TOMISHIMA, M. J. ZFX controls the self-renewal of human embryonic stem cells. **PLoS One**, v. 7, n .8, artigo e42302, 2012.

HE, S.; PANT, D.; SCHIFFMACHER, A.; BISCHOFF, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W.; KEEFER, C. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of NANOG protein localization in the nucleolus. **Molecular Reproduction and Development** v.73, n.12, p.1512-1522, 2006.

HENG, J.C.D. et al. Transcription actors for the Modulation of Pluripotency and Reprogramming. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantative Biology**, v. 75, p. 237-244, 2010.

HONDA, A.; HIROSE, M.; HARA, K.; MATOBA, S.;INOUE, K. et al. Isolation, characterization, and *in vitro* and *in vivo* differentiation of putative thecal stem cells. **PNAS**, v.104 no. 30, p.12389–12394, 2007.

HUANG, X.; HAN, X.; UYUNBILIG, B.; ZHANG, M.; DUO, S.; ZUO, Y.; ZHAO, Y.; YUN, T.; TAI, D.; WANG, C.; LI, J.; LI, X.; LI, R. Establishment of bovine trophoblast stem-like cells from *in vitro*-produced blastocyst-stage embryos using two inhibitors. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 13, p. 1501-1514, 2014.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DER DONK, J.A.; VAN DEN HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17-

estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*. v.44, p.217-226, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. 2016. Produção da Pecuária Municipal. v. 44. Disponível em https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf. Acesso em 29 jan 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. 2012. **Banco de dados agregados**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl1.asp?c=73&z=p&o=27&i=P>>. Acesso em: 04 mai 2015.

JAIN, T.; JAIN, A.; KUMAR, P.; GOSWAMI, S.; DE, S.; SINGH, D. et al. Kinetics of GDF9 expression in buffalo oocytes during *in vitro* maturation and their associated development ability. **Gen Comp Endocrinol**. v.84, p.178:477, 2012.

JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Gestation, prenatal physiology, and parturition. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reproduction in farm animals. 7th Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.171-181, 2000.

JOHNSON, M.L.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A.; BILSKI, J.J.; GRAZUL-BILSKA, A.T. Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. **Endocrine**. v.18, p.261–270, 2002.

KAWAMURA, K.; KUMAGAI, J.; SUDO, S.; CHUN, S. Y.; PISARSKA, M.; MORITA, H.; TOPPARI, J.; FU, P.; WADE, J. D.; BATHGATE, R. A. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 19, p. 7323-7328, 2004.

KAWASHIMA I, OKAZAKI T, NOMA N, NISHIBORI M, YAMASHITA Y, SHIMADA M. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is

critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation *in vivo* and *in vitro*. **Reproduction**, v.136, p.9 – 21, 2008.

KHAN, D.R.; GUILLEMETTE, C.; SIRARD, M,A; RICHARD, F.J. Characterization of FSH signalling networks in bovine cumulus cells: a perspective on oocyte competence acquisition. **Molecular Human Reproduction**. v.21, p.688–701, 2015.

KIND KL, BANWELL KM, GEBHARDT KM, MACPHERSON A, GAULD A, RUSSELL DL, THOMPSON JG. Microarray analysis of mRNA from cumulus cells following *in vivo* or *in vitro* maturation of mouse cumulus –oocyte complexes. **Reprod Fertil Dev**. v.25, p.426 – 438, 2013.

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

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

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.48, n.1, p.76-86. 1979.

LENGNER, C.J.; WELSTEAD, G.G.; JAENISCH, R. The pluripotency regulator Oct4: A role in somatic stem cell?. **Cell Cycle**. v.7 (6). p. 725-728. 2008.

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

LI, L.; ZHENG, P.; DEAN, J. Maternal control of early mouse development. **Development**. v.137, p. 859-870, 2010.

LIM, H.; PARIA, B.C.; DAS, S.K.; DINCHUK, J.E.; LANGENBACH, R.; TRZASKOS, J.M.; DEY, S.K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v.91, p.197–208, 1997.

LIMA-VERDE, I.B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Rev Bras Reprod Anim**, v.35, p.472-482, 2011.

LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.65, n.1, p.137-52, 2006.

LONERGAN, P. Produção in vitro de embriões bovinos - Lidando com problemas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, n.2, p.349-360, 2008.

LONERGAN P.; FAIR T. Maturation of Oocytes *in vitro*. **Annual Review Animal Bioscience**, v.4, p. 255-68, 2015.

LUOH, S.W.; BAIN, P. A.; POLAKIEWICZ, R. D.; GOODHEART, M. L.; GARDNER, H.; JAENISCH, R, Page DC. ZFX mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. **Development**, v. 124, n. 11, p. 2275-2284, 1997.

MADEJA, Z. E.; SOSNOWSKI, J.; HRYNIEWICZ, K.; WARZYCH, E.; PAWLAK, P.; ROZWADOWSKA, N.; PLUSA, B.; LECHNIAK, D. Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development. **BMC Developmental Biology**, v. 13, p. 32, 2013.

MAGALHÃES, D.M.; SALES, E.T.; PADILHA, R.T.; SILVA, T.F.P.; TONIOLI, R.; FIGUEIREDO JR. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses *in vivo* e *in vitro*. **Rev Bras Reprod Anim**, v.36, p.32-38, 2012.

MARTIN, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci (USA)** v.78, p.7634-7638, 1981.

MARTINS, F.S.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO JR. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, p.36-49, 2008.

MCKENZIE, L.J.; PANGAS, S.A.; CARSON, S.A.; KOVANCI, E.; CISNEROS, P.; BUSTER, J.E. et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. **Hum Reprod**. v.19, p.2869–74, 2004.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod Domest Anim**, v.36, p.183-188, 2001.

MEISSNER, A.; JAENISCH, R. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. **Nature** v.439, n.7073, p.212-215, 2006.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J.; GOOD, T.E.; IRELAND, J.L.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 811-819, 2000.

MIHM, M.; BLEACH, E. C. L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 217–237, 2003.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SILVA, A. P. T. B.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.4, p.328-333, out./dez. 2013.

MELLO RRC, FERREIRA JE, SOUSA SLG, MELLO MRB, PALHANO HB. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1198–1207, 1999.

MILES, J. R.; MCDANELD, T. G.; WIEDMANN, R. T.; CUSHMAN, R. A.; ECHTERNKAMP, S. E.; VALLET, J. L.; SMITH, T. P. MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes: possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 1-2, p. 16-26, 2012.

MILLER, J. B.; RUSSELL, P. The cdc 25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. **Cell**, v. 68, n. 3, p. 407-410, 1992.

MINGOTI, G.Z. Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides. 2000. 141p. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MITCHELL, P.A.; BURGHARDT, R.C. The ontogeny of nexuses (gap junctions) in the ovary of the fetal mouse. **Anat Rec**. v.214, p.283, 1996.

MITO, T., YOSHIOKA, K., NOGUCHI, M., YAMASHITA, S., AND HOSHI, H. Recombinant human follicle-stimulating hormone and transforming growth factor-alpha enhance *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** v.80, p.549-560, 2013.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAMASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**. v.113, p.631-642, 2003.

MORITA, K.; SASAKI, H.; FURUSE, K.; FURUSE, M.; TSUKITA, S.; MIYACHI, Y. Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. **Exp Dermatol**. v.12, p.289–95, 2003.

MONDADORI R.G.; SANTIN, T.R.; FIDELIS, A.A.G.; NAME, K.P.O.; SILVA, J.S.; RUMPF, R.; BÁO, S.N. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) **Zygote**. v.18, p. 309–314, 2010.

MOURA, M. T.; SILVA, P. G. C.; SILVA, J. C. F.; RAMOS-DEUS, P.; CANTANHÊDE, L. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Expression of pluripotency genes during caprine embryonic development. **Relatório do programa pós- doutorado do CNPq**, 2014a.

MOURA, M.T.; SILVA, P. G. C. ; SILVA, J. C. F. ; DEUS, P. R. ; CANTANHEDE, L. F. ; SILVA, R. L. O. ; OLIVEIRA, M. A. L. Expressão de genes relacionados a pluripotência em células do cumulus de caprinos e ovinos. In: XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE (JEPEX 2014) Recife. **Anais da XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE (JEPEX 2014)**, v. 1. p. 1-2, 2014b.

MOURA, M.T.; SILVA, R. L. O. ; CANTANHEDE, L. F. ; NASCIMENTO, P. S. ; CHAVES, M. S. ; SILVA, P. G. C. ; OLIVEIRA, M. A. L. . Expressão de genes relacionados a pluripotência em células do cumulus, ovócitos e embriões caprinos por RT-qPCR. In: XV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE (JEPEX 2015), Recife. **XV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE (JEPEX 2015)**, 2015.

MOTTA, P.M.; NOTTOLA, S.A.; PEREDA, J.; CROXATTO, H.B.; FAMILIARI, G. Ultrastructure of human cumulus oophorus: a transmission electron microscopic study on oviductal oocytes and fertilized eggs. **Hum Reprod**. v.10, p.2361–7, 1995.

MOURA, M.T., SILVA, R. L. O., CANTANHEDE, L. F., SILVA, J. B., FERREIRA-SILVA, J. C., SILVA, P. G. C., PANDOLFI, V., KIDO, E. A., BENKO-ISEPPON, A. M., OLIVEIRA, M. A. L. Activity Of Non-Canonical Pluripotency-Associated Transcription Factors In Goat Cumulus-Oocyte Complexes. **Livestock Science**, 2018.

NAGYOVA, E.; CAMAIONI, A.; PROCHAZKA, R.; SALUSTRI, A. Covalent transfer of heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor family proteins to hyaluronan in

in vivo and *in vitro* expanded porcine oocyte-cumulus complexes. **Biol Reprod**, v.71, p.1838–1843, 2004.

NAGYOVA, E.; KALOUS, J.; NEMCOVA, L. Increased expression of pentraxin 3 after *in vivo* and *in vitro* stimulation with gonadotropins in porcine oocyte-cumulus complexes and mural granulosa cells. **Domest. Anim. Endocrinol**, v.56, p.29–35, 2016.

NG, R.K.; GURDON, J.B. Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. **PNAS** v.102, n.6, p.1957-1962, 2005.

NG, R.K.; GURDON, J.B. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. **Nature Cell Biology** v.10, n.1, p102-109, 2008.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; KIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHÖLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotency stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**. V.95, p. 379-391, 1998.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nat. Genet.** v.24, p. 372-376, 2000.

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

NUTTINCK, F.; GALL, L.; RUFFINI, S.; LAFFONT, L.; CLEMENT, L.; REINAUD, P.; ADENOT, P.; GRIMARD, B.; CHARPIGNY, G.; MARQUANT-LE GUIENNE, B. PTGS2-related PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in

cattle: late effects on early embryonic development. **Biology of reproduction**, v.84, p.1248- 1257, 2011.

ORISAKA, M.; TAJIMA, K.; TSANG, B.K.; KOTSUJI, F. Oocyte-granulosa-theca cell interaction during preantral follicular development. **J Ovarian Res.** v.9, p.2–9, 2009.

PANDEY, A.; GUPTA, S. C.; GUPTA, N. Effect of FSH and LH hormones on oocyte maturation of buffalo and gene expression analysis of their receptors and Cx43 in maturing oocytes. **Zygote**, v.18, p. 231–234, 2010.

PAYEN, E.; PAILHOUX, E.; GIANQUINTO, L.; HAYES, H.; PENNEC, N.L.; BEZARD, J.; COTINOT, C. The ovine *SOX2* gene: sequence, chromosomal localization and gonadal expression. **Gene**. v.189, p.143–147, 1997.

PEIPPO, J.; FARAZMAND, A.; KURKILAHTI, M.; MARKKULA, M.; BASRUR, P. K.; KING, W. A. Sex-chromosome linked gene expression in in-vitro produced bovine embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 10, p. 923-929, 2002.

PERA, M.F.; TROUNSON, A.O. Human embryonic stem cells: prospects for development. **Development**. v.131, p.5515–5525, 2004.

PETER, A. T.; LEVINE, H.; DROST, M.; BERGFELT, D. R. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1343-1357, 2009.

PIEDRAHITA, J.A.; MOORE, K.; OETAMA, B.; LEE, C.K.; SCALES, N.; RAMSOONDAR, J.; BAZER, F.W.; OTT, T. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. **Biology of Reproduction**. v.58, p.1321-1329, 1998.

PRICE, C.A.; WEBB, R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinology**. v.122, n.5, p.2222-31. 1988.

PROCHAZKA, R.; BLAHA, M.; NEMCOVA, L. Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. **Reproduction**, v.144, p.535–546, 2012.

RICHARDS, J. S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, v.60, n.1, p.51-89. 1980.

RICHARDS, J. S. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Molecular Endocrinology*, v.15, n.2, p.209-18. 2001.

ROSSANT, J. Developmental biology: A mouse is not a cow. **Nature**. v.471, p.457-458, 2011.

SANNA, D.; SANNA, A.; MARA, L.; PILICHI, S.; MASTINU, A.; CHESSA, F.; PANI, L.; DATTENA, M. Oct4 expression in in-vitro-produced sheep blastocysts and embryonic-stem-like cells. **Cell Biol Int**. v.34, n.1, p.53-60, 2009.

SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; ARAÚJO, V.R.; CHAVES, R.N.; ALMEIDA, A.P.; LIMA-VERDE, I.B.; DUARTE, A.B.G.; SILVA, G.M. et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Zygote**, v.19, p.205–214, 2010.

SARTORI R.; FRICKE P.M.; FERREIRA J.C.; GINTHER O.J.; WILTBANK M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, n.5, p.1403-9. 2001.

SENGER, P.L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2nd Ed. Washington: Current Conceptions Inc., p. 368, 2003.

SHIOYA, Y.; KUWAYAMA, M.; FUKUSHIMA, M. et al. *In vitro* fertilization and cleavage capability of follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. **Theriogenology**, v.30, p.489-489, 1998

SHIRAZI, A. et al. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheeps oocytes during *in vitro* maturation. **Small Ruminant Research**, v.68, p. 291-295, 2007.

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, n. 3, p. 203-209, 2002.

SILVA, A.W.B.; BEZERRA, F.T.G.; COSTA, J.J.N.; ROSSI, R.O.D.S.; PASSOS, M.J.; VASCONCELOS, G.L.; ROSSETTO, R.; DONATO, M.A.M.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; CAMPELLO C.C.; SARAIVA, M.V.A.; FIGUEIREDO, J.R.; PEIXOTO, C.A.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Differential effects of activin-A and FSH on growth, viability and messenger RNA expression in cultured bovine preantral follicles. **Livestock Science**, v. 160, n. 4, p. 199–207, 2014.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK R.; FIGUEIREDO J.R. Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 55, p. 23-135. 2016.

SILVER, L.M.; MARTIN, G.R.; STRICKLAND, S. (eds). Teratocarcinoma Stem Cells. **Cold Spring Harbor Laboratory**, New York, 1983.

SIQUEIRA, L.C.; DOS SANTOS, J.T.; FERREIRA, R.; SOUZA DOS SANTOS, R.; DOS REIS, A.M.; OLIVEIRA, J.F.; FORTUNE, J.E.; GONÇALVES, P.B.D. Preovulatory changes in the angiotensin II system in bovine follicles. **Reproduction and Fertility Development**, v. 25, n. 3, p. 539–546, 2013.

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.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v.68, n. 1, p. 71-76, 2007.

SMITH, A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.17, p.435-462, 2001.

STEPHENSON, R.O. et al. Intercellular interactions, position, and polarity in establishing blastocyst cell lineages and embryonic axes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, p.1-15, 2012.

STITZEL, M.L.; SEYDOUX, G. Regulation of the oocyte-to-zygote transition. **Science**. v.316, n.5823, p.407-408, 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. **Biol Reprod**, v.64, p.904-909, 2001.

STRUMPF, D.; MAO, C.A.; YAMANAKA, Y.; RALSTON, A.; CHAWENGSAKSOPHAK, K.; BECK, F.; ROSSANT, J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. **Development** v.132, n.9, p.2093-2102, 2005.

SUGIURA, K.; PENDOLA, F.L.; EPPIG, J.J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Dev Biol**. v.279(1), p.20-30, 2005.

TALBOT, N.C.; BLOMBERG, L.A. The pursuit of ES cell lines of domesticated ungulates. **Stem Cell Rev**. v.4, p.235-54, 2008.

TAY, Y. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. **Nature**, v.455, p.1124-1128, 2008.

TETSUKA, M.; TAKAGI, R.; AMBO, N.; MYAT, T. S.; ZEMPO, Y.; ONUMA, A. Glucocorticoid Metabolism in the Bovine Cumulus-Oocyte Complex 1 matured *in vitro*. **Reproduction**, v.82, p.151-73, 2016.

THOMAS FH, ETHIER JF, SHIMASAKI S, VANDERHYDEN BC. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. **Endocrinology**;146:941–9, 2005.

TIRONE, E.; D’ALESSANDRIS, C.; HASCALL, V.C.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI A. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). **J Biol Chem**, v.272, p.4787–4794, 1997.

VAN TOL, H.T., VAN EIJK, M.J., MUMMERY, C.L., VAN DEN HURK, R. AND BEVERS, M.M. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.218-224, 1996.

WANG, J.; RAO, S.; CHU, J.; SHEN, X.; LEVASSEUR, D. N.; THEUNISSEN, T. W.; ORKIN, S. H. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 364-368, 2006.

WANG, Z. X.; THE, C. H.; CHAN, C. M.; CHU, C.; ROSSBACH, M.; KUNARSO, G.; ALLAPITCHAY, T. B.; WONG, K. Y.; STANTON, L. W. The transcription factor ZFP281 controls embryonic stem cell pluripotency by direct activation and repression of target genes. **Stem Cells**, v. 26, n. 11, p. 2791-2799, 2008.

WATERSTON, R. H.; LINDBLAD-TOH, K.; BIRNEY, E.; ROGERS, J.; ABRIL, J. F.; AGARWAL, P.; AGARWALA, R.; AINSCOUGH, R.; ALEXANDERSSON, M.; AN, P. et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature** v.420, p.520-562, 2002.

WELSTEAD, G.G.; SCHORDERET, P.; BOYER, L.A. The reprogramming language of pluripotency. **Curr Opin Genet Dev.** v.18, p.123-129, 2008.

WILMUT, I.; BEAUJEAN, N.; DE SOUSA, P.A.; DINNYES, A.; KING, T.J.; PATERSON, L. A.; WELLS, D.N.; YOUNG, L.E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature** v.419, n.6907, p.583-586, 2002.

WU, Y.; TANG, L.; CAI, J.; LU, X.; XU, J.; ZHU, X.; LUO, Q.; HUANG, H. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1526–1531, 2007.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows: biological factors. **Theriogenology**, v.49, p.471-482, 1998.

ZAEHRES, H.; LENSCH, M.W.; DAHERON, L.; STEWART, S.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; GEORGE, Q.; DALEY, M.D. High-Efficiency RNA Interference in Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**. v.23, p.299-305, 2005.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P.J. et al. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. **Mol. Reprod. Devel.**, v.40, p.338-344, 1995.

ZHU, S.X.; SUN, Z.; ZHANG, J.P. Ovine (*Ovis aries*) blastula from an *in vitro* production system and isolation of primary embryonic stem cells. **Zygote** (Cambridge, England). v.15, p.35– 41, 2007.

ZWAKA, T. P. Ronin and caspases in embryonic stem cells: a new perspective on regulation of the pluripotent state. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.73, p.163-169, 2008.

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 Artigo 1

Revista: Acta Hungarica

EFEITO DO FSH SOBRE A ATIVIDADE ENERGÉTICA DOS COMPLEXOS CUMULUS-OVÓCITOS BOVINO DURANTE MATURAÇÃO *IN VITRO*

Ludymila F. CANTANHÊDE¹, Cristiane T. S. SILVA¹, Marcelo T. MOURA¹, Júnior M. B. OLIVEIRA¹, Daniel N. A. GONÇALVES¹, Valéria W. TEIXEIRA¹, Marcos A. L. OLIVEIRA^{1*}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

O objetivo foi analisar o efeito do FSH durante a maturação *in vitro* sobre a atividade dos complexos cumulus-ovócitos (CCOs) de bovinos. Os CCOs foram selecionados para maturação *in vitro* (MIV) e submetidos ao meio MIV com e sem pFSH. Após análise da maturação e da expansão das células do cumulus, os ovócitos foram desnudados e o meio MIV das gotas dos dois grupos foram estocados a -20 °C. Foram analisadas concentrações de estradiol, proteína, açúcar, glicogênio e lipídio nos grupos de meio MIV com e sem FSH, antes e após maturação (G-FSHIN, G-CTLIN, G-FSH, G-CTL, respectivamente). O percentual de ovócitos maturados no G-FSH (96,47%) foi maior do que o G-CTL (88,76%; $p = 0,006$). A concentração de estradiol não diferiu entre G-FSH (116,0±50,8) e G-CTL (97,6±18,0), mas os grupos com atividade celular apresentaram maior concentração de estradiol (G-FSH e G-CTL). Foi observada diminuição das concentrações de glicogênio e açúcar nos meio após maturação (G-FSH e G-CTL). O FSH aumenta a expansão das células do cumulus além de auxiliar a utilização do glicogênio pelos COCs para seu metabolismo energético durante a maturação *in vitro* de bovinos.

Palavras-chave: Biomoléculas, hormônio, meio de cultivo, metabolism, qualidade ovocitária.

1. INTRODUÇÃO

Os ovócitos sofrem modificações nucleares e citoplasmáticas durante a maturação *in vitro* (MIV). Através dessas modificações o ovócito adquire competência que o permite ser fecundado e coordenar as divisões celulares iniciais para desempenhar esses dois processos. As modificações nucleares necessárias para fecundação e desenvolvimento são: a quebra da vesícula germinativa, desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (Meinecke et al., 2001). As modificações citoplasmáticas estão relacionadas às mudanças estruturais através de eventos bioquímicos, proteínas envolvidas no reinício e regulação da meiose (Sousa et al., 2004; Dekel, 2005; Dumont et al., 2005). As modificações citoplasmáticas durante a aquisição da competência ovocitária incluem a síntese de proteínas (Sirard et al., 1998) e organização das organelas celulares (Stojkovic et al., 2001), além da ativação dos mecanismos de capacidade de liberação do Ca^{2+} (Wang et al., 2003).

As modificações que acontecem durante a maturação ovocitária também dependem da composição do fluido folicular. Hormônios esteroides, pituitários, citocinas e fatores de crescimento são encontrados no fluido folicular e estão relacionados ao desenvolvimento do gameta feminino, à fecundação (Salmassi et al., 2005). Como os demais hormônios esteroides, o estradiol também é encontrado no fluido folicular e, durante o período pré-ovulatório, sua concentração aumenta, sendo assim utilizado como indicador da maturação ovocitária (Costa et al., 1976; Acosta et al., 2004). O aumento da concentração de estradiol é ocasionado pelo aumento da produção do hormônio folículo estimulante (FSH) através da hipófise, que por sua vez, atua nos folículos ovarianos.

Com o intuito de mimetizar o fluido folicular, foram desenvolvidos meios sintéticos para suprir as necessidades da produção *in vitro* (PIV). O meio base de maturação de ovócitos mais utilizado na MIV de bovinos é *Tissue Culture Medium* (TCM-199) que inicialmente foi utilizado para cultivar outros tipos celulares (Gordon, 1994), ainda necessita de suplementos para simular as condições do ambiente folicular *in vivo*. O principal hormônio utilizado nos diferentes protocolos de MIV é o FSH. O FSH é essencial para modulação da expressão do gene BMP-15 durante o crescimento de ovócitos, além disso, atua em conjunto com outros genes que propiciam e regulam o desenvolvimento folicular (Thomas et al., 2005). Estudos demonstraram a importância

do FSH para manutenção da viabilidade folicular após a MIV (Mao et al., 2004; Matos et al., 2007; Saraiva et al., 2008). Visto a importância da composição do meio MIV para a produção de embriões e a influência do FSH neste processo, o objetivo foi analisar o efeito do FSH durante a MIV sobre a atividade dos complexos cumulus-ovócito (COCs) de bovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado Comitê de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (licença 030/2016 e número do processo 23082.013495/2015).

2.1 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

A MIV foi realizada de acordo com os protocolos de Chiamenti et al. (2010), Conceição et al. (2015) e Moura et al. (2018). Os ovários foram coletados em abatedouro das cidades de São Lourenço da Mata e Caruaru (Pernambuco, Brasil) e transportados em solução salina contendo $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina estreptomicina (Gibco by Life Technologies) a 35°C para o Laboratório de Biotécnicas aplicadas à Reprodução na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os COCs foram aspirados em TCM-199 com sais de Hank's (Sigma Aldrich) suplementado com 2 mM l-glutamina (Sigma Aldrich), 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco by Life Technologies) e $0,05\text{mg mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina (Gibco by Life Technologies). Os COCs classificados em grau 1 e 2 (Grau 1: três ou mais camadas de células do cumulus, citoplasma homogêneo; Grau 2: menos de três camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo) e aleatoriamente separados em dois grupos, onde G-FSH teve a adição de $0,05 \text{ UI mL}^{-1}$ de pFSH (Sigma Aldrich) no meio MIV enquanto que o meio MIV do grupo controle (G-CTL) teve adição apenas do veículo do hormônio. Os meios MIV foram ajustados quanto ao pH e a osmolaridade ($7,2 - 7,4$ e $260 - 280\text{mOsm}$, respectivamente). O meio MIV foi composto pelo TCM-199 com sais de Earle's com 2mM l-glutamina, 10% de SFB e 10 UI mL^{-1} e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina estreptomicina (Gibco by Life Technologies). Os grupos foram compostos de *pools* de 20 – 25 de COCs (Van Tol, et al., 1996) por gota de $150 \mu\text{L}$ de meio MIV em estufa com 5% de CO_2 e umidade saturada a $38,5^{\circ}\text{C}$ por 22 horas.

2.1.1 AVALIAÇÃO DA MIV

Foi feita avaliação subjetiva da expansão das células do cumulus, através da comparação do tamanho das camadas das células ao redor do ovócito, após 22 horas de MIV e em seguida os ovócitos foram desnudados com 0,2% de hialuronidase (Sigma Aldrich) durante 5 minutos. Para determinação da taxa de maturação nuclear, os ovócitos foram avaliados quanto à extrusão do primeiro corpúsculo polar.

2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE HORMONAL E BIOQUÍMICA

Foram utilizados os meios dos grupos com e sem FSH (G-FSH e G-CTL, respectivamente), antes e após a MIV (G-FSHIN e G-CTLIN, respectivamente). As amostras foram colocadas separadamente em microtubos e centrifugadas a 2000 g por 5 min para a obtenção do sobrenadante. Todas as amostras dos quatro grupos experimentais (Figura 1) foram estocadas a -20°C para posterior análise hormonal (2.2.1) e bioquímica (2.2.2).

2.2.1 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE ESTRADIOL

As análises de estradiol foram feitas no Centro de Apoio à Pesquisa da UFRPE (CENAPESQ) utilizando o kit Estradiol 2 X 50 DET – BC e Estradiol CAL S0-S5 Access (Biosystems NE e Hosp LTD) e o equipamento de imunoensaio Access 2 (Beckman Coulter).

2.2.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia de Inseto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE com espectrofotômetro Bel photonics SP 2000 UV, utilizando os protocolos descritos a seguir.

- **PROTEÍNAS TOTAIS**

Para análise de proteínas totais foi utilizado o método de Ensaio de Bradford (Bradford, 1976), com Azul de Comassie. Foi adicionado 100 µL das amostras e 5 mL da solução de Bradford para detecção da proteína através da tonalidade azul e após 2 min, as amostras foram levadas ao espectrofotômetro com leitura de 595 nm para análise da concentração.

- GLICOGÊNIO, LIPÍDEO E AÇÚCAR

As concentrações totais de glicogênio, lipídeo e açúcar foram avaliadas seguindo o método de Van Handel (1985a, b). Foi adicionado 200 μ L de sulfato de sódio e 800 μ L de clorofórmio metanol (1:1) em 200 μ L em cada amostra do meio MIV. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 2 min. O precipitado foi usado para análise de glicogênio e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio, para separação de açúcares e lipídeos. Os lipídeos foram analisados por espectrofotometria usando ácido fosfórico e vanilina (Van Handel, 1985a), enquanto o açúcar e a concentração de glicogênio foram analisados com ácido sulfúrico e antrona (Van Handel 1985b). A absorbância foi lida a 625 nm e foram utilizadas cinco repetições em duplicata por grupo experimental (G-FSH, G-FSHIN, G-CTL, G-CTLIN).

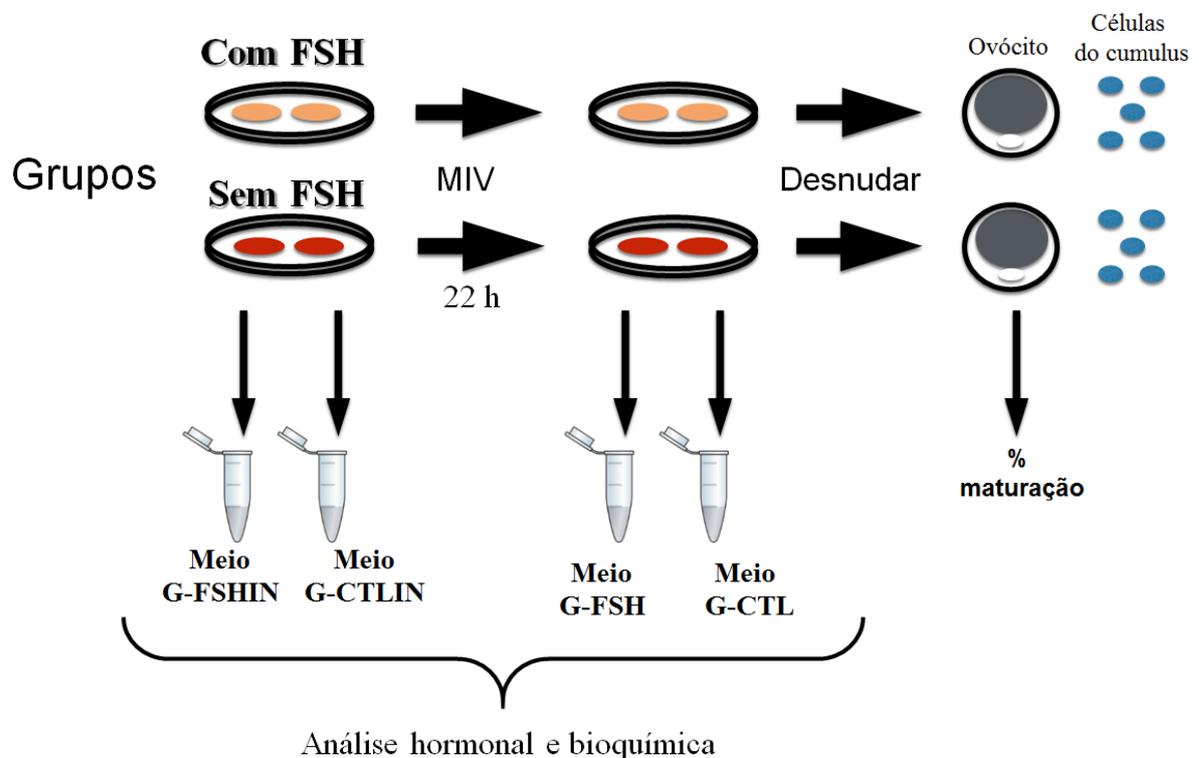


Figura 1: Delineamento experimental para análise dos efeitos celulares e moleculares do FSH sobre maturação in vitro de complexos cumulus-ovócitos de bovinos. G-FSH: Meio após maturação com FSH; G-FSHIN: Meio antes da maturação com FSH; G-CTL: Meio após maturação sem FSH; G-CTLIN: meio antes da maturação sem FSH.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se inicialmente, realizou-se uma transformação logarítmica de base 10 dos valores obtidos de estradiol (pg mL^{-1}) e os dados de glicogênio e açúcar foram submetidos à transformação radicial e logarítmica, em seguida, os dados hormonais e bioquímicos foram expressos através da média, desvio padrão, mediana e limite inferior e superior. Avaliou-se a distribuição dos valores (normalidade) pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente o teste de Tukey HSD e Student-Newman-Keuls (Sampaio, 1998). A taxa de maturação nuclear dos ovócitos foi avaliada através do teste do Qui-quadrado. O programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi 5,0%.

3. RESULTADOS

A expansão das células do cumulus do grupo com a presença de FSH (G-FSH) foi maior do que as células do grupo controle (G-CTL), além disso o percentual de ovócitos maturados no G-FSH foi maior do que o G-CTL ($p = 0,006$; Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de maturação ovocitária de bovinos em meios com e sem FSH após 22 horas de MIV.

| Grupo | n ° ovócitos | Ovócitos maturados (%) |
|--------------|---------------------|-------------------------------|
| G-FSH | 170 | 164 (96,47) ^A |
| G-CTL | 178 | 158 (88,76) ^B |

Foram feitas cinco replicas biológicas de cada grupo. G-FSH: Meio após maturação com FSH; G-CTL: Meio após maturação sem FSH; Média e porcentagem dos valores; Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna indica diferença estatística ($P < 0,05$). Teste do Qui-quadrado

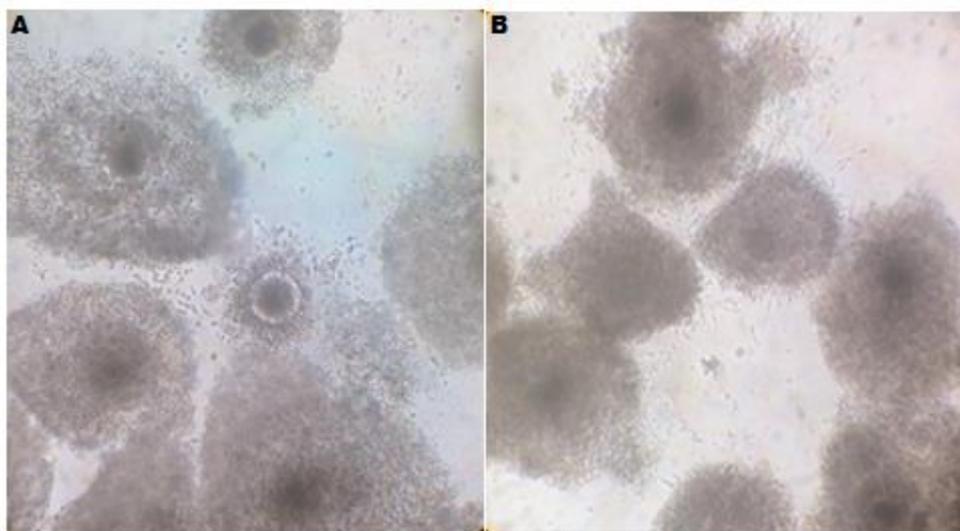


Figura 2: Expansão das células do cumulus após maturação ovocitária *in vitro*: A) Com suplementação de FSH, B) Sem suplementação de FSH.

Tabela 2. Comparação entre os valores obtidos de estradiol (pg mL^{-1}) em meio MIV com e sem FSH, antes e após 22 horas de maturação ovocitária de bovinos.

| | Tratamentos | | | |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | Com FSH | | Sem FSH | |
| | G-FSHIN | G-FSH | G-CTLIN | G-CTL |
| Média \pm DP | 58,3 \pm 8,6 ^B | 116,0 \pm 50,8 ^A | 56,0 \pm 0,0 ^B | 97,6 \pm 18,0 ^{AB} |
| Mediana | 60,0 | 95,0 | 56,0 | 99,0 |
| Limite Inferior | 49,0 | 79,0 | 56,0 | 79 |
| Limite Superior | 66,0 | 174,0 | 56,0 | 115,0 |

G-FSH: Meio após maturação com FSH; G-CTL: Meio após maturação sem FSH; G-FSHIN: Meio antes da maturação com FSH; G-CTLIN: Meio antes da maturação sem FSH. DP – Desvio Padrão; Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indica diferença estatística ($P < 0,05$). Teste F, teste de Tukey HSD e Student-Newman-Keuls.

Na Tabela 2 pode-se observar a análise da concentração de estradiol nos quatro grupos. Foi observado maior valor no grupo após maturação ovocitária com meio contendo FSH – G-FSH (116,0 \pm 50,8), este diferiu dos grupos antes da MIV (G-FSHIN

e G-CTLIN), porém não foi observada diferença sobre G-CTL ($97,6 \pm 18,0$). Por sua vez, o G-CTL não diferiu do G-FSHIN ($58,3 \pm 8,6$) nem do G-CTLIN ($56,0 \pm 0,0$). Não houve diferença entre G-FSHIN e G-CTLIN.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da análise bioquímica. A concentração de proteína e de lipídeos mantiveram valores constantes nos grupos com meios de maturação (MIV), tanto com e sem FSH, com e sem CCO. Em relação ao açúcar, a maior concentração foi observada nos grupos com meios antes da maturação, sem adição dos CCO, com FSH ($146,8 \pm 35,9$) e sem FSH ($146,1 \pm 32,6$), nos quais diferiram dos grupos com CCO após maturação. Os meios com CCO demonstraram ter a menor concentração de açúcar, com FSH ($43,4 \pm 25,9$) e sem FSH ($41,3 \pm 19,1$), não diferindo entre eles. A menor concentração de glicogênio foi observada no G-FSH ($2,2 \pm 4,1$), diferindo de todos os outros grupos. Não houve diferença entre os meios com ($14,8 \pm 6,0$) e sem FSH ($12,1 \pm 4,9$) antes da maturação, bem como também com o meio após maturação ovocitária sem FSH ($8,9 \pm 5,5$).

Tabela 3. Efeito do FSH sobre o metabolismo de complexos cumulus-ovócitos bovinos, antes e após 22 horas de maturação, observados no meio de MIV.

| | Tratamentos | | | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Com FSH | | Controle | |
| | G-FSH-IN | G-FSH | G-CTL-IN | G-CTL |
| Proteína | $22,0 \pm 1,4^A$ | $22,9 \pm 2,6^A$ | $21,5 \pm 4,9^A$ | $22,2 \pm 2,9^A$ |
| Lipídeo | $26,1 \pm 0,7^A$ | $27,0 \pm 2,2^A$ | $26,2 \pm 3,4^A$ | $25,9 \pm 2,2^A$ |
| Açúcar | $146,8 \pm 35,9^A$ | $43,4 \pm 25,9^B$ | $146,1 \pm 32,6^A$ | $41,3 \pm 19,1^B$ |
| Glicogênio | $14,8 \pm 6,0^A$ | $2,2 \pm 4,1^B$ | $12,1 \pm 4,9^A$ | $8,9 \pm 5,5^A$ |

G-FSH: Meio após maturação com FSH; G-CTL: Meio após maturação sem FSH; G-FSHIN: Meio antes da maturação com FSH; G-CTLIN: Meio antes da maturação sem FSH; *Média e Desvio Padrão dos valores; Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indica diferença estatística ($P < 0,05$). Teste F, teste de Tukey HSD e Student-Newman-Keuls.

4. DISCUSSÃO

A retirada do ovócito do ambiente folicular para produção *in vitro* de embriões tem consequências que acarretam na queda da qualidade e da competência ovocitária, quando comparados às condições *in vivo*, devido à perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre o gameta e as células foliculares (Gottardi e Mingoti, 2009). Dessa forma é importante que o sistema *in vitro* seja o mais semelhante possível às condições fisiológicas.

Neste trabalho, foi observado o aumento da expansão das células do cumulus e maturação nuclear na presença FSH, reafirmando a importância deste hormônio para mediar modificações importantes durante a MIV. A atividade do FSH é mediada pelas células do cumulus que circundam o ovócito e este às estimula a produzir fatores que são essenciais para competência ovocitária (Moor e Dai, 2001; Gilchrist et al., 2004). A expressão gênica e o estado fisiológico das células do cumulus são baseados na interação metabólica bidirecional com o ovócito através de junções GAP (Regassa et al. 2011) e indiretamente por redes de sinalização parácrinas (Paulini & Melo 2011). Adriaens et al. (2004) constataram que o FSH é responsável pelo crescimento e dominância do folículo antral e é essencial para o desenvolvimento dos ovócitos competente durante a MIV. Adicionado ao meio MIV, o FSH promove aumento da expansão das células do cumulus (Younis e Brackett, 1992) e estimula a produção de substâncias sinalizadoras que induzem à retomada da meiose.

O FSH atua na modulação do transcriptoma das células do cumulus através das vias da proteína quinase A (PKA) e do fator de crescimento epidérmico (EGF). Estes transcritos expressos foram relacionados com a expansão do cumulus, esteroidogênese, metabolismo celular e competência oocitária (Khan et al., 2015). Para inferir o efeito do FSH sobre as células do cumulus sob as condições descritas neste trabalho, a análise da concentração de estradiol no meio foi realizada antes e após a MIV. Os meios analisados após a MIV, independente da presença do FSH, obtiveram concentrações maiores do que os meios antes da MIV. Também foi observada a importância da presença celular para síntese de estradiol, uma vez que não houve diferença entre os grupos após maturação. O aumento da síntese de estradiol pelas células do cumulus mediado pelo FSH é um mecanismo conhecido em diversas espécies (Hulshof et al., 1995; Yarak et al., 2005; Stocco, 2008). Nas células dos cumulus, ocorre a conversão de testosterona em estradiol pela aromatase sob efeito do FSH. Sob condições *in vitro*,

Bolamba e colaboradores (2006) também observaram aumento da expansão das células do cumulus de folículos antrais após a MIV na presença de FSH. O estradiol apresenta funções importantes na gametogênese, como o aumento das taxas de maturação nuclear do ovócito (Mingoti et al., 1995; Rao et al. 2002) e aquisição da competência oocitária (Pellicer, 1997).

A composição do meio de MIV é essencial para aquisição da competência oocitária, deste modo, foi analisada a composição bioquímica através das análises das concentrações de proteína, glicogênio, lipídeo e açúcar. Com este trabalho, podemos analisar e comparar, além da ação do FSH, a importância da presença celular e a demanda de atividade energética no meio durante a MIV. Durante este processo, ovócito passa por diversas modificações citoplasmáticas e nuclear durante a maturação, adquirindo competência para ser fecundado e permitir o desenvolvimento do embrião. Foi observado que as concentrações de proteínas foram constantes em todos os meios dos grupos experimentais. Esta semelhança pode ser explicada pela alta atividade protéica intracelular (Sirard et al., 1998) em comparação ao meio extracelular. Entre as proteínas que mais se destacam durante as modificações necessárias para a MIV, estão as proteínas do complexo fator promotor da maturação (MPF) e da família proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), relacionadas com a divisão celular, condensação dos cromossomos, rompimento do envelope nuclear (Krischek e Meinecke, 2002; Lefebvre et al., 2002) e progressão da meiose, além da fosforilação de diversos substratos (Roux e Blenis, 2004), respectivamente.

Com relação à concentração de lipídios, foi semelhante para todos os grupos, mas este é um componente importante para o meio MIV, pois o colesterol é um lipídio precursor do estradiol. Sob ação do LH, o colesterol é transportado para as mitocôndrias e, pela ação da enzima desmolase, é convertido em pregnolona e depois em progesterona (Giometti et al., 2009). A progesterona pode ser convertida em um andrógeno, a testosterona, sob a ação da 17β -redutase. Ao penetrar nas células da granulosa a testosterona é convertida em estradiol pela enzima aromatase, que tem sua atividade estimulada pela atuação do FSH (Stocco, 2008).

O metabolismo celular e os níveis de adenosina trifosfato (ATP) no complexo cumulus-ovócitos durante a MIV estão associados à competência ovocitária e ao desenvolvimento embrionário normal. Conforme descrito acima, demonstrou-se que os açúcares e o glicogênio presentes no meio são utilizados ativamente pelas células do

cumulus, e possivelmente, pelo ovócito como fonte de energia durante a MIV. Foi observado que o metabolismo do açúcar independe do FSH e sim com a atividade celular basal das células do cumulus. Sutton et al. (2003) compararam a atividade metabólica do complexo cumulus-ovócitos com o tempo de maturação e observaram aumento no consumo de oxigênio, glicose e piruvato ao longo da MIV. Além disso, a maioria da glicose consumida no início da MIV era utilizada via glicólise, possivelmente para a formação da matriz extracelular do cumulus. No entanto, foi observado que o glicogênio foi metabolizado de forma preferencial pelas células do cumulus na presença do FSH. As reservas energéticas são essenciais para a atividade celular e durante a maturação ovocitária, vários processos demandam energia, como a síntese de RNA (Sousa et al., 1998), migração e redistribuição de organelas no citoplasma, reorganização dos microtúbulos durante os eventos nucleares e citoplasmáticos (Kim et al., 2000; Can et al., 2003; Sun et al., 2004; Gottardi e Mingoti, 2009). Foi observada relação do tamanho do ovócito, via metabólica, com sinalizações parácrinas com as células do cumulus (Gilchrist, et al., 2008). Melo et al (2016) analisaram um *pool* de genes relacionados com a competência ovocitária em folículos menores (>3mm) e maiores (<8mm) com o objetivo de avaliar a competência ovocitária antes da PIV. Foram observadas diferenças na expressão de genes responsáveis por vias metabólicas distintas, como o metabolismo energético, sinalização celular, ciclo celular, reparo de DNA, meiose e inflamação. Genes responsáveis pelo metabolismo energético demonstraram alta expressão em folículos maiores, demonstrando a necessidade de reserva energética.

5. CONCLUSÃO

Durante o processo de maturação ovocitária é necessária a demanda de açúcar e glicogênio utilizados pelo CCOs. A adição de FSH no meio aumenta a expansão das células do cumulus e a maturação do ovócito, além de auxiliar a utilização do glicogênio pelos COCs para seu metabolismo energético durante a MIV de bovinos.

6. REFERÊNCIAS

- Adriaens, I., Cortvrindt, R., Smitz, J. (2004): Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Human Reproduction*, **19**, 398–408.
- Acosta, T. J. and Miyamoto. A. (2004): Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, **82-83**, 127-140.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Bolamba, D., Russ, K.D, Harper, S.A., Sandler, J.L., Durrant, B.S..(2006): Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, **65**, 1037-1047.
- Can, A., Semiz, O, Çinar, O. (2003): Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod*, **9**, 749-756.
- Costa, L.O., Mendes M.C., Ferriani, R.A., Moura, M.D., Reis, R.M., Silva, D.E., Sá, M.F. (1976): Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes. *Braz J Med Biol Res*, **11**, 1747-55.
- Dekel, N. (2005): Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol*, **234**, 19-25.
- Dumont, J., Umbhauer, M., Rassinier, P., Hanauer, A., Verlhac, M.H.(2005): p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. *J Cell Biol*, **169**, 227-231.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Armstrong, D.T. (2004): Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*; **82/83:431–46**.
- Gilchrist, R.B., Lane, M., Thompson, J.G.(2008): Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, **14**, 159 –177.
- Giometti, I.C., Castilho, A.C.S., Sá-Filho, O.G., Papa, P.C., Buratini, Jr, J. (2009): Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. *Rev Bras Reprod Anim*, **33**, 34-52.
- Gordon I. (1994): Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CABI International, **640**.

- Gottardi, F.P, Mingoti, G.Z. (2009): Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, **33**, 2, 82-94.
- Hulshof, S.J., Figueiredo, Jr., Beckers, J.F., Bevers, M.M., Van Der Donk J.A., Van Den Hurk R. (1995): Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, **44**, 217-226.
- Khan, D.R., Guillemette, C., Sirard, M.A., Richard, F.J. (2015): Characterization of FSH signalling networks in bovine cumulus cells: a perspective on oocyte competence acquisition. *Mol Hum Reprod.*, **21**, 688–701.
- Kim, N.H., Cho, S.K., Choi, S.H., Kim, E.Y., Park, S., Pill, Lim, J.H. (2000): The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes *in vitro* maturation. *Zygote*, **8**, 25-32.
- Krischek, C., Meinecke, B. (2002): *In vitro* maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. *Anim Reprod Sci*, **73**, 129-140.
- Lefebvre, C., Terret, M.R., Djiane, A., Rassinier, P., Maro, B., Verlhac, M.H.(2002): Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J Cell Biol*, **157**, 603-613.
- Lima-Verde, I.B., Matos, M.H.T., Saraiva, M.V.A, Bruno, J.B., Tenório, S.B., Martins, F.S., Cunha, L.D., Name, K.P.O, Bão, S.N., Campello, C.C., Figueiredo, Jr. (2010): Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles. *Cells Tissues Organs*, **191**, 240-247.
- Mao, J., Smith, M.F., Rucker, E.B., Wu, G.M., Mccauley, T.C., Cantley, T.C., et al. (2004) Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. *J Anim Sci*; **82**:1967–75.
- Matos, M.H.T., Lima-Verde, I.B., Luque, M.C.A., Maia, Jr., Je, Silva, J.R.V., Celestino, J.J.H., et al. (2007) Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*; **15**:173–82.
- Meinecke, B., Janas, U., Podhajsky, E., Meinecke-Tillmann, S.(2001): Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. *Reprod Domest Anim*, **36**, 183-188.

- Melo, E.O., Cordeiro, D.M., Pellegrino, R., Wei, Z., Daye, Z.I., Nishimuraa, R.C., Dode, M.A.N. (2016): Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. *Animal Genetics*, **48**, 19–2.
- Mingoti, G.Z., Garcia, J.M., Rosa-E-Silva, A.A. (1995): The effect of serum on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. *Braz J Med Res*, **28**, 213-217.
- Moor, R., Dai, Y. (2001): Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Reprod Suppl.* **58**:91–104.
- Motola, S., Popliker, M., Tsafiriri, A. (2008): Response of follicle cells to ovulatory Stimuli Within The Follicle And In Primary Culture. *Mol Cell Endocrinol*, **282**, 26-31.
- Moura, M.T., Silva, R. L. O., Cantanhede, L. F., Silva, J. B., Ferreira-Silva, J. C., Silva, P. G. C., Pandolfi, V., Kido, E. A., Benko-Iseppon, A. M., Oliveira, M. A. L. (2018): Activity Of Non-Canonical Pluripotency-Associated Transcription Factors In Goat Cumulus-Oocyte Complexes. *Livestock Science*.
- Paulini F. and Melo, E.O. (2011): The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* **46**, 354–61.
- Pellicer A. (1997): Oestrogens and follicular and oocyte development. *Hum Reprod Update*, **3**, 93-94.
- Rao, B.S., Naidu, K.S., Amarnath, D., Vagdevi, R., Rao, A.S., Brahmaiah, K.V., Rao, V.H. (2002): *In vitro* maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. *Small Rumin Res*, **43**, 31-36.
- Regassa, A., Rings, F., Hoelker, M., Cinar, U., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K., Tesfaye D. (2011): Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. *BMC Genomics* **12**, 57.
- Salmassi, A., Schmutzler, A.G., Schaefer, S., Koch, K., Hedderich, J., Jonat, W., et al. (2005): Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod*; **9**, 2434-40.
- Sampaio, I.B.M. (1998): *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. **221**.
- Saraiva, Mva, Celestino Jjh, Chaves Rn, Martins Fs, Bruno Jb, Lima-Verde IB, et al. Influence of different concentrations of LH andFSH on *in vitro* caprine primordial ovarian follicle development. *Small Rumin Re*, v.78, p.87–95, 2008.
- Sirard, M.A., Richard, F., Mayes, M. (1998): Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*, **49**, 483-497.

- Sousa, P.A., Silva, S.J.M., Anderson R.A. (2004): Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. *Cloning Stem Cells*, **6**, 375-385.
- Stocco C. (2008): Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*, **73**, 473-487.
- STOJKOVIC M, MACHADO SA, SOTOJKOVIC P, ZAKHARTCHENKO V, HUTZLER P, GONÇALVES PB, 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. **Biol Reprod**, v.64, p.904-909, 2001.
- Sun, Q.Y. (2003): Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech*, **61**, 342-348.
- Sutton, M.L., Cetica, P.D., Beconi, M.T., Kind, K.L., Gilchrist, R.B. and Thompson, J. (2003): Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*, **126**, 27-34.
- Thomas, F.H., Ethier, J.F., Shimasaki, S., Vanderhyden, B.C. (2005): Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, **9**, 146:941.
- Van Handel, E. (1985a): Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1**, 302-304.
- Van Handel, E. (1985b): Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1**, 299-301.
- Van Den Hurk, R., Zhao, J. (2005): Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, **63**, 1717-51.
- Van Tol, H.T.A., Van Eijk, M.J.T., Mummery, C.L., Van Den Hurk, C.L., Bevers, M.M.. (1996): Influence of FSH and hCG on the Resumption of Meiosis of Bovine Oocytes Surrounded by Cumulus Cells Connected to Membrana Granulosa. *Molecular reproduction and development*, **45**: 2 18-224.
- Wang, W., Day, B.N., Wu, G. (2003): How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microsc Res Tech*, **61**, 335-341.
- Yarak, S., Parada, M.O.A.B, Bagatin, E., Talarico-Filho, S., Hassun, K.M.. (2005): Hiperandrogenismo e pele: síndrome do ovário policístico e resistência periférica à insulina. *Anais Bras Dermatol*, **80**, 395-410.
- Younis, A.I., Brackett, B.G. (1992): Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, **2**, 44-51.

5.2 Artigo 2

Revista: *Reproduction*

**VALIDAÇÃO DE GENES REFERÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FATORES
DE TRANSCRIÇÃO MODULADOS PELO FSH EM CÉLULAS DO CUMULUS
DE BOVINOS DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO***

Ludymila Furtado Cantanhêde^a, Marcelo Tigre Moura^{a*}, Roberta Lane Oliveira Silva^b,
Pábola Santos Nascimento^a, Ana Maria Benko-Iseppon^b, Marcos Antonio Lemos
Oliveira^a

^aLaboratório de Biotécnicas Reprodutivas, Departamento de Medicina Veterinária,
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil;

^bLaboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética,
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil;

* Autor correspondente: M.T. Moura. Email: marcelotmoura@gmail.com

RESUMO

O objetivo foi determinar se os GRPs, RONIN, CMYC, ZFX e ZFP281, tem expressão influenciada pelo FSH nas células do cumulus durante o processo de maturação *in vitro* (MIV) de complexos cumulus-ovócitos (CCO) de bovinos. Os CCOs foram submetidos à MIV em dois grupos (com e sem FSH) em meio base contendo TCM-199 com sais de

Earle's, 2 mM de l-glutamina, 10% soro fetal bovino e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH ou PBS (controle) em umidade saturada, 5% de CO_2 a 39 °C. Após a MIV, as células do cumulus foram utilizadas para análise da expressão gênica por RT-qPCR. Foi feita a validação de genes referência (GR) para normalização da RT-qPCR através da análise de eficiência e estabilidade de sete GR candidatos. Após estabilidade e através dos softwares geNorm, Normfinder e Bestkeeper, identificou-se os GR Ubiquitina B, YWHAZ e ATP1A1 como os mais estáveis para normalização da expressão gênica na RT-qPCR.. Pela primeira vez foi relatada expressão dos genes ZFX e ZFP281 em células do cumulus de bovinos, embora não tenham sua expressão influenciada pelo FSH. A atividade do CMYC foi reprimida pelo FSH, enquanto que RONIN foi induzido. Em conclusão, o ZFX e ZFP281 são novos GRPs identificados em células do cumulus, enquanto que a atividade dos genes RONIN e cMYC é modulado pelo FSH nas células do cumulus de bovinos durante a MIV.

Palavras-chave: *Bos taurus*, Expressão diferencial, Gametogênese, Meiose, Proto-oncogene, RTq-PCR, THAP1.

1. INTRODUÇÃO

Modificações no núcleo e no citoplasma acontecem no ovócito até que este adquira competência e condições adequadas para fecundação e o desenvolvimento do embrião. Durante a maturação também ocorrem modificações nas células localizadas ao seu redor do ovócito, chamadas de células do *cumulus*. Estas células são de extrema importância para o desenvolvimento e competência ovocitária. Em bovinos, foi constatado que a regulação da maturação do ovócito é mediada pelas células do cumulus através da ativação da proteína quinase C (PK-C) (BERTAGNOLLI et al.,

2004). A PK-C participa de alguns processos celulares e, além de regular a maturação do oócito, também regula a transição de ovócito maduro para zigoto (COLONNA et al., 1997). Além disso, a transmissão de sinais entre ovócitos e células do cumulus favorece o reinício da meiose pelo aumento do metabolismo ovocitário e pela localização mais periférica das organelas (MONDADORI, 2010). As células do cumulus também estimulam a atividade do hormônio folículo estimulante (FSH) e este, por sua vez, atuam sobre essas células para produzir fatores que são essenciais para competência ovocitária (MOOR e DAI, 2001; GILCHRIST et al., 2004). A expressão gênica e o estado fisiológico das células do cumulus são estimulados pela comunicação metabólica com o ovócito através de junções comunicantes (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005; REGASSA et al. 2011; PAULINI & MELO 2011).

Estudos constataram que o FSH é responsável pelo crescimento e dominância do folículo antral e é essencial para o desenvolvimento de ovócitos competente durante o cultivo *in vitro* dos folículos (ADRIAENS et al., 2004) e adicionado ao meio MIV, o FSH promove aumento da expansão das células do *cumulus* (YOUNIS e BRACKETT, 1992). Atualmente existem diferentes protocolos de MIV, porém, em sua maioria, utilizam o FSH devido a seu extenso leque de atuação. Dentre eles, o FSH ajuda a modular a expressão do gene BMP-15 durante o crescimento de ovócitos, além de atuar na regulação e desenvolvimento folicular (THOMAS et al., 2005). Da mesma forma, estudos também demonstraram a importância do FSH na produção *in vitro* de embriões para manutenção da viabilidade folicular durante o cultivo (MAO et al., 2004; MATOS et al., 2007; SARAIVA et al., 2008).

Apesar do crescente avanço no aprimoramento de protocolos de PIV nas últimas décadas ainda são necessárias pesquisas mais aprofundadas na área até que as taxas de

PIV se equiparem com as taxas *in vivo*. A análise da expressão gênica por PCR (Reação em cadeia de polimerase) em tempo real, pode contribuir para relacionar a atividade gênica com diferentes processos biológicos. A análise de expressão gênica pode ser feito pela Reação de cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), através da transcrição reversa seguida da reação em cadeia de DNA-polimerase através de marcadores fluorescentes que quantificam a expressão dos produtos de amplificação em tempo real (GACHON et al., 2004). Várias classes de genes ainda não foram caracterizadas em oócitos e em células do cumulus, como os genes relacionados à pluripotência (GRPs), responsáveis pelas primeiras diferenciações celulares e que possuem papel essencial no desenvolvimento embrionário (HENG et al., 2010; STEPHENSON et al., 2012). Em pequenos ruminantes, foi observada expressão de alguns GRPs (OCT4, DAX1, NAC1, ZFP281, ZFX e RONIN) em fibroblastos, gametas, células do cumulus e embriões (PEIPPO et al., 2002; MOURA et al., 2018). ZFP281 foi detectado em ovócitos, células do cumulus, embriões clivados e blastocistos. Por sua vez, RONIN foi detectado tanto em células do cumulus como em blastocistos (MOURA et al., 2014). O gene C-MYC, GRP relacionado ao metabolismo celular foi detectado em ovócitos e blastocistos de bovinos (MILES et al., 2012; MADEJA et al., 2013). Devido à importância e utilização do FSH no protocolos de PIV, esses genes podem ser influenciados por este hormônio durante a MIV por serem essenciais para a fertilidade e para a produção de ovócitos viáveis e para manutenção da viabilidade dos embriões no início do seu desenvolvimento.

Para que seja feita uma análise de expressão correta dos dados, faz-se necessário a normalização dos dados na RT-qPCR, uma vez que diversos fatores como integridade do RNA, integridade entre as amostras podem influenciar os resultados (BUSTIN et al., 2005). Para isso, são necessários um conjunto de genes referência que apresentem

expressão uniforme nas condições que estão sendo analisadas. Portanto, o objetivo foi validar genes referência e determinar se os GRPs candidatos (RONIN, MYC, ZFX e ZFP281) tem sua expressão influenciada pelo FSH nas células do cumulus durante a MIV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado Comitê de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob os seguintes números da licença 030/2016 e número do processo 23082.013495/2015.

2.1 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

Os ovários foram coletados no abatedouro de Caruaru (Pernambuco, Brasil) e transportados para o Laboratório de Biotécnicas aplicadas à reprodução animal - UFRPE em solução salina (0,9% NaCl) contendo $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina e estreptomicina (Gibco) a 35°C . A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada de acordo com os protocolos de CONCEIÇÃO et al. (2015) e MOURA et al. (2008, 2017). Os CCOs foram aspirados em meio *Tissue Culture Medium* (TCM - 199) com sais de Hank's (Sigma Aldrich) suplementado com 2 mM de l-glutamina (Sigma Aldrich), 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina (Gibco). Os CCOs grau 1 e 2 foram selecionados de acordo com a quantidade de camadas de células do cumulus e a homogeneidade citoplasmática do ovócito conforme descrito por MOURA et al. (2017). Em seguida, os CCOs foram aleatoriamente divididos nos dois grupos: G-FSH com adição de $0,05 \text{ UI mL}^{-1}$ de pFSH (Sigma Aldrich) no meio MIV e G-CTL contendo PBS como veículo (controle) (Figura 1). Após a preparação, os meios foram ajustados quanto ao pH (7,2 – 7,4) e a osmolaridade (260 - 280 mOsm). O meio MIV continha TCM-199 com sais de Earle's com 2 mM l-glutamina, 10% SFB, 10 UI mL^{-1} e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina e estreptomicina (Gibco). Os CCOs foram maturados

em grupos de 20 – 25 (VAN TOL, et al., 1996) por gota de 150 μL de meio MIV em estufa com 5% de CO_2 e umidade saturada a 38,5 $^\circ\text{C}$ por 22 horas.

Os ovócitos foram desnudados após a MIV com 0,2% de hialuronidase (Sigma Aldrich) durante 5 minutos e pipetagem. As células obtidas de *pools* de 80 - 150 CCOs foram lavadas em 1 mL de PBS sem cálcio e magnésio ($\text{PBS}^{-\text{Ca-Mg}}$;Sigma Aldrich), centrifugadas a 2.000 g por cinco minutos, resuspensas em 100 μL de $\text{PBS}^{-\text{Ca-Mg}}$, imersas em nitrogênio líquido (- 196 $^\circ\text{C}$) e armazenadas a - 80 $^\circ\text{C}$.

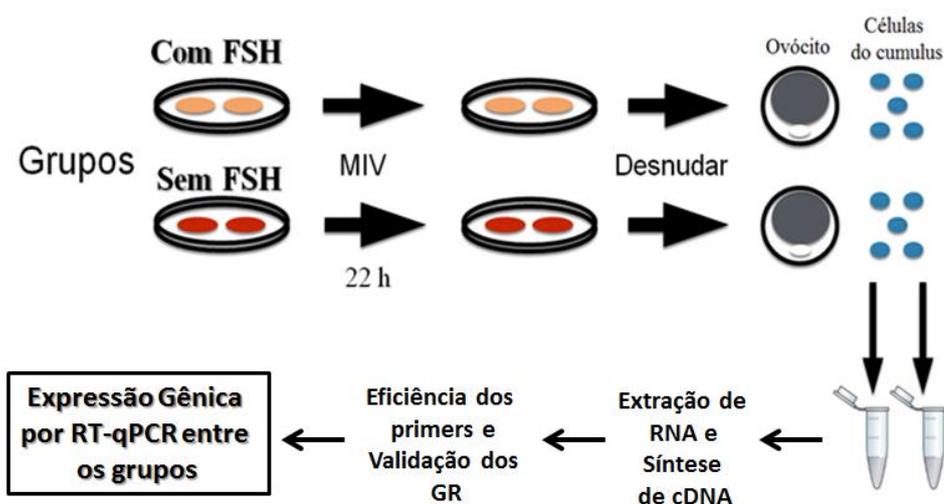


Figura 1: Preparação das amostras dos dois grupos experimentais (maturação de ovócito em meio com FSH e sem FSH) para análise da expressão gênica por RT-qPCR

2.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

A extração do RNA total de célula das células do cumulus foi realizada com o ReliaPrepTM RNA Cell Miniprep (Promega), conforme as recomendações do fabricante. O material foi retirado do - 80 $^\circ\text{C}$, foi adicionado o tampão BL + TG e vórtex por 30 segundos. Em seguida, foi adicionado Isopropanol 100% e vórtex por 30 segundos. O material foi transferido para a mini coluna do kit ReliaPrepTM e centrifugado a 14.500 g por dois minutos. Foi adicionado 500 μL da solução *RNA Wash* e centrifugado a 14.500

g por dois minutos. Em seguida, as amostras foram tratadas com solução de DNase I por 15 minutos em temperatura ambiente. Foi então adicionado 200 µL da solução *Column Wash* e centrifugado a 14.500 g por dois minutos. Foi realizada mais uma lavagem com 500 µL da solução *RNA Wash* e novamente centrifugado a 14.500 g por dois minutos. A última lavagem com 300 µL da solução de *RNA Wash* segue de uma centrifugação a 20.000 g por três minutos. A eluição foi realizada com 15 µL de H₂O RNase-free ultra-pura e centrifugação a 14.500 g por dois minutos. O RNA total foi inicialmente quantificado e avaliado com o espectrofotômetro Nanodrop 2000 C (Thermo Scientific) e quantificado para as reações de transcriptase reversa (síntese de cDNA) com o Qubit™ (Invitrogen®). A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% e as amostras foram coradas com Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia®). A eletroforese foi realizada a 80 V e 120 A por 40 minutos.

A reação de síntese de cDNA foram realizadas imediatamente após a extração e quantificação do RNA total. O procedimento foi realizado com o QuantiTect® Reverse Transcription Kit, conforme as instruções do fabricante (Qiagen). Possíveis resíduos de DNA genômico foram removidos das amostras de RNA total pela reação *Genomic DNA elimination reaction* (2 µL gDNA Wipeout buffer 7 x, 500 ng de RNA total e volume final de 14 µL), incubada a 42 °C por dois minutos e transferidos para 4 °C imediatamente. Adicionou-se a reação de eliminação de gDNA ao mix da reação de transcriptase reversa (1 µL RT Primer mix, 4 µL *Quantiscript RT Buffer 5 X* e 1 µL *Quantiscript reverse transcriptase*) e incubou-se a 42 °C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas a 95 °C por três minutos para inativação da enzima e armazenadas a - 20 °C.

2.3 PARÂMETROS PARA SÍNTESE E DESENHO DE PRIMERS

Quadro 1: Primers utilizados para detecção e validação dos genes alvos em células do cumulus de bovinos por RT- qPCR.

| Gene | Primers | Tamanho do Amplicon (bp) | Numero de acesso no GenBank |
|-------------------------|---|--------------------------|--------------------------------|
| YWHAZ | f:ccggacacagaacatccagtc r:ctccaagatgacctacgggc | 200 | NM_174814.2 (Bos taurus) |
| UBIQUITIN B | f: gcattgttgggtcctgtgtc r: cacgaagattgcatttgac | 98 | NM_001009202.1 (Ovis aries) |
| PPIA | f: gactgagtgggtggatggca r: gccatttctggacccaagc | 97 | NM_001308578.1 (Ovis aries) |
| H3F3A | f: actggaggggtgaagaaacc r: cctcacttgctcctgcaaa | 199 | NM_001014389.2 (Bos taurus) |
| GAPDH | f:tgaggggacttatgaccactg r: agaagcagggatgatgttctg | 119 | gi27525390 (Capra hircus) |
| β-ACTIN | f: tggcaccacaccttctacaac r: ggtcatcttctcacggttg | 105 | JX046106.1 (Capra hircus) |
| Genes Candidatos | | | |
| ATP1A1 | f: gcaggggatgaagaacaaga r:gagaagcagtaggggaagg | 154 | NM_001009360.1 (Ovis aries) |
| CMYC | f: actccaccgccttttctcc r: cttgttctcctcagagtcgc | 135 | NM_001046074.2 (Ovis aries) |
| ZFX | f:tccttggatgatgctggcaa r:cagtcccacctaagtcatcctc | 163 | NM_177490.1 (Bos taurus) |
| RONIN (THAP11) | f: cacgggagaagacgtaagc r: ggagccagtatcaggggaagc | 187 | NM_001104994 (Bos taurus) |
| ZFP281(ZNF281) | f:tccaaataacctccaacaggc r: ggcaatgaagatggcaacac | 194 | XM_610917.6 (Bos taurus) |
| PTGS2 | f: ggaaagaacctgggggtgga r: ccatacctgaaaaggcgcag | 83 | XM_012186886.1 (Ovis aries) |
| HAS2 | f: gccggtcgtctcaaatcctc r: acaatgcatttgttcagctc | 129 | NM_174079.2 (Bos taurus) |

2.4 PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR) - REAÇÃO ABSOLUTA

As reações de PCR quantitativa seguida da transcriptase reversa (RT-qPCR) foram realizadas no equipamento LineGene 9660 modelo FQD-96A (Bioer®), usando o sistema de detecção pelo SYBR Green. A reação foi composta por 1 µL de cDNA, 5 µL de Go Taq qPCR Master Mix 2 x (Promega), 3,4 µL de H₂O ultrapura e 0,3 µL de cada primer (2,5 µM) e volume final de 10 µL. O cDNA das células do cumulus foi utilizado sob a forma de amostras diluídas (1:10). As reações seguiram as seguintes condições: desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos. As curvas de *melting* foram analisadas em 65 – 95 °C por 20 minutos após os 40 ciclos. Os níveis de expressão dos genes candidatos foram avaliados com base no número de ciclos necessários para atingir um limiar fixo ou Ciclo de quantificação (Cq) na fase exponencial da PCR.

Os valores para eficiência dos primers considerou os seguintes parâmetros: curva de amplificação ($E = 10^{-1} / \text{slope}$), coeficiente de correlação (R²) e *interception* (y). As eficiências foram calculadas pelo método da curva padrão a partir de diluição seriadas das amostras: 1⁻⁰ (não diluído), 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ conforme descrito por RASMUSSEN (2001).

Para as análises de expressão relativa foram utilizadas três réplicas biológicas e três réplicas técnicas e três genes referência (GR) foram selecionados para a normalização dos resultados. A expressão gênica relativa foi avaliada pelo método $\Delta\Delta C_t$ através do programa Relative Expression Software Tool - REST versão 2.0.13 (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), a partir de comparações pareadas com randomização

e *bootstrapping* (*Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test*©) conforme descrito por PFAFFL et al. (2002).

3. RESULTADOS

Foi observada a eficiência de sete primers de sete genes de referência (GR) candidatos (Apêndice 1), os quais apresentaram *meltings* indicativos de reações com amplificação de produto único (Apêndice 2). A partir da curva padrão de diluição, os primers apresentaram eficiência variável (97,20% a 105,96%), com coeficientes de correlação de -0,985 a -0,999 e com declive (slope) de -3,19 a -3,39 (Tabela 1). Portanto, todos os primers apresentaram parâmetros dentro dos intervalos necessários para uso na RT-qPCR.

Tabela 1: Parâmetros utilizados para detecção dos genes referência e genes alvos em células do cumulus de bovinos por RT- qPCR.

| Gene | Tm (°C) | (Cq) Média | Eficiência dos primers % | NTC (Cq) | Coefficiente de correlação (R) | Declive | Y Intercept |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|---|---------------------|---|----------------|------------------------|
| Genes Referência | | | | | | | |
| ATP1A1 | 81.69 | 18.31 | 101.08 | ND | -0.989 | -3.30 | 26.09 |
| β-ACTINA | 84.83 | 17.12 | 103.78 | 30.02 | -0.999 | -3.23 | 26.91 |
| GAPDH | 85.43 | 16.16 | 100.60 | ND | -0.985 | -3.31 | 24.06 |
| H3F3A | 82.68 | 16.67 | 105.96 | ND | -0.996 | -3.19 | 25.31 |
| PPIA | 81.15 | 16.77 | 103.12 | 30.79 | -0.997 | -3.25 | 27.42 |
| UBICTINA B | 80.98 | 18.46 | 102.84 | 34.79 | -0.995 | -3.26 | 26.81 |
| YWHAZ | 82.09 | 18.74 | 97.20 | ND | -0.985 | -3.39 | 27.61 |
| Genes Alvos | | | | | | | |
| cMYC | 85.75 | 21.23 | 97.44 | ND | -0.970 | -3.38 | 32.47 |
| HAS2 | 81.11 | 19.74 | 98.43 | ND | -0.989 | -3.36 | 31.69 |
| PTGS2 | 76.42 | 22.64 | 94.70 | ND | -0.927 | -3.46 | 32.47 |
| RONIN | 89.63 | 22.28 | 102.65 | ND | -0.959 | -3.26 | 35.46 |
| ZFP281 | 80.78 | 20.80 | 95.21 | ND | -0.997 | -3.44 | 32.13 |
| ZFX | 80.23 | 21.41 | 102.48 | ND | -0.991 | -3.26 | 32.58 |

Dessa forma, ATP1A1, β -ACTINA, GAPDH, H3F3A, PPIA, UBICTINA B e YWHAZ foram utilizados para as avaliações de estabilidade (Apêndice 3). No geNorm, os valores de estabilidade determinaram a combinação dos GRs UBB (M = 1,181) e YWHAZ (M = 1,143) mostrou-se mais estável para as amostras experimentais de cumulus, enquanto que o ATP1A1 (M = 1,227) foi o terceiro gene mais estável na análise (Figura 2). Para determinação do número de GRs para normalização da RT-qPCR pela análise do geNorm, identificou-se que pelo menos três primers devem ser utilizados (Figura 3). A avaliação dos GRs mais estáveis pelo Normfinder também identificou UBB (M = 2,055) e YWHAZ (M = 2,006) como os GRs mais apropriados e ATP1A1 (M = 2,359) como o terceiro melhor candidato. No Bestkeeper, o coeficiente de correlação novamente identificou UBB (R = 0,879) e YWHAZ (R = 0,874) como os GRs mais estáveis e ATP1A1 (R = 0,877) como o indicado para terceiro GR. Ao considerar os resultados dos três programas de avaliação de GRs, a combinação formada por UBB, YWHAZ e ATP1A1 foi utilizada para normalização das reações de expressão relativa na RT-qPCR.

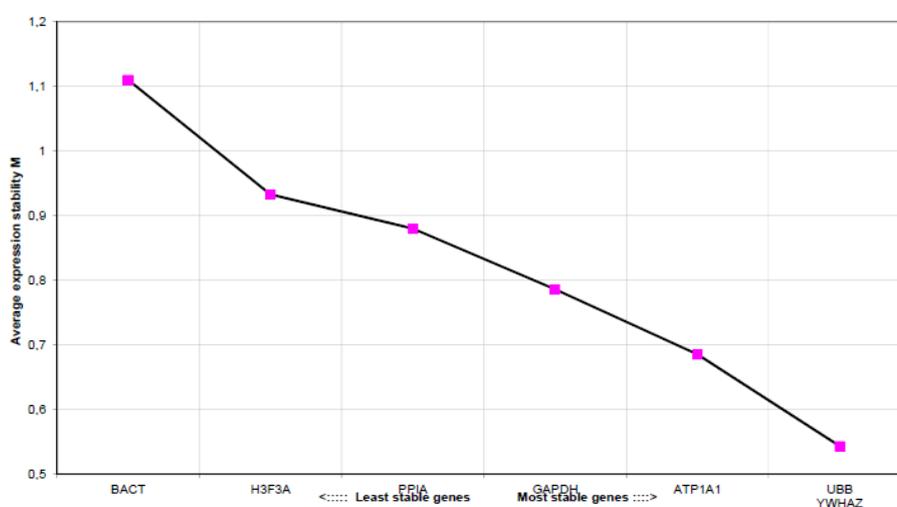


Figura 2: Rank de estabilidade do programa geNorm dos sete genes referência candidatos, nos quais UBB e o YWHAZ são os mais estáveis.

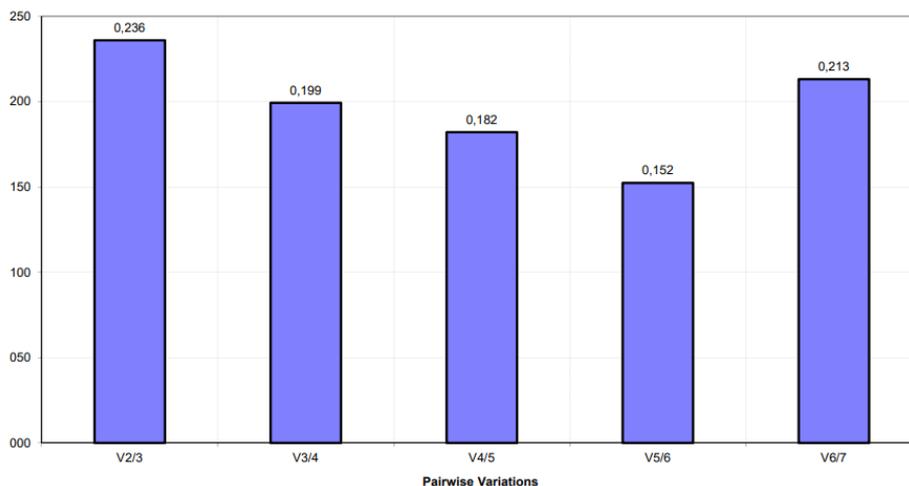


Figura 3: Determinação do número de genes referência utilizados para normalização através do programa geNorm.

Para validação da análise foi feita a expressão relativa de HAS2 e PTGS2, genes descritos regulados pelo FSH. O transcrito do gene HAS2 mostrou-se elevado nas células do cumulus expostas ao FSH, embora a expressão relativa PTGS2 tenha sido semelhante entre as amostras (Figura 9). Além disso, a atividade dos GRPs ZFX e ZFP281 não diferiu entre as amostras de células do cumulus, sugerindo que sua regulação seja independente da ação do FSH (Figura 9). A expressão de CMYC foi reduzida pela presença do FSH, apesar da diferença ter sido moderada (Figura 9). Em contrapartida, RONIN foi induzido pelo FSH, sugerindo que este GRP seja regulado direta ou indiretamente pelo hormônio (Figura 9).

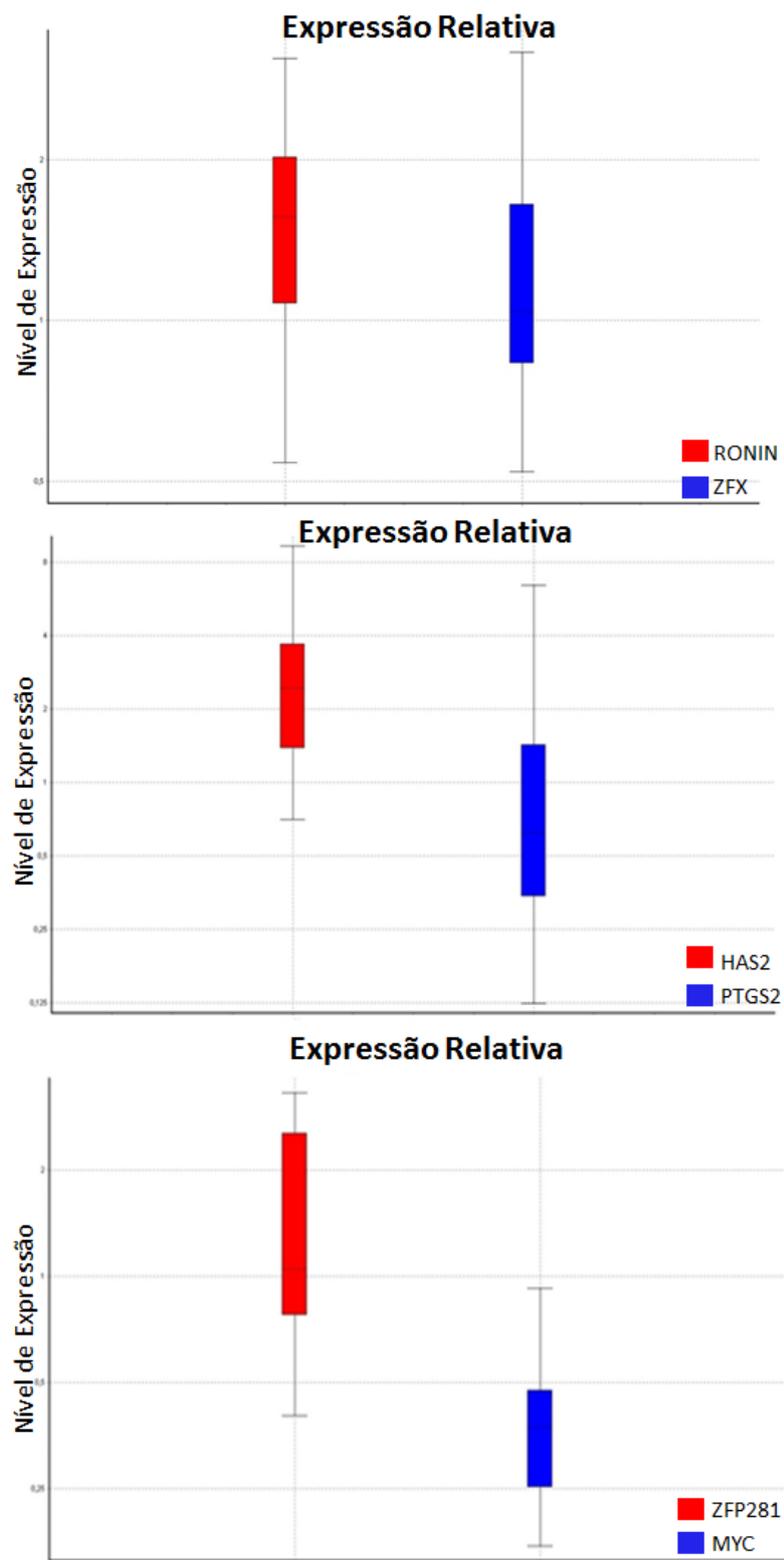


Figura 4: Expressão relativa dos genes PTGS2, HAS2, RONIN, ZFX, ZFP281 e CMYC em células do cumulus após maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

4. DISCUSSÃO

ATP1A1, UBB e YWHAZ foram os GRs mais estáveis para a normalização da RT-qPCR nas células do cumulus durante a MIV expostas ou não ao FSH. Esta plataforma é a mais indicada como método mais preciso para a avaliação da expressão gênica (PIPELERS et al., 2017). Alguns estudos realizados com células do cumulus identificaram diferentes combinações de GR para normalização da RT-qPCR em animais de produção (O'CONNOR et al., 2013; RÓLDAN-OLARTE et al., 2017; WANG et al., 2017). Porém, para garantir a precisão da expressão gênica por RT-qPCR, são necessários diversos cuidados durante o delineamento e execução do experimento (TAYLOR et al., 2010; PIPELERS et al., 2017). A análise dos GRs para normalização da expressão gênica na RT-qPCR é específica para cada situação experimental, sendo fundamentais para eliminar ou reduzir fatores técnicos e/ou biológicos sobre a análise da expressão relativa dos genes candidatos (O'CONNOR et al., 2013; WANG et al., 2017).

A presença do FSH no meio de MIV de ovócito foi associada ao aumento da expressão do gene HAS2 no cumulus, embora não tenha afetado a abundância de PTGS2. Um dos principais processos celulares durante a maturação dos ovócitos tanto *in vivo* quanto *in vitro* é a expansão das células do cumulus através da produção de ácido hialurônico (SCHOENFELDER e EINSPANIER, 2003). Esta glicosaminoglicana é produzida principalmente pela enzima sintetase HAS2 e acredita-se que facilite a liberação do gameta durante a ovulação, mantenha as células do cumulus aderidas e auxilie o processo de fecundação (SCHOENFELDER e EINSPANIER, 2003; ASSIDI et al., 2008). A influência do FSH sobre a atividade de HAS2 corroborou com estudos descritos anteriormente (SCHOENFELDER e

EINSPANIER, 2003; RICHARDS, 2005), embora a grande diferença na magnitude de indução de sua expressão seja possivelmente devido às particularidades de cada experimento. Por sua vez, a enzima PTGS2 participa da conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, principalmente a prostaglandina H2 (ASSIDI et al., 2008) e sua transcrição também é induzida pelo FSH *in vitro* (ou LH *in vivo*) e pela prostaglandina E2 (ASSIDI et al., 2008; DUGGAVATHI et al., 2008). ASSIDI e colaboradores (2008) demonstraram que a rápida exposição ao FSH aumenta a transcrição de PTGS2 em células do cumulus *in vitro*. Neste estudo não foi observado diferença da atividade da PTGS2 entre os grupos, que pode ser devido à utilização do SBF no meio, uma vez que o soro é um meio variável e pode possuir concentrações de hormônios, como o próprio FSH. Além da influência do momento de avaliação das células do cumulus, ao final da MIV, após 22 horas de maturação, conforme descrito acima.

A expressão gênica dos genes ZFP281 e ZFX não foram diferentes após a exposição das células do cumulus ao FSH. Além do potencial da sua avaliação em nível transcricional, ZFP281 forma complexos com FT associados com GRPs como OCT4, SOX2, NANOG e MYC (WANG et al., 2006, 2008; KOCH et al., 2007), afeta a eficiência da reprogramação celular em diferentes contextos (FIDALGO et al., 2012, 2016; ZHOU et al., 2017) e é regulado pelo FT SNAI2 durante a transição epitélio-mesenquimal (HAHN et al., 2013). Apesar da interação física do CMYC com ZFP281 (WANG et al., 2006; KOCH et al., 2007), os complexos protéicos formados pelo CMYC podem apresentar tamanhos e composição variável (KOCH et al., 2007), não permitindo fazer uma relação direta entre a atividade destes dois FTs e sua associação física. Em contrapartida, o gene ZFX codifica um FT que contribui para viabilidade de células germinativas e células-tronco (LUOH et al., 1997; GALAN-CARIDAD et al.,

2007; HU et al., 2009; HAREL et al., 2012). Para nosso conhecimento, este representa o primeiro relato da atividade do ZFX e ZFP281 em células do cumulus, embora suas funções nestas células permaneçam desconhecidas.

A ação do FSH sobre as células do cumulus reduziu a atividade de CMYC. O gene CMYC codifica um FT com um domínio de interação proteína-DNA helix-loop-helix básico, forma heterodímeros com a proteína MAX e tem função predominante com ativador de transcrição (EILERS & EISENMAN, 2008; RAHL et al., 2010). Além disso, a atividade de CMYC foi descrita nas células do cumulus de bovinos e camundongos (MILES et al., 2012; MAO et al., 2014). Considerando os efeitos descritos do FSH sobre as células do cumulus *in vitro* (ASSIDI et al., 2008, 2013; ZHANG et al., 2009; BLAHA et al., 2015), a redução da expressão de CMYC deve ter ocorrido através da via de sinalização AMPc-PKA conforme demonstrado em linhagens celulares obtidas de pacientes com leucemia (THOMPSON et al., 1999; LIU et al., 2015). A magnitude da redução da atividade de CMYC na presença de FSH também se assemelha ao observado em linhagens celulares de leucemia (LIU et al., 2015). Portanto, a redução da atividade de CMYC pode estar relacionada ao silenciamento de genes promotores de proliferação celular, expansão do cumulus, entre outros processos.

O transcrito do gene RONIN apresentou atividade aumentada nas células do cumulus com a adição do FSH durante a MIV. O gene RONIN foi identificado em duas prospecções independentes em células-tronco embrionárias (CTE) e numa biblioteca de cDNA de cérebro (LI et al., 1993; PANDEY et al., 2004; DEJOSEZ et al., 2008). Apesar de ser necessário para a pluripotência de CTE (DEJOSEZ et al., 2008), RONIN apresenta pouca relação com processos de diferenciação celular. Em contrapartida, este FT participa do controle do metabolismo celular, na produção de energia e síntese

proteica em diversos tipos celulares (DEJOSEZ et al., 2010; POCHÉ et al., 2016), na resposta celular aos danos no DNA (SEIFERT et al., 2017), atividade mitocondrial e na regulação do ciclo celular (POCHÉ et al., 2016). A investigação do mecanismo de controle do RONIN pelo FSH e a identificação dos genes alvos deste GRPs em células do cumulus podem representar importantes passos para o entendimento da maturação ovocitária.

O entendimento da regulação de RONIN, CMYC e outros GRPs expressos nas células do cumulus podem ter outras aplicações. O processo de reprogramação celular (conversão de células somáticas em pluripotentes) em camundongos apresenta maior eficiência quando utiliza células do cumulus ao invés de fibroblastos (MAO et al., 2014). A identificação de substâncias que modulam a expressão dos GRPs também permite diminuir o número de genes que precisariam ser introduzidos no processo de reprogramação (FEDERATION et al., 2014; THEUNISSEN e JAENISCH, 2014), incluindo o hormônio promotor da maturação GDF-9 (GONZALEZ-MUÑOZ et al., 2014). Portanto, a investigação do efeito do FSH em células do cumulus neste contexto apresenta potencial e permanece a ser explorado.

5. CONCLUSÃO

As atividades dos genes RONIN e CMYC são moduladas pelo FSH, nos quais RONIN é superexpresso e CMYC é reprimido nas células do cumulus de bovinos durante a MIV.

Agradecimentos

Bolsa de doutorado fornecida pelo CNPq (LFC). Este projeto teve apoio financeiro das agências de fomento CAPES (MTM) e FACEPE (Projeto APQ-1101-5.05-15).

6. REFERÊNCIAS

Adriaens I, Cortvrindt R & Smitz J 2004 Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Human Reproduction* **19** 398–408.

Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S & Sirard MA 2008 Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biol Reprod.* **79** 209-22.

Assidi M, Richard FJ & Sirard MA 2013 FSH in vitro versus LH in vivo: similar genomic effects on the cumulus. *J Ovarian Res.* **6** 68.

Bertagnolli AC, Gonçalves PBD, Giometti IC, Costa LFS, Oliveira JFC, Gonçalves IDV, Barreto KP, Emanuelli IP & Borges LFK 2004 Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* **56** 488-496.

Blahá M, Nemcova L, Kepkova KV, Vodicka P & Prochazka R 2015 Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. *Reprod Biol Endocrinol* **6** 13:113.

Bustin SA, Benes V, Nolan T & Pfaff MW 2005 Quantitative real time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* **34** 597-601.

Chiamenti A, Aguiar Filho, CR, Freitas Neto LM, Chaves RM, Paula-Lopes F, Lima PF, Gonçalves PBD & Oliveira MAL 2010 Effects of retinoids on the in vitro development of *Capra Hircus* embryos to blastocysts in two different culture systems. *Reprod. Domest. Anim* **45** 68-72.

Colonna R, Tatone C, Francione A. et al. 1997 Protein kinase C is required for disappearance of MPF upon artificial activation in mouse eggs. *Mol. Rep. Dev.* **48** 292-299.

Conceição JC, Moura MT, Ferreira-Silva JC, Ramos-Deus P, Silva PG, Cantanhêde LF, Chaves RM, Lima PF & Oliveira MA 2015 Use of retinoids during oocyte maturation diminishes apoptosis in caprine embryos. *Acta Vet Hung.* **63** 234-42.

Dejosez M, Krumenacker JS, Zitur LJ, Passeri M, Chu LF, Songyang, Z, Thomson, JA & Zwaka TP 2008 Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells.. *Cell* **27** 1162-74.

Dejosez M, Levine SS, Frampton GM, Whyte WA, Stratton SA, Barton MC, Gunaratne PH, Young, RA & Zwaka TP 2010 Ronin/Hcf-1 binds to a hyperconserved enhancer element and regulates genes involved in the growth of embryonic stem cells. *Genes Dev.* **15** 1479-84.

Duggavathi R, Volle Dh, Matakai C, Antal Mc, Messaddeq N, Auwerx J, Murphy BD & Schoonjans K 2008 Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes Dev.* **15**, 1871-6.

Eilers M & Eisenman RN 2014 Myc's broad reach. *Genes Dev.* **15** 2755-66.

Federation AJ, Bradner JE & Meissner A 2014 The use of small molecules in somatic-cell reprogramming. *Trends Cell Biol.* **3** 179-87.

Fidalgo M, Faiola F, Pereira CF, Ding, J, Saunders A, Gingold J, Schaniel C, Lemischka IR, Silva JC & Wang, J 2012 Zfp281 mediates Nanog autorepression through recruitment of the NuRD complex and inhibits somatic cell reprogramming. *Proc Natl Acad Sci* **109**, 16202-7.

Fidalgo M, Huang, X, Guallar D, Sanchez-Priego C, Valdes VJ, Saunders A, Ding, J, Wu WS, Clavel C & Wang, J 2016 Zfp281 Coordinates Opposing Functions of Tet1 and Tet2 in Pluripotent States. *Cell Stem Cell*. **19** 355-69.

Gachon C, Mingam A & Charrier B. 2004 Real time PCR: What relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany* **55** 1445-1454.

Galan-Caridad JM, Harel S, Arenzana TL, Hou ZE, Doetsch FK, Mirny LA & Reizis B 2007 Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. *Cell* **2** 345-57.

Gilchrist RB, Ritter LJ & Armstrong, DT 2004 Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*. **82/83** 431–46.

Gonzalez-Muñoz E, Arboleda-Estudillo Y, Otu HH & Cibelli JB 2014 Cell reprogramming. Histone chaperone ASF1A is required for maintenance of pluripotency and cellular reprogramming. *Science* **345(6198)** 822-5.

Gottardi FP & Mingoti GZ 2009 Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte **33** 82-94.

Hahn S, Jackstadt R, Siemens H, Hüntten S, Hermeking H 2013 Snail and miR-34a feed-forward regulation of ZNF281/ZBP99 promotes epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J*. **23** 3079-95.

Hahn S & Hermeking H 2014 ZNF281/ZBP-99: a new player in epithelial-mesenchymal transition, stemness, and cancer. *J Mol Med (Berl)* **92** 571-81.

Harel S, Tu EY, Weisberg S, Esquelin M, Chambers SM, Liu B, Carson CT, Studer L, Rezis B & Tomishima MJ 2012 ZFX controls the self-renewal of human embryonic stem cells. *PLoS One* **7**.

Heng JCD et al. 2010 Transcription actors for the Modulation of Pluripotency and Reprogramming. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantative Biology* **75** 237-244.

Hu G, Kim J, Xu Q, Leng, Y, Orkin SH & Elledge SJ 2009 A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. *Genes Dev* **1** 837-48.

Koch Hb, Zhang R, Verdoodt B, Bailey A, Zhang Cd, Yates Jr 3rd, Menssen A, Hermeking H. 2007 Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell Cycle.* **6** 205-17.

Li SH, Mcinnis, MG, Margolis RL, Antonarakis SE, Ross CA. 1993 Novel triplet repeat containing genes in human brain: cloning, expression, and length polymorphisms. *Genomics.* **3** 572-9.

Liu Q, Nguyen E, Døskeland S, Ségal-Bendirdjian É 2015cAMP-Dependent Protein Kinase A (PKA)-Mediated c-Myc Degradation Is Dependent on the Relative Proportion of PKA-I and PKA-II Isozymes. *Molecular Pharmacology* **88** 469-476.

Luoh SW, Bain PA, Polakiewicz RD, Goodheart ML, Gardner H, Jaenisch R, Page DC. 1997 Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development.* **124** 2275-84.

Madeja Z E, Sosnowski J, Hryniewicz K, Warzych E, Pawlak P, Rozwadowska N, Plusa B, Lechniak D. 2013 Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development. *BMC Developmental Biology*, **13** 32.

Mao J, Smith Mf, Rucker Eb, Wu Gm, Mccauley Tc, Cantley Tc, et al. 2004 Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. *J Anim Sci.* 82, 1967–75.

Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia JRJE, Silva JRV, Celestino JJH. et al. 2007 Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*, 15 173–82.

Mello RRC, Ferreira JE, Sousa SLG, Mello MRB, Palhano HB. 2016 Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim* 40 58-64.

Miles JR, Mcdaneld TG, Wiedmann RT, Cushman RA, Echterkamp SE, Vallet J. L, Smith TP. 2012 MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes: possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* 130 16-26.

Moura Mt Sousa, R. V, Leme L O, Rumpf R. 2008 Analysis of actinomycin D treated cattle oocytes and their use for somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* (Print): 109 40-49.

Moura MT. Ramos-Deus P, Ferreira-Silva JC, Silva PGC, Cantanhede LF, Nascimento OS, Silva RLO, Benko-Iseppon AM. Oliveira MAL. . 2017 Expression of RONIN and NANOG-associated proteins in goat parthenogenetic embryos. *Medicina Veterinaria.* 11 145.

Mondadori R.G.; Santin, T.R.; Fidelis, A.A.G.; Name, K.P.O.; Silva, J.S.; Rumpf, R.; Bão, S.N. 2010 Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) *Zygote.* 18 309–314.

Moor R, Dai Y. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Reprod Suppl.* v,58, p.91–104, 2001.

O'Connor T, Wilmut, I, Taylor, J. 2013 Quantitative evaluation of reference genes for real-time PCR during in vitro maturation of ovine oocytes. *Reprod Domest Anim*;48:477-83.

Paulini, F, Melo EO. 2011 The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 46:354–61.

Pandey N, Mittal U, Srivastava A.K, Mukerji M. 2004 SMARCA2 and THAP11: potential candidates for polyglutamine disorders as evidenced from polymorphism and protein-folding simulation studies. *J Hum Genet.* 49:596-602.

Peippo, J.; Farazmand, A.; Kurkilahti, M.; Markkula, M.; Basrur, P. K.; King, W. A. 2002 Sex-chromosome linked gene expression in in-vitro produced bovine embryos. *Molecular Human Reproduction*, 8:923-929.

Pipelers, P.; Clement, L.; Vynck, M.; Hellemans, J.; Vandesompele, J.; Thas, O. A unified censored normal regression model for qPCR differential gene expression analysis. *PLoS One.* v.12(8) doi: 10.1371/journal.pone.0182832.,

Poché, R.A.; Zhang, M.; Rueda, E.M.; Tong, X.; McElwee, M.L.; Wong, L.; Hsu, C.W.; DeJozes, M.; Burns, A.R.; Fox, D.A.; Martin, J.F.; Zwaka, T.P.; Dickinson, M.E. 2016 RONIN Is an Essential Transcriptional Regulator of Genes Required for Mitochondrial Function in the Developing Retina. *Cell Rep* 23:1684-1697 .

Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, Mccuine S, Burge CB, Sharp PA, Young, R.A. 2010 c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell.* 141:432-45.

Regassa, A.; Rings, F.; Hoelker, M.; Cinar, U.; Tholen, E.; Looft, C.; Schellander, K.; Tesfaye D. 2011 Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. *BMC Genomics* 12:57.

- Richards, J.S.** 2005 Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol.* 29 75-9.
- Roldán-Olarte, M.; Maillo, V.; Sánchez-Calabuig, M.J.; Beltrán-Breña, P.; Rizos, D.; Gutiérrez-Adán, A.** 2017 Effect of urokinase type plasminogen activator on in vitro bovine oocyte maturation. *Reproduction* 154 231-240.
- Saraiva, M.V.A.; Celestino, J.J.H.; Chaves, R.N.; Martins, F.S.; Bruno, J.B.; Lima-Verde, I.B.** et al. 2008 Influence of different concentrations of LH and FSH on in vitro caprine primordial ovarian follicle development. *Small Rumin Res.* 78:87 95.
- Seifert, B.A.; Dejosez, M.; Zwaka, T.P.** 2017 Ronin influences the DNA damage response in pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 23 98-104.
- Schoenfelder, M.; Einspanier, R.** 2003 Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol Reprod.* 69 269-77.
- Stephenson, R.O. Et Al.** 2012 Intercellular interactions, position, and polarity in establishing blastocyst cell lineages and embryonic axes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4 1-15.
- Taylor, S.; Wakem, M.; Dijkman, G.; Alsarraj, M.; Nguyen, M.** 2010 A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50 S1-5.
- Theunissen, T.W.; Jaenisch, R.** Molecular control of induced pluripotency. 2014 *Cell Stem Cell.* 6 720-34.
- Thomas, F.H.; Ethier, J.F.; Shimasaki, S.; Vanderhyden, B.C.** 2005 Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology* 146 941-9.

Thompson, E.B.; Medh, R.D.; Zhou, F.; Ayala-Torres, S.; Ansari, N.; Zhang, W.; Johnson, B.H. 1999 Glucocorticoids, oxysterols, and cAMP with glucocorticoids each cause apoptosis of CEM cells and suppress *c-myc* J Steroid Biochem Mol Biol. 69 453-61.

Van Den Hurk, R.; Zhao, J. 2005 Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63 1717–51.

Van Tol, H.T.A.; Van Eijk, M.J.T.; Mummery, C.L.; Van Den Hurk, C.L.; Bevers, M.M. 1996 Influence of FSH and hCG on the Resumption of Meiosis of Bovine Oocytes Surrounded by Cumulus Cells Connected to Membrana Granulosa. *Molecular reproduction and development* 45 2 18-224.

Wang, J.; Rao, S.; Chu, J.; Shen, X.; Levasseur, D.N.; Theunissen, T.W.; Orkin, S.H. 2006 A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 16 364-8.

Wang, Y.K.; Li, X.; Song, Z.Q.; Yang, C.X. 2017 Methods of RNA preparation affect mRNA abundance quantification of reference genes in pig maturing oocytes. *Reprod Domest Anim.* 52 722-730.

Younis, A.I.; Brackett, B.G. 1992 Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation in vitro. *Mol Reprod Dev* 2 44-51.

Zhang, M.; Ouyang, H.; Xia, G. 2009 The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Reprod.* 15 399-409.

Zhou, H.; Morales, M.G.; Hashimoto, H.; Dickson, M.E.; Song, K.; Ye, W.; Kim, M.S.; Niederstrasser, H.; Zhou, H.; Morales, M.G.; Hashimoto, H.; Dickson, M.E.; Song, K.; Ye, W.; Kim, M.S.; Niederstrasser, H.; Wang, Z.; Chen, B.; Posner, B.A.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. 2017 ZNF281 enhances cardiac reprogramming by modulating cardiac and inflammatory gene expression. *Genes Dev* 17 1770-178.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O FSH é um dos principais componentes utilizados nos protocolos de produção *in vitro* de embriões em várias espécies. Sua atividade abrange diferentes vias que são fundamentais para expansão do cumulus, além da maturação e competência ovocitária.

Apesar da validação de funções fisiológicas já bem conhecidas, como a síntese de estradiol, foi observada a influência desse hormônio no meio utilizado para maturação com o complexo cumulus-ovócito. A presença do FSH auxiliou as células durante as modificações que acontecem durante a maturação, principalmente no consumo de substâncias ligadas ao metabolismo energético, como por exemplo, o consumo de glicogênio presente no meio de MIV.

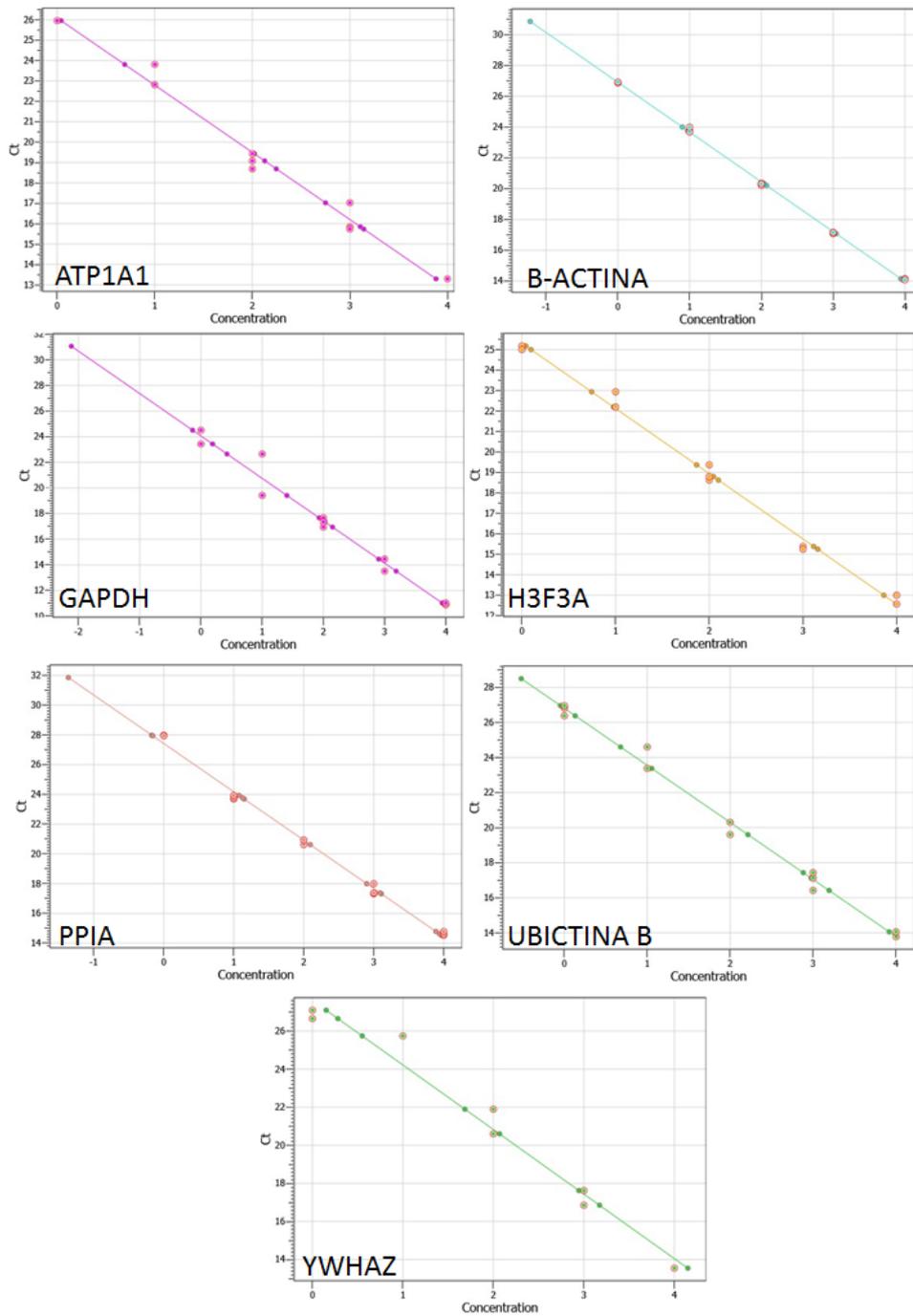
O FSH também atua em nível molecular, ao influenciar a expressão de importantes genes relacionados à pluripotência, como RONIN e CMYC. Protocolos específicos para pesquisas de vias relacionadas ao consumo energético e a modulação de genes pelo FSH são necessários para elucidar a atuação desse hormônio em nível celular e molecular tanto nas células do cumulus como no ovócito, e desta forma, contribuir para a melhoria da produção *in vitro* de embriões e também em outras áreas como a reprogramação celular.

7. APOIO FINANCEIRO

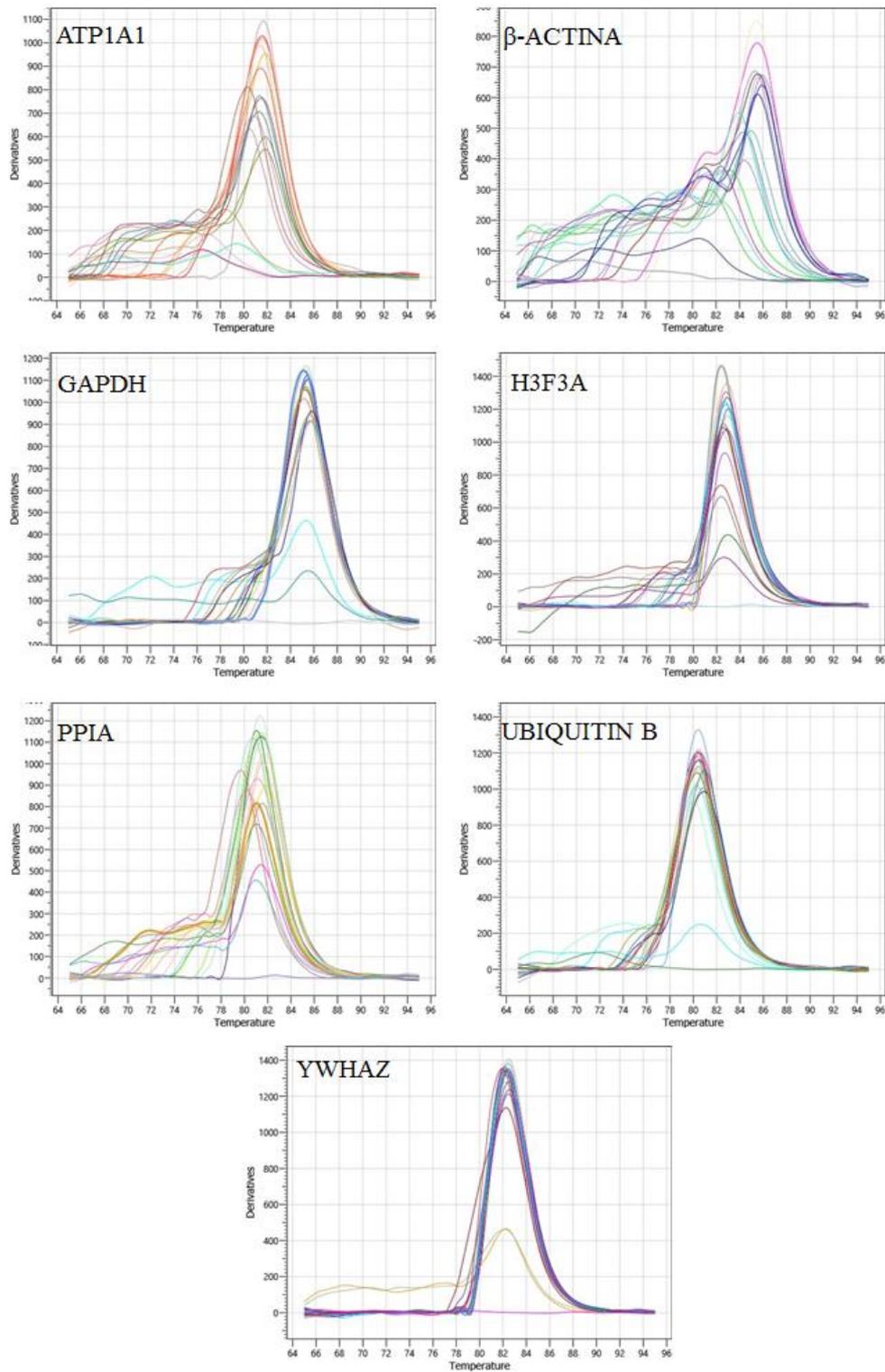
Bolsa de doutorado fornecida pelo CNPq.

Este projeto teve como apoio financeiro a CAPES, FACEPE e PRPPG.

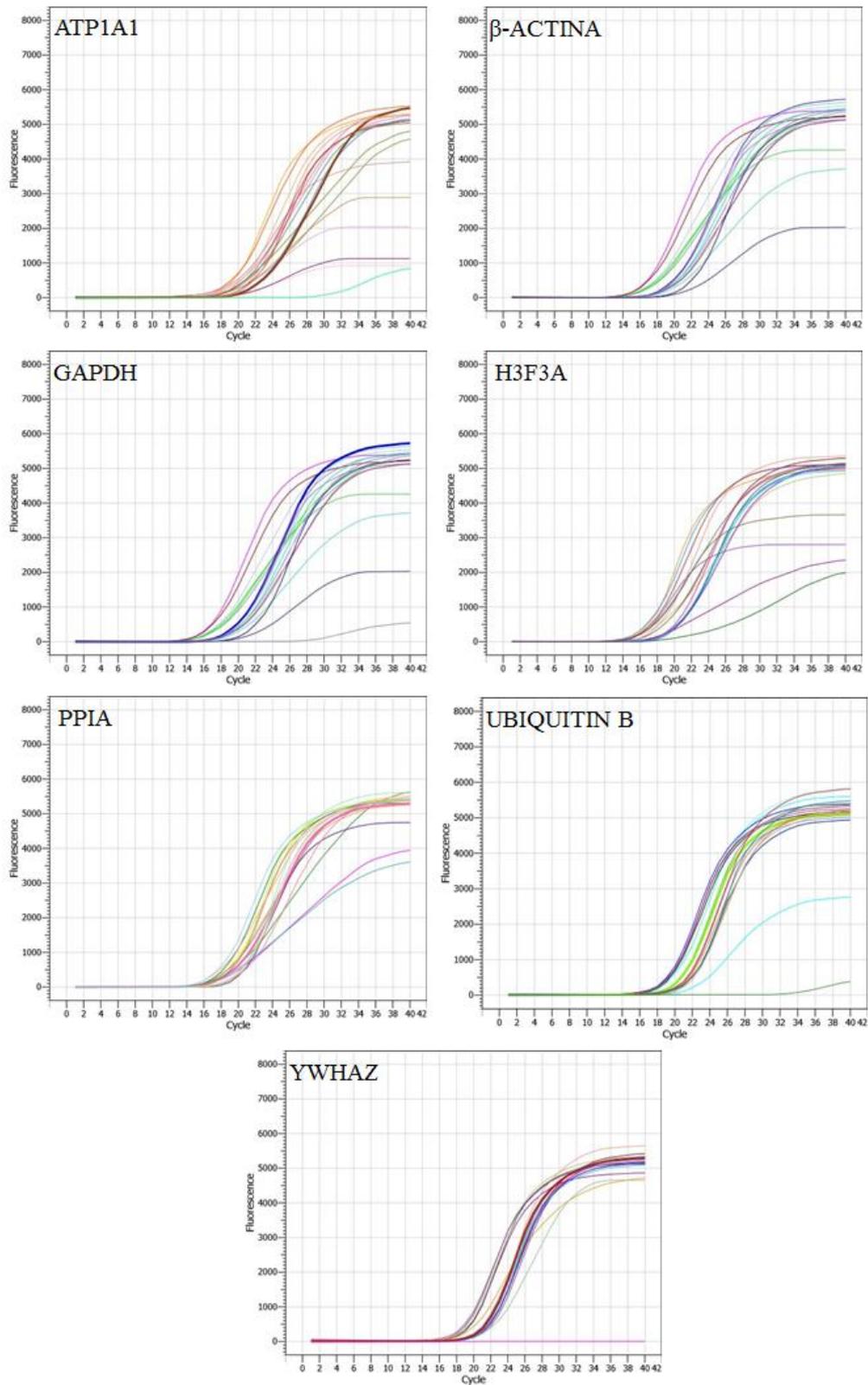
8. APÊNDICE



Apêndice 1: Eficiência dos sete genes referência em células do cumulus de bovinos.



Apêndice 2: Valores de melting durante eficiência dos sete genes referência em células do cumulus de bovinos.



Apêndice 3: Curvas de amplificação durante estabilidade dos sete genes referência em células do cumulus de bovinos.