

FLÁVIA ALINE SILVEIRA ALVIM MENDES DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO GÊNICA EM OVÓCITOS SUÍNOS DE DIFERENTES
CLASSIFICAÇÕES MORFOLÓGICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48e
2012

Oliveira, Flávia Aline Silveira Alvim Mendes de, 1986-
Expressão gênica em ovócitos suínos de diferentes
classificações morfológicas / Flávia Aline Silveira Alvim
Mendes de Oliveira. – Viçosa, MG, 2012.
viii, 37 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: José Domingos Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 28-37.

1. Suíno - Reprodução. 2. Ovócitos. 3. Suíno - Morfologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Veterinária.
II. Título.

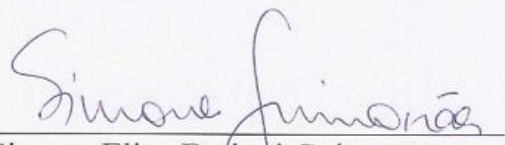
CDD 22. ed. 636.2082

FLÁVIA ALINE SILVEIRA ALVIM MENDES DE OLIVEIRA

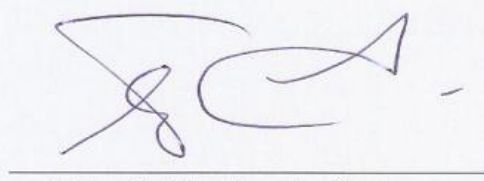
**EXPRESSÃO GÊNICA EM OVÓCITOS SUÍNOS DE DIFERENTES
CLASSIFICAÇÕES MORFOLÓGICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

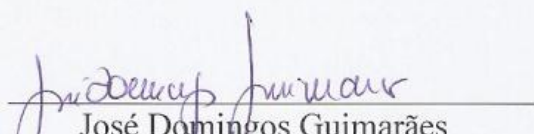
APROVADA: 20 de dezembro de 2012



Simone Eliza Facioni Guimarães



Eduardo Paulino da Costa
(Coorientador)



José Domingos Guimarães
(Orientador)

*Aos meus pais, José Carlos Mendes
de Oliveira e Maria das Graças
Consuelo S. A. de Oliveira*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus amados pais, José Carlos e Consuelo e ao meu irmão Carlos Thiago pelo incentivo, apoio e acompanhamento de mais essa etapa da minha vida, eles que sempre torcem por mim e acreditam no meu sucesso. Ofereço a vocês mais essa conquista.

A todos meus familiares pela torcida.

Ao professor JD pela amizade, paciência, orientação e a oportunidade de realização do mestrado.

A professora Simone, por ter concedido todos os meios para realização desse trabalho.

Aos professores Eduardo Paulino da Costa, Ciro Alexandre Torres, Giovanni Ribeiro de Carvalho, pelos ensinamentos na área de reprodução animal.

Ao professor Fabyano Fonseca, pelo grande auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos pós-doutorandos Lincoln Amorim e Débora Paixão, pela ajuda direta e incondicional, para realização das etapas relacionadas á expressão gênica.

A toda equipe do GERA, pelos momentos agradáveis vividos durante a realização desse trabalho.

A equipe do LABTEC, por todo auxílio concedido durante a realização desse trabalho.

A todos os funcionários e estagiários da Granja de Melhoramento Suínos da UFV, em especial, ao Sr José Geraldo que não mediu esforços durante a realização do experimento.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária, por toda ajuda cedida e pelos momentos de descontração.

A Damares pela amizade, companheirismo, pelo auxílio incondicional durante as atividades experimentais. Por todos os momentos em que esteve presente.

Aos meus amigos Carla e Paulo, pela amizade e companheirismo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 CICLO ESTRAL EM SUÍNOS	3
2.2. OVOGÊNESE.....	4
2.3. FOLICULOGÊNESE	5
2.4. MATURAÇÃO	8
2.5 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIV)	9
2.5.1 SELEÇÃO OVOCITÁRIA.....	9
2.5.1.1. PARÂMETROS UTILIZADOS COMO INDICADORES DA COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA.....	9
2.5.2. GENES ASSOCIADOS Á COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	13
3.2. RECUPERAÇÃO DOS OVÓCITOS E SELEÇÃO	13
3.3. SELEÇÃO DOS GENES	15
3.4. DESENHO DOS PRIMERS	15
3.5. EXTRAÇÃO DE RNA PREPARAÇÃO DO CDNA.....	16
3.6. CÁLCULO DE EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO.....	16
3.7. REAÇÃO DE RT-QPCR EM TEMPO REAL	17
4. ANÁLISES ESTASTÍSTICAS	17
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSSÃO	20
7. CONCLUSÕES.....	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quantidade relativa de mRNA da BMP15 (Média±EPM) nos contrastes entre as classes ovocitárias.....	21
Figura 2 - Quantidade relativa de mRNA do gene MATER (Média ± EPM) nos contrastes entre as classes ovocitárias.....	23
Figura 3 - Quantidade relativa de mRNA do gene ZAR1 (Média±EPM) nos contrastes entre as classes ovocitárias.....	25
Figura 4 - Quantidade relativa de mRNA do gene RYBP (Média±EPM) nos contrastes entre as classes ovocitárias.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação Morfológica dos CCOs e do citoplasma.....	14
Tabela 2 - Sequência de nucleotídeos (5'- 3'), número de acesso no GenBank e espécie.....	15
Tabela 3 - Concentração de primer, cDNA e eficiência da reação (E) para os genes analisados.....	18
Tabela 4 - Expressão relativa do gene MATER com seus respectivos desvio-padrão.....	18
Tabela 5 - Expressão relativa do gene ZAR1 com seus respectivos desvio-padrão.....	19
Tabela 6 - Expressão relativa do gene RYBP com seus respectivos desvio-padrão.....	19
Tabela 7 - Expressão relativa do gene BMP15 com seus respectivos desvio-padrão.....	20

RESUMO

OLIVEIRA, Flávia Aline Silveira Alvim Mendes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2012. **Expressão gênica em ovócitos suínos de diferentes classificações morfológicas.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientador: Eduardo Paulino da Costa.

A produção *in vitro* de embriões suínos ainda tem tido resultados insatisfatórios devido a baixa de produção de blastocisto, a porcentagem de embriões produzidos de ovócitos maturados *in vitro* é inferior àqueles maturados *in vivo*. Diversos fatores interferem no sucesso da maturação, entretanto, a competência ovocitária é um dos fatores mais importantes. Somente ovócitos competentes são capazes de sofrer a fecundação e ter desenvolvimento embrionário normal. A competência ovocitária pode ser avaliada a partir de vários parâmetros, tais como morfologia do ovócito, tamanho do folículo, coloração com *brilliant cresyl blue* (BCB), momento da clivagem e idade da doadora. Nos últimos anos esses parâmetros têm sido utilizados para os estudos da expressão dos genes associados com a competência. Este trabalho teve por objetivo avaliar diferenças na expressão dos genes BMP15, RYBP, MATER, ZAR1 e como controle endógeno o gene constitutivo GAPDH em ovócitos imaturos de diferentes classes morfológicas sendo elas: 1, 2, 3 e 4. Como finalidade elucidar os mecanismos necessários para que o ovócito adquira competência e proporcionar importantes marcadores moleculares relacionados com a capacidade de desenvolvimento. O RNA total ovócitos foi extraído e utilizado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA. Os resultados da expressão gênica foram analisados utilizando um modelo misto, considerando os dados de expressão gênica variável dependente e as classes ovocitárias variáveis independentes. Os genes BMP15, ZAR1 e RYBP apresentaram expressão semelhante nas classes ovocitárias 1, 2 e 3, somente a categoria 4 diferiu na expressão desses genes ($P < 0,05$). O gene MATER foi expresso de forma semelhante em todas as classes ovocitárias estudadas ($P > 0,05$). A técnica de qPCR, no presente trabalho, foi eficiente para detecção destes transcritos em ovócitos de diferentes classes. No entanto, para melhor entendimento do envolvimento desses transcritos na aquisição da competência ovocitária são necessários mais estudos avaliando ovócitos de diferentes classes morfológicas, em diferentes fases de desenvolvimento e implicação de outros genes envolvidos com a competência ovocitária.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Flávia Aline Silveira Alvim Mendes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2012. **Gene expression in porcine oocytes of different morphological classifications.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-adviser: Eduardo Paulino da Costa.

In vitro production of pig embryos has yet taken unsatisfactory results due to low production blastocyst, the percentage of embryos produced from oocytes matured in vitro is lower than those matured in vivo. Several factors affect the success of maturation, however, the oocyte competence is one of the most important factors. Only competent oocytes are able to undergo fertilization and have normal embryonic development. The oocyte competence can be evaluated from various parameters such as morphology of the oocyte, follicle size, stained with cresyl brilliant blue (BCB), the time of cleavage and age of the donor. In recent years these parameters have been used for studies of gene expression associated with the task. This study aimed to evaluate differences in gene expression BMP15, RYBP, MATER, ZAR1 and using the constitutive gene GAPDH as endogenous control in immature oocytes of different morphological classes which are: 1, 2, 3 and 4 to elucidate the mechanisms required for oocyte acquires competence and provide important molecular markers linked to the development capability. Oocytes total RNA was extracted and used as a template for synthesis of cDNA first tape. The results of gene expression were analyzed using a mixed model, considering the gene expression data dependent and independent variables oocyte classes. Genes BMP15, RYBP ZAR1 and showed similar expression oocyte in categories 1, 2 and 3, only 4 categories differ in their expression ($P < 0.05$). The MATER gene was expressed similarly in all categories oocyte studied ($P > 0.05$). The qPCR technique, in this work, was efficient to detect these transcripts in oocytes of different categories. However, to better understand the involvement of these transcripts in the acquisition of oocyte competence are needed most studies evaluating different morphological classes of oocytes at different stages of development and implication of other genes involved in oocyte competence.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica de reprodução assistida que permite explorar cada vez mais o potencial reprodutivo das fêmeas, sendo utilizada como opção para acelerar a produção de animais geneticamente superiores. Em suínos, considerando as semelhanças biológicas que partilha com os seres humanos, essa biotecnologia também pode ser usada como fonte adequada de células e órgãos para xenotransplantes, bem como um animal transgênico para produzir proteínas específicas (Lunney, 2007).

Porém, o uso desta técnica ainda é limitado, devido baixa proporção de blastocistos viáveis (Hao et al., 2003; Yoshioka et al., 2012). A maioria das mortes pré-implantação de embriões ainda não está bem elucidada (Warner et al., 1998). Entretanto, há evidências indicando que a qualidade intrínseca do ovócito é o principal fator que determina se um embrião terá habilidade de se desenvolver adequadamente (Wang e Sun, 2007).

A qualidade do ovócito está ligada aos processos de maturação nuclear e maturação citoplasmática. A maturação nuclear envolve 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). Esta é progressivamente adquirida durante as fases finais da foliculogênese que ocorre logo após o pico de LH *in vivo*, e *in vitro* acontece espontaneamente quando os ovócitos são removidos dos folículos (Hyttel et al., 1997; Lonergan et al., 2003). A maturação citoplasmática envolve síntese de proteínas (Sirard et al., 1998), redistribuição das organelas intracelulares (Stojkovic et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (Wang et al., 2003).

Atualmente, a seleção de ovócitos de melhor qualidade para utilização na PIV baseia-se nos critérios morfológicos (Stojkovic et al., 2001). No entanto, as tentativas para caracterizar atributos morfológicos associados com a qualidade do ovócito alcançaram sucesso limitado. Na tentativa de realizar uma seleção mais precisa e que realmente reflita a competência dos ovócitos utilizados tem sido pesquisados outros métodos tais como, tamanho do folículo, coloração com azul cresil brilhante (ACB), momento da clivagem e idade da doadora, juntamente com a avaliação morfológica (Hyttel et al., 1997; Wu et al., 2007).

Estudos recentes têm sugerido que as análises celulares e moleculares de ovócitos podem fornecer índices mais precisos para a definição de critérios mais objetivos de sua qualidade. A maioria dessas abordagens não pode ser diretamente aplicada para a seleção dos ovócitos, porque a sua aplicação não preserva a viabilidade celular, mas tem o potencial para estabelecer padrões celulares para a obtenção de ovócitos competentes *in vitro* ou *in vivo* promovendo uma seleção mais rigorosa, melhorando os resultados de produção e qualidade dos embriões obtidos por técnicas de reprodução assistida (Coticchio et al., 2004).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo identificar genes que estão envolvidos com a competência ovocitária, tais como o BMP15 (Zhu et al., 2008), o RYBP (Dode et al., 2006), MATER e ZAR1 em ovócitos de diferentes graus de qualidade, classificados pela morfologia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICLO ESTRAL EM SUÍNOS

As fêmeas da espécie suína são multíparas, apresentam ciclos estrais durante todo o ano, quando não estão em gestação ou lactação, sendo então caracterizadas como poliéstrica contínua. O ciclo estral dura em média 21 dias, podendo variar de 18-24 dias, pode ser dividido em duas grandes fases sendo elas: fase estrogênica ou folicular que é subdividida em pró-estro e estro; e a fase progesterônica ou luteal que é subdividida em metaestro e diestro (Albuquerque *et al.*, 2004).

A fase folicular tem duração de 4 a 5 dias e luteal de 15 a 17 dias. Durante o proestro (D16 a D 21 do ciclo estral), ocorre a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, pelo endométrio, que provocará a luteólise e conseqüentemente redução dos níveis de progesterona. O rápido aumento de estrógeno, produzido pelos folículos pré-ovulatórios, estimulará (retroalimentação positiva) a liberação pulsátil do hormônio hipotalâmico (GnRH) / hipofisário (FSH, LH) , além de estimular os órgãos reprodutivos a se prepararem para a fase de estro. Na fase inicial do proestro ocorre hipotrofia das glândulas uterinas seguida pelo aumento da vascularização da mucosa (turgidez do útero). A cérvix apresenta um relaxamento gradual, ocorre maior vascularização do epitélio vulvar provocando edema e hiperemia vulvar. Durante essa fase, também ocorrem alterações comportamentais, as fêmeas tentam saltar sobre as outras fêmeas, mas não permitindo que sejam montadas (Anderson, 2004). O estro corresponde ao intervalo da primeira aceitação até a última aceitação de monta, e dura em média 50-60 horas. Essa fase é caracterizada pela receptividade da fêmea, e apresentam reflexo de tolerância ao homem (RTH). Esse reflexo é conseqüência da elevada concentração plasmática de estrógeno, sintetizado pelo folículo pré-ovulatório, no início do estro (pico pré-ovulatório de estradiol) acarretando rápida elevação da liberação de LH (pico ovulatório de GnRH/LH), o qual desencadeará uma série de alterações nos folículos ovulatórios culminando com a maturação dos ovócitos e ovulações, que irão ocorrer de 38 a 42 horas após o início do estro (Hafez *et al.*, 2004). Morfologicamente, a fase do estro é correspondente ao ápice dos efeitos dos estrógenos sobre os órgãos genitais: as tubas uterinas estão contráteis, apresentando epitélio desenvolvido, cílios ativos, fímbrias distendidas em direção ao folículo e

com aumento da secreção. O útero apresenta-se contrátil, erétil, túrgido, edemaciado, com aumento no fluxo de sanguíneo, proliferação rápida da mucosa e secreção de muco. A cérvix está relaxada com secreção de muco, a vagina apresenta-se congesta de coloração rósea, a vulva apresenta-se relaxada e edemaciada.

A fase luteal é dividida em metaestro e diestro. O metaestro inicia-se quando a fêmea não mais aceita a monta, fase pós-ovulatória, e início do desenvolvimento do corpo lúteo (CL). As células da granulosa e teca iniciam um processo rápido de diferenciação acompanhado por infiltração de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo, e passam a ser denominadas, respectivamente, células luteais grandes e pequenas. Estas passarão a sintetizar progesterona, hormônio este responsável pela manutenção da gestação, caso ocorra fertilização (Hunter *et al.*, 2004).

No início do diestro há continuação do desenvolvimento do CL, que atinge o máximo de seu crescimento, aproximadamente no sexto dia do ciclo estral, e produção de progesterona. A progesterona por sua vez, bloqueia a liberação pulsátil de LH. Devido à ação da progesterona, o útero apresenta musculatura relaxada e o endométrio espessado com glândulas hipertrofiadas. A cérvix permanece fechada e produz um muco espesso e viscoso, e a vagina apresenta mucosa pálida, seca e pegajosa. No final do diestro, ocorre liberação $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo útero, que determinará o início do processo de luteólise (Albuquerque *et al.*, 2004).

2.2. OVOGÊNESE

Ovogênese é definida como um conjunto de processos regulados por fatores intra e extra-ovarianos no qual células germinativas primordiais (CGP) se desenvolvem e diferenciam-se até a formação do ovócito haplóide (Russe, 1983). As CGP são formadas durante o período embrionário a partir do saco vitelínico e se caracterizam por serem móveis e altamente invasivas (Hirshfield, 1991). Sinais provenientes da endoderme e ectoderme embrionária, tais como as proteínas morfogenéticas óssea (BMPs) são necessários para a formação e regulação da expressão dos genes das CGPs.

Durante o período fetal as CGPs migram para o mesênquima e colonizam a gônada ainda indiferenciada, onde perdem sua característica móvel, tornam mais esféricas e multiplicam-se por mitose (Van de Hurk e Zhaob, 2005). No ovário, após sucessivas divisões mitóticas e reorganização citoplasmática as CGPs diferenciam-se em ovogônias ligadas entre si por meio de pontes intercelulares citoplasmáticas

formando “ninhos de células germinativas” (Pepling, 2006). A diferenciação das CGPs em ovogônias em suínos ocorre entre os dias 33° e 60° de gestação (McCoard *et al.*, 2001).

As ovogônias crescem, duplicam seus cromossomos dando origem aos ovócitos primários, que entrarão na primeira divisão meiótica. Os ovócitos formados iniciam a primeira divisão meiótica, a fase da prófase, que se divide em cinco etapas: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. Dentro do primeiro período de prófase, ocorre uma série de eventos cruciais envolvendo o emparelhamento de cromossomos homólogos, sinapse e de recombinação "crossing over". Posteriormente, os ovócitos avançam para a fase diplóteno e é nesta fase que ocorre a primeira interrupção da meiose (Hunt e Hassold, 2008).

Os ovócitos cujos núcleos encontram-se em prófase I são denominados ovócitos primários ou imaturos (Figueiredo *et al.*, 2002) e permanecerão nessa fase até a puberdade onde picos do hormônio luteinizante (LH), algumas horas antes da ovulação, induzem a retomada da meiose.

2.3. FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese é definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular tendo início com o folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maduro ou folículo pré-ovulatório. Ocorre simultaneamente à ovogênese, quando o ovócito está entre as fases de prófase I e metáfase II (Saumande, 1991).

Os folículos podem ser divididos em pré-antrais e antrais (Hulshof *et al.*, 1994). Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular do ovário e são constituídos pelos folículos primordiais, primários e secundários (Van den Hurk *et al.*, 1997). Os folículos antrais podem ser classificados como folículos terciários e folículos pré-ovulatórios. Na fase pré-natal, alguns folículos podem ser ativados e se desenvolverem até o estágio terciário, no entanto, somente após a puberdade, sob estímulo hormonal, podem atingir o estágio pré-ovulatório (Fortune, 2003).

A formação do folículo primordial é caracterizada pela desagregação dos “ninhos de células germinativas” formando uma camada de células somáticas, planas ou achatadas, conhecidas como células da pré-granulosa, que circundam o ovócito primário (prófase I), dando origem ao primeiro e mais primitivo dos estágios

foliculares (Ross *et al.*, 1995). Os esteroides, as proteínas FOXL2, NOBOX e os genes GDF9 e BMP15, parecem estar envolvidos nesse processo, considerando que a falta de expressão desses genes ou expressão e função reduzida podem ocasionar falhas na formação do folículo primordial (Bristol- Gould *et al.*, 2005).

Ovócitos que não são circundados pelas células somáticas entram em apoptose (Pepling, 2006). Após a formação dos folículos primordiais as células da pré-granulosa param de se multiplicar e permanecem em um período de quiescência, e constituem o reservatório de células germinativas disponíveis durante todo o período de vida reprodutiva feminina (Hirshfield, 1991).

Apesar de uma grande quantidade de folículos primordiais estarem presentes no ovário, a maioria deles sofrerão processo degenerativo conhecido por atresia e outros serão ativados e recrutados em grupos dando origem aos folículos primários (Fortune, 2003). Essa fase é caracterizada pela mudança na forma das células da granulosa de plana para cúbica, proliferação destas células e o surgimento de outra linhagem de células somáticas, a teca, exterior às células da granulosa. Outro evento marcante é a formação da zona pelúcida, uma camada de proteínas que circunda o ovócito e mantida por todo desenvolvimento folicular até a fase de eclosão embrionária (Seneda e Bordingon, 2007). A expressão dos fatores de transcrição *Sohlh1* e *Nobox* é essencial para a progressão de folículos primordiais para fase de folículo primário (Rajkovic *et al.*, 2004) falha na expressão desses genes leva a uma deficiência na regulação dos transcritos envolvidos em diferentes estágios de desenvolvimento ovocitário e folicular sendo eles: *Mos*, *Oct4*, *Rflp4*, *Fgf8*, *Zar1*, *Mater*, *Dnmt1o*, *Gdf9*, *Bmp15* e *H1oo*.

Os folículos secundários são caracterizados por uma ou mais camadas de células da granulosa ao redor do ovócito. Nessa fase o tamanho do ovócito aumenta, a zona pelúcida já pode ser observada e nos mais desenvolvidos é possível observar células tecais. Com o aumento do metabolismo do ovócito, há um acréscimo no número de junções do tipo Gap entre ovócito e células da granulosa, que atuam na comunicação bidirecional, na transferência de nutrientes, metabólitos, fatores de estimulação ou inibição da meiose, além de fatores de crescimento, neurotropinas e hormônios. As proteínas de junção Gap também conhecidas como conexinas 37 e 43 (*Cx37* e *Cx43*, respectivamente) desempenham um papel importante na manutenção da sua comunicação e a ausência de *Cx43* leva a interrupção do desenvolvimento folicular na fase primária, e ovócitos que não possuem a expressão de *Cx37* têm uma

retomada meiótica deficiente e não são capazes de serem fertilizados (Gittens e Kidder, 2005).

Ocorre também aumento da vascularização do folículo, possibilitando a atuação de sinais endócrinos. O ovócito, então, já se torna sensível a gonadotrofinas como o FSH. As células da teca aumentam o número de receptores de LH, iniciando a síntese de andrógenos, convertidos em estrógenos pela enzima aromatase que, por sua vez, aumentam o número de receptores de FSH nas células da granulosa, amplificando a ação desta gonadotrofina.

Nos folículos terciários, as células da granulosa proliferam a uma velocidade muito elevada, dando origem a um folículo de multi-camada, pré-antral, e a organização completa das células da teca. As células da granulosa secretam o fluido folicular, que se acumula nos espaços intercelulares, a secreção contínua do fluido folicular promove a dissociação das células da granulosa, dando origem à cavidade antral (van den Hurk *et al.*, 2000).

Muitos reguladores positivos durante a transição a partir de pré-antral ao desenvolvimento antral foram identificados, sendo eles o GDF9 e BMP15 que agem em sinergia para continuar promovendo a proliferação de células da granulosa. BMP15 é conhecido por promover a mitose em células da granulosa (Otshuka *et al.*, 2002).

Após a formação do antro folicular, os folículos tornam-se responsivos as gonadotrofinas, FSH e LH, e seguem pelas fases de recrutamento, seleção e dominância. A ação de ambas gonadotrofinas no ovário é mediada por ligação e ativação dos seus receptores (receptor de LH, LHR e receptor FSH, FSHR). Com a evolução dos folículos terciários, a cavidade antral aumenta e o ovócito fica aderido à parede do folículo pelas células do cumulus oophorus, originando o folículo pré-ovulatório que corresponde a fase final do desenvolvimento folicular (Hulshof *et al.*, 1994). Nesse estágio, o ovócito já atingiu seu diâmetro final e cessa completamente a transcrição nuclear, atingindo, então, competência para concluir a divisão meiótica e, em seguida, caso ocorra a fecundação, desenvolver-se em blastocistos.

2.4. MATURAÇÃO

A maturação ovocitária *in vivo* ocorre durante o período compreendido entre o pico de LH e a ovulação, promovendo uma série de alterações nucleares e citoplasmáticas (Krisher, 2004). Durante a maturação também ocorre alterações na matriz extracelular, e a secreção de ácido hialurônico promove a expansão das células do cúmulus oophorus, processo este de grande importância tanto na ovulação como na fertilização, por bloquear a polispermia e facilitar a fusão dos prónucleos (Van de Hurk e Zhao, 2004).

A maturação nuclear se dá após o pico pré-ovulatório de LH, quando o núcleo ovocitário reinicia a segunda divisão meiótica, onde há uma rápida passagem pela fase de prófase II que avança até a fase de metáfase II, quando ocorre a segunda parada da meiose (Gordon, 1994). A divisão somente será retomada caso ocorra ativação partenogênica ou a fecundação, onde a penetração do espermatozóide causa oscilação na concentração de cálcio que acarreta em estímulos para que o ovócito prossiga pelas fases anáfase II e telófase II, seguido da extrusão do segundo corpúsculo polar e início do desenvolvimento embrionário (Moore e Persaud, 1994).

A maturação citoplasmática é caracterizada pela redistribuição das organelas com a migração das mitocôndrias para a região perinuclear e acúmulo de grânulos corticais no oolema, inibição da secreção do LH e/ou inativação de seus receptores, interrupção da comunicação bidirecional direta entre o ovócito e as células do cúmulus oophorus por meio do bloqueio das junções Gap (Heikinheimo e Gibbons, 1998). Outro evento importante da maturação citoplasmática é o silenciamento transcricional, ocorre devido ao grande acúmulo de transcritos, sintetizados durante as fases iniciais do crescimento do ovócito. Com a quebra da vesícula germinal (GV), durante retomada da meiose, a transcrição é então silenciada (Sun et al., 2003). Nessa fase ocorre a degradação de transcritos cerca de 30% do mRNA total (Paynton et al., 1988), este processo é seletivo baseado na função do gene e estágio de desenvolvimento do ovócito (Su *et al.*, 2007). Assim, tanto a degradação aberrante ou manutenção de transcritos durante a maturação pode ser prejudicial para a qualidade do ovocitária.

Após o silenciamento transcricional, os ovócitos dependem das transcrições armazenadas para continuar a meiose e iniciar as clivagens após a fecundação, até

que ocorra a transição materno zigótica (Isom et al., 2012). Assim, a síntese e o armazenamento de transcritos maternos antes de iniciar o silenciamento transcricional são essenciais para o ovócito adquirir competência para o desenvolvimento, com destaque para os genes conhecidos como de transição materno zigótica: MATER, ZAR1 e TEAD (Evsikov *et al.*, 2006; Fair *et al.*, 2007).

2.5 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIV)

A técnica de PIV é composta por etapas que vão desde a recuperação dos ovócitos até o cultivo embrionário *in vitro*. Após a recuperação dos ovócitos os processos biológicos que ocorreriam *in vivo* são realizados no laboratório e compreendem a seleção, maturação, fecundação e cultivo *in vitro*.

2.5.1 SELEÇÃO OVOCITÁRIA

A seleção ovocitária é uma das etapas que compreende a PIV seguida pela maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. A qualidade do ovócito ou sua competência para o desenvolvimento afeta a viabilidade embrionária, o crescimento fetal, e até mesmo a saúde da prole (Marchal et al., 2002). Melhorar e prever a qualidade do ovócito *in vitro* é fundamental para a aplicação bem sucedida de tecnologias de reprodução assistida e produção animal.

2.5.1.1. PARÂMETROS UTILIZADOS COMO INDICADORES DA COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA

A morfologia do complexo cumulus-oophorus (COC) tem sido um dos parâmetros mais utilizado e conhecido para selecionar ovócitos com maior competência para o desenvolvimento.

As avaliações morfológicas dos COCs são baseadas na quantidade e compactação das células do cumulus oophorus e homogeneidade de citoplasma (Lonergan et al., 2003). A maioria dos autores descrevem quatro categorias de COCs, sendo: grau 1, aquele COCs com citoplasma homogêneo e com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus oophorus; grau 2, aquele que apresenta citoplasma com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares e cumulus oophorus compacto menor do que na categoria 1, mas com pelo menos

cinco camadas completas; grau 3, compreende um ovócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, coberto com pelo menos três camadas de células do cumulus oophorus e/ou com pequenas áreas desnudas, e grau 4 ovócito com citoplasma heterogeneamente pigmentado e cumulus oophorus completamente e/ou parcialmente ausente ou expandido (Stojkovic et al., 2001).

Os COCs classificados como grau 1 são considerados os mais competentes para o desenvolvimento embrionário e os COCs grau 4, os menos competentes para a produção *in vitro* de embriões.

2.5.2. GENES ASSOCIADOS À COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA

Os ovócitos de mamíferos durante a foliculogênese e a ovogênese possuem a necessidade de acumular todos os fatores maternos necessários para os eventos pós-fecundação. A abundância desses transcritos está relacionada com a competência ovocitária (Donnison et al., 2004; Song, et al., 2005). Estudos sugerem que diferenças entre ovócitos competentes e incompetentes podem estar relacionadas a um padrão diferencial de expressão gênica (Fair et al., 2004; Dode et al., 2006; Mourot et al., 2006).

Uma abordagem que pode ser utilizada na investigação desses mecanismos é a comparação de ovócitos com diferentes graus de competência, utilizando o modelo de classificação morfológica associado com a expressão de genes que são conhecidamente associados com a competência ovocitária, tais como MATER, ZAR1 (Pennetier et al., 2004), RYBP (Dode et al., 2006) e BMP15 (Zhu et al., 2008).

Os mRNA e proteínas adquiridos pelo ovócito durante o seu crescimento e maturação final permitem que o zigoto se desenvolva em suas fases iniciais até no momento em que o embrião produza seus próprios fatores. O ponto no qual a transcrição embrionária inicia e o mRNA materno é substituído por mRNA embrionário é referido como a transição materno-zigótica (TMZ), em suínos essa transição tem início em embriões de quatro células (Whitworth et al., 2005). A TMZ é um ponto importante e limitante para o desenvolvimento embrionário, pois coincide com o bloqueio no desenvolvimento observado em embriões cultivados *in vitro* (Memili et al., 2000). O silenciamento pré-TMZ é provavelmente devido um estado de cromatina transcricional não permissiva e etapa transcricional ineficiente (Schultz et al., 1999).

Diversos fatores estão envolvidos no remodelamento da cromatina para que haja uma transcrição eficiente, dentre eles estão as histonas acetiltransferases que são proteínas onde as caudas das histonas acetilam o nucleossomo e conseqüentemente descondensa a cromatina, levando a um DNA mais acessível aos fatores de transcrição (Marmorstein, 2001).

Outro fator que pode promover a transcrição por meio da modificação de conformação da cromatina são as proteínas do grupo de alta mobilidade (HMG), uma família de proteínas cromossômicas que atuam como um elemento estrutural da cromatina, sem ser histonas. A atividade da HMG tende a produzir uma conformação cromatínica que melhora a transcrição (Bianchi et al., 2000). Portanto, para a transcrição é necessário um equilíbrio entre muitos fatores de remodelação da cromatina. Uma vez que a conformação da cromatina é adequada, permitirá a ligação de fatores de transcrição, esses fatores devem estar presentes e ativos para ligar-se ao DNA e transcrever os genes necessários.

Os fatores de transcrição e outros coativadores são proteínas que se ligam a seqüências de DNA específicas nos promotores ou potenciadores dos genes, ou se ligam a outros fatores de transcrição para recrutar a maquinaria de transcrição basal para o promotor e facilitar a transcrição. Dentre esses fatores de transcrição está o RYBP que interage diretamente *in vivo* e *in vitro* com YY1 (Sawa et al., 2002), que é bem conhecido pela sua capacidade de se ligar-se ao DNA para promover a transcrição. A expressão de YY1 em ovócitos e embriões de bovinos ocorre provavelmente durante a maturação e está envolvida na transição materno zigótica, estando estável da fase de MII a embriões de quatro células, com declínio na fase de oito células (Vigneault et al., 2004).

Os genes de efeito materno codificam fatores herdados pelo embrião e são necessários para o seu desenvolvimento adequado, dentre os diversos genes conhecidos, os MATER e ZAR1 são os de maiores destaques (Pennitier et al., 2004) predominantemente expressos em ovócitos e continuam presentes em embriões até serem degradados no momento da transição materno zigótica.

MATER é uma proteína sintetizada pelos ovócitos, durante a ovogênese, presente desde folículos primários até a ativação do genoma embrionário, após essa fase é degradada e o embrião inicia a síntese de mRNA e proteínas (Pennitier et al., 2006) sendo localizada em maior quantidade, no citoplasma, porém, identificada também no nucléolo, núcleo e mitocôndrias. A importância desta proteína foi descrita em um estudo, usando camundongos nulos para o gene MATER. Os animais

estudados apresentaram fenótipo normal, para foliculogênese, ovulação, maturação e fertilização. No entanto, os embriões não progrediram para os estágios além de duas células. Concluindo que esta proteína é essencial para o desenvolvimento embrionário inicial (Tong et al., 2000). A precisa função da proteína MATER ainda não está totalmente elucidada, contudo, sugere-se que tenha capacidade de conferir estabilidade aos transcritos originados do núcleo durante o estoque no citoplasma, até o momento em que são recrutados para a tradução no ovócito ou embrião.

O gene ZAR1 foi identificado em ovócitos imaturos de camundongos, rã, humanos, bovinos e suínos (Ubezko et al., 2006) e descrito como um regulador transcricional, atuando durante o período de ativação do genoma embrionário (Wu et al., 2003). Sintetizado durante a ovogênese, a partir de folículos primários, com grande presença de transcritos em ovócitos em estágio de vesícula germinativa e degradação abundante em embriões no estágio de oito células e desaparecimento em mórulas e blastocistos (Ariu et al., 2006). Na ausência na expressão desses genes, a fêmea torna-se infértil (Li et al., 2010).

A superfamília TGF- β reúne mais de 35 membros envolvidos na regulação de vários processos fisiológicos em mamíferos, esta superfamília inclui diferentes famílias de fatores de crescimento, como proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), fatores de crescimento e diferenciação (IGF), activina / inibina e o hormônio anti-mülleriano. Também inclui tipo I e tipo II de receptores que atuam por meio de Smad para modular a sinalização na expressão de genes alvo (McLaughlin e McLver, 2009). Foram descritas doze diferentes tipos de BMPs e oito GDFs expressos por ovócitos, onde atuam como reguladores intraovarianos na ativação do folículo primordial, proliferação de células somáticas, esteroidogênese e maturação ovocitária (Knight e Glistler, 2003).

BMP15, também conhecida como GDF9B, foi descrita pela primeira vez em 1998 (Dube et al., 1998), presente na hipófise, testículos e outros tecidos, indicando que sua atividade não é exclusiva no ovário. Para expressar sua bioatividade, essa proteína sofre três tipos de modificações pós-transcricionais em cinco locais distintos sendo elas, N-glicosilação, S-glicosilação e C-fosforilação (Saito et al., 2008).

Os genes GDF9 e BMP15, pertencentes a família TGF β , foram identificados como importantes componentes expressos pelo ovócito, onde secretam fatores que modulam a liberação de hormônios esteróides (Otshuka e Shimazaki, 2000) e são responsáveis pela regulação das células do cumulus oophorus durante todo o desenvolvimento folicular, desde a ativação do folículo primordial até os eventos

finais de maturação e posterior ovulação (Juengel et al., 2002; Mandon-Pepin et al., 2003; Dragovic et al. , 2007).

Durante a maturação ovocitária ocorre um pico na expressão de BMP15, promovendo a expansão das células do cumulus oophorus, nesse momento há uma interação com GDF9 onde há uma coordenação na expressão dos genes envolvidos na expansão das células do cumulus oophorus (Lan et al., 2003; Li et al., 2008). Portanto, uma falha na expressão desses genes pode provocar infertilidade devida á falha no desenvolvimento folicular (Lião et al, 2003). A base molecular deste processo fisiológico é fortemente dependente de componentes que são armazenados nos ovócitos e codificados pelos genes de efeito materno.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

No presente estudo foram utilizadas fêmeas da linhagem comercial (Landrace x Large White x Pietran), média de 200 dias de idade e peso médio de 150,0 kg pertencentes á Granja de Melhoramento Genético de Suínos da Universidade Federal de Viçosa, MG, destinadas ao abate em frigorífico e comercializadas para consumo humano. Procedimento aprovado pela Comissão de Ética da UFV.

Os animais utilizados encontravam-se na ocasião da coleta dos ovócitos, no período de diestro, seis dias após a inseminação artificial. Os animais não foram submetidos a nenhum protocolo hormonal para estimular crescimento folicular.

3.2. RECUPERAÇÃO DOS OVÓCITOS E SELEÇÃO

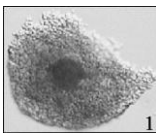
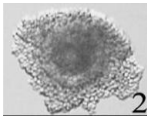
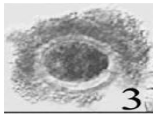
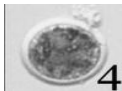
As fêmeas foram abatidas pelo método de atordoamento elétrico e sangria. Imediatamente após ao abate, os ovários foram coletados e mantidos em solução de PBS a 39°C, até o momento da aspiração. Antes da aspiração realizou-se a contagem dos corpos lúteos e foi constatado que os animais ovularam em média dezessete ovócitos por animal.

Os complexos do cumulus-oophorus (CCOs) foram coletados por aspiração folicular, utilizando seringa de 10 mL acopladas com agulhas 18G. Os CCOs foram aspirados de folículos de 3-8 mm. Após aspirados, foram selecionados de acordo

com a morfologia do CCOs utilizando a classificação proposta por Stojkovic et al. (2001) na escala de 1 a 4 (Tabela 1).

Os ovócitos de diferentes classes morfológicas foram preservados em microgotas de PBS e PVA 0,01%, em tubos criogênicos devidamente identificados, os quais foram acondicionados em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA. Foram utilizados 10 ovócitos de cada classe morfológica, com três repetições para cada classe, totalizando 30 ovócitos por classe morfológica, e duas repetições biológicas para cada amostra.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CCOs E DO CITOPLASMA.

Classificação	Aspecto das células do cúmulus e do citoplasma
	Citoplasma homogêneo com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus oophorus.
	Citoplasma com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares e cumulus oophorus compacto menor do que na categoria I, mas com pelo menos cinco camadas completas
	Compreende um ovócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, coberto com pelo menos três camadas de células do cumulus oophorus e/ou com pequenas áreas desnudas.
	Com citoplasma heterogeneamente pigmentado e cumulus oophorus completamente/parcialmente ausente ou expandido.

Fonte: STOJKOVIC *et al.* (2001)

3.3. SELEÇÃO DOS GENES

Os genes selecionados para o estudo estão relacionados ao processo de maturação nuclear e citoplasmática ovocitária. Sendo eles: MATER, ZAR1, BMP15, RYBP e como controle endógeno o gene GAPDH.

3.4. DESENHO DOS PRIMERS

Os primers utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes cujos produtos participam do processo de maturação nuclear e o controle endógeno foram desenhados por meio do programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), a partir de seqüências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os conjuntos de *primers* utilizados estão demonstrados na Tabela 2.

TABELA 2 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS (5' - 3'), NÚMERO DE ACESSO NO GENE BANK E ESPÉCIE.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos	Acesso	Espécie
BMP15	F:GCGTCGGCTGAACGCTGGTACA R:GGCCAAGCGTAGCCCCAAGCAT	NC_010461	Sus Scrofa
MATER	F:TGGGGACGGAGGTGGTGTTCG R:ACTTCGGCCAGCGGAAAGAGC	NC-010448.3	Sus Scrofa
RYBP	F:CCTCCACGCCAAAGGGCGACAT R:ATGCGAGCAGCATGGGCAGGTG	NC_000072.6	Mus Musculus
ZAR1	F:CTCATGGCCCTCCTGTCGCAGA R:GCACCGCCACGTCTCGAATGCT	NC_010450.3	Sus Scrofa
GAPDH	F:CAAAGTGGACATTGTCGCCATCA R:CAAAGTGGACATTGTCGCCATCA	NC_010447.4	Sus Scrofa

BMP15: Proteína morfogenética óssea 15; MATER: Maternal Antigen that Embryos Require; . RYBP: Proteína de Ligação; ZAR1: Zygotic arrest 1; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

3.5. EXTRAÇÃO DE RNA PREPARAÇÃO DO CDNA

As análises de RT q-PCR foram realizadas nas dependências do LABTEC- Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras de ovócitos imaturos foram descongeladas e os COCs desnudados com hialuronidase á 0,1% e posteriormente lavados em quatro gotas de PBS e transferidos para microtubos para extração do RNA. Foi utilizado o RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA), conforme as especificações dos fabricantes. Em seguida os mesmos foram processados para análise em PCR em tempo real para comparação do padrão de expressão gênica.

3.6. CÁLCULO DE EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO

A eficiência de amplificação de cada gene foi calculada por meio da construção de uma curva de diluição em série de cDNA nas concentrações de 25, 75 e 225 ng por reação. As reações foram consideradas eficientes quando a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene referência foram aproximadamente iguais, com tolerância de 10% de variação em relação ao controle endógeno como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

A partir dos dados obtidos, um gráfico de Ct (*threshold cycle*) versus o log10 da quantidade de cDNA utilizada na reação foi produzido. Foi utilizada a regressão linear para determinação do coeficiente angular da reta para determinar a eficiência de amplificação, de acordo com a equação desenvolvida por Pfaffl (2001):

$$E = 10 \left(\frac{-1}{\text{inclinação da reta}} \right) - 1$$

A diluição de cDNA e a concentração de *primer* foi escolhida após verificada a eficiência para cada gene alvo e o controle endógeno. Considerando as que apresentaram maior eficiência para preparar as reações de quantificação relativa.

3.7. REAÇÃO DE RT-QPCR EM TEMPO REAL

As reações foram efetuadas em termociclador *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 2 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e extensão a 60°C durante 60 segundos.

Nos testes de eficiência ao final dos 40 ciclos de amplificação, um passo adicional com elevação gradual de temperatura de 60°C a 95°C foi utilizado para obtenção da curva de dissociação.

A amplificação dos genes alvo e de referência endógena foi realizada em diferentes canaletas e em duplicatas na mesma placa de reação. Os dados obtidos na reação de qPCR foram gerados pelo equipamento na forma de valores de Ct. Os valores médios de Ct foram subtraídos entre si para o cálculo de Ct (Ct do alvo - Ct da referência endógena), a fim de minimizar as possíveis variações quanto à quantidade de mRNA inicial e à eficiência na transcrição reversa. A quantidade do gene alvo, normalizada para referência endógena, foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

4. ANÁLISES ESTADÍSTICAS

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições por tratamento (classe). Os dados de RT-qPCR foram analisados utilizando o modelo misto abaixo.

$$y_{jkl} = PRG_j + A_{(j)l} + D_{jk} + e_{jkl},$$

Em que:

y_{jkl} é a de expressão mensurada do gene k no ovócito l da classe j; PRG_j é o efeito da classe j; $A_{(j)l}$ é o efeito aleatório do ovócito l dentro da classe j, $A_{(j)l} \sim N(0, \sigma_A^2)$; D_{jk} é o efeito aleatório amostra-específico (comum aos dois genes), $D_{jk} \sim N(0, \sigma_D^2)$; e_{jkl} é o termo de erro aleatório, $e_{jkl} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

As análises estatísticas foram realizada utilizando a macro QPCR_MIXED desenvolvido em SAS (v. 9.1.3), elaborada para gerar comandos do SAS PROC MIXED próprios para analisar dados de RT-qPCR, assumindo efeitos aleatórios independentes para gene referência e genes alvos em cada replicada biológicas (Steibel et al., 2009) . A significância das estimativas dos contrastes foi avaliada mediante o teste t de *Student*.

5. RESULTADOS

As concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e de cDNA utilizados nas reações de amplificação estão sumariadas na Tabela 3. A curva de amplificação obtida a partir da diluição seriada de cDNA permitiu a determinação da melhor condição de amplificação para cada gene, na qual a eficiência de amplificação dos genes alvos e a do controle endógeno foram próximas.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE PRIMER, cDNA E EFICIÊNCIA DA REAÇÃO (E) PARA OS GENES ANALISADOS.

Gene	Primer (nM)	cDNA (ng/reação)	E (%)
BMP15	200	225	0,98
MATER	200	225	0,96
RYBP	300	75	0,90
ZAR1	200	75	0,91
GAPDH	200	225	0,99

BMP15: Proteína morfogenética óssea 15; MATER: Maternal Antigen that Embryos Require; RYBP: Proteína da Ligação; ZAR1: Zygotic arrest 1; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Para o gene MATER não foi observada diferença entre as classes G1, G2, G3 e G4 ovocitárias ($P > 0,05$). Os resultados estão sumariados na Tabela 4.

TABELA - 4 EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE MATER COM SEUS RESPECTIVOS DESVIO- PADRÃO.

Contrastes	Expressão Relativa	Probabilidade
G1- G2	1,825 \pm 0,4592	0,1118
G1- G3	1,897 \pm 0,4592	0,0926
G1 - G4	1,275 \pm 0,4592	0,5038
G2 - G3	1,039 \pm 0,4592	0,9153
G2 - G4	0,698 \pm 0,4592	0,3283
G3 - G4	0,672 \pm 0,4592	0,2811

Valores positivos da expressão relativa do gene MATER representam: no contraste G1-G2=maior expressão G1; no contraste G1-G3=maior expressão G3; no contraste G1-G4=maior expressão G1, no contraste G2-G3=maior expressão G2, no contraste G2-G4=maior expressão G2, no contraste G3-G4=maior expressão G3.

O gene ZAR1 não apresentou diferença entre as classes G1,G2, G3, porém a classe G4 diferiu ($p < 0,05$) das classes anteriores (Tabela 5).

TABELA - 5 EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE ZAR1 COM SEUS RESPECTIVOS DESVIO- PADRÃO.

Contrastes	Expressão Relativa	Probabilidade
G1- G2	1,825 \pm 0,5106	0,5514
G1- G3	1,897 \pm 0,5106	0,9481
G1 - G4	1,275 \pm 0,5106	0,0134
G2 - G3	1,039 \pm 0,5106	0,5943
G2 - G4	0,698 \pm 0,5106	0,0054
G3 - G4	0,672 \pm 0,5106	0,0121

Valores positivos da expressão relativa do gene ZAR1 representam: no contraste G1-G2=maior expressão G1; no contraste G1-G3=maior expressão G3; no contraste G1-G4=maior expressão G1, no contraste G2-G3=maior expressão G2, no contraste G2-G4=maior expressão G2, no contraste G3-G4=maior expressão G3.

Na tabela 6 esta sumariada a expressão do gene RYBP, onde não houve diferença entre as classes G1, G2 e G3 ($p > 0,05$), porém houve diferença da expressão do gene em relação as demais classes ovocitárias ($p < 0,05$).

TABELA - 6 EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE RYBP COM SEUS RESPECTIVOS DESVIO- PADRÃO.

Contrastes	Expressão Relativa	Probabilidade
G1- G2	1,825 \pm 0,6471	0,3935
G1- G3	1,897 \pm 0,6471	0,0996
G1 - G4	1,275 \pm 0,6471	0,0129
G2 - G3	1,039 \pm 0,6471	0,3650
G2 - G4	0,698 \pm 0,6471	0,0035
G3 - G4	0,672 \pm 0,6471	0,0010

Valores positivos da expressão relativa do gene RYBP representam: no contraste G1-G2=maior expressão G1; no contraste G1-G3=maior expressão G3; no contraste G1-G4=maior expressão G1, no contraste G2-G3=maior expressão G2, no contraste G2-G4=maior expressão G2, no contraste G3-G4=maior expressão G3.

O gene BMP15 não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre as classes G1, G2 e G3, no entanto, a classe G4 diferiu ($P < 0,05$) entre as outras classes morfológicas (tabela 7).

TABELA - 7 EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE BMP15 COM SEUS RESPECTIVOS DESVIO- PADRÃO.

Contrastes	Expressão Relativa	Probabilidade
G1- G2	1,825 \pm 0,6174	0,3808
G1- G3	1,897 \pm 0,6174	0,1872
G1 - G4	1,275 \pm 0,6174	0,0018
G2 - G3	1,039 \pm 0,6174	0,6324
G2 - G4	0,698 \pm 0,6174	0,0091
G3 - G4	0,672 \pm 0,6174	0,0221

Valores positivos da expressão relativa do gene BMP15 representam: no contraste G1-G2=maior expressão G1; no contraste G1-G3=maior expressão G3; no contraste G1-G4=maior expressão G1, no contraste G2-G3=maior expressão G2, no contraste G2-G4=maior expressão G2, no contraste G3-G4=maior expressão G3, *($P < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi analisada a abundância relativa de genes potencialmente envolvidos na competência ovocitária, utilizando o modelo de diferentes classificações morfológicas. Este modelo é baseado em uma relação bem estabelecida entre a morfologia ovocitária e a competência para o desenvolvimento dos ovócitos.

Foi avaliada a expressão de quatro genes BMP15, MATER, ZAR1 e RYBP nos ovócitos, que foram selecionados devido ao seu potencial envolvimento na competência ovocitária.

O gene BMP15, é um fator secretado pelo ovócito e desempenha papel essencial na foliculogênese, ovulação e maturação (Zhu et al., 2008). Conhecido por ser um regulador da proliferação das células granulosa, desde folículos pré-antrais até o momento da ovulação. Atuando em dois estágios diferentes do desenvolvimento folicular, em um primeiro momento promovem diferenciação das células da granulosa antes do momento da ovulação, possibilitando uma resposta destas células ao aumento repentino de LH, e no segundo momento atuando no processo de expansão das células do cumulus oophorus após o pico de LH (Su et al., 2004).

No estudo realizado por Yan et al., (2001) avaliando esse gene silenciado em camundongos, observaram o desenvolvimento folicular normal até os estágios antrais, entretanto houve falhas na ovulação e fertilização, sendo esses animais subférteis. Paradis et al. (2009), foram os primeiros a estudar a expressão da BMP15 em ovócitos suínos, descreveram o papel crucial desta proteína, no período pré-ovulatório nesta espécie, corroborando com os resultados obtidos por Yan et al. (2001). Em outro estudo realizado por Galloway et al. (2000) em ovelhas, os autores constataram uma mutação natural para BMP15, onde houve um aumento na taxa de ovulação. Essa diferença observada entre as espécies pode ser atribuída a diferente natureza (poli e mono-ovulatória).

Nos seres humanos essa mutação, está relacionada com a insuficiência ovariana e diminuição na proliferação das células da granulosa (Rossetti et al.,2009). No presente trabalho os ovócitos de grau 1, 2 e 3, não apresentaram diferença para a expressão do gene BMP15, somente ovócitos de grau 4 diferiu das classes anteriormente citadas (Figura 1).

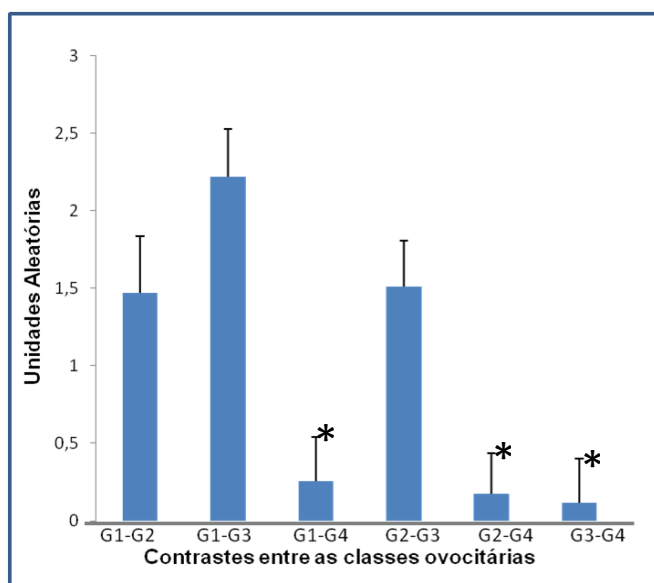


Figura 1. Quantidade relativa de mRNA da BMP15 (Média ± EPM) nos contrastes entre as classes ovocitárias; * (p<0,01)

Estes resultados corroboram, parcialmente, com estudos realizados por (Galloway et al., 2000; Yan et al., 2001; Su et al.,2004; Paradis et al., 2009; Rossetti et al., 2009), onde avaliaram a função e importância deste transcrito para aquisição da competência ovocitária. No entanto, estes estudos utilizaram somente ovócitos de grau 1 e 2, onde o grau 1 apresenta-se com citoplasma homogêneo, finas granulações e múltiplas camadas compactas de células do cumulus oophorus e grau

2 o citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares e cumulus oophorus compacto e menor do que na categoria 1, com pelo menos cinco camadas completas. Não sendo possível estabelecer uma correlação, com estes estudos, da expressão desse gene em ovócitos de grau 3.

No presente estudo a expressão do gene BMP15 para ovócitos de grau 3, se expressou de forma semelhante, para as classes 1 e 2, pode-se sugerir que estes ovócitos possuem capacidade de continuar seu desenvolvimento, baseado na função desse gene, apesar de apresentar um número reduzido de células da granulosa e citoplasma heterogêneo. Nos ovócitos de grau 4, era esperado a diminuição desse transcrito, considerando que sua função biológica está diretamente correlacionada com a coordenação das células granulosa, e ovócitos desta classe morfológica, apresentam total ausência destas células.

Corroborando com estas afirmações, no presente estudo verificou-se que ovócitos de grau 4, não são competentes para o desenvolvimento embrionário. Tais observações, baseadas na função do gene BMP15, demonstram de certo modo, a acurácia obtida em prever a competência ovocitária pelo método da classificação morfológica, que é bem estabelecida para utilização de ovócitos em biotecnologias reprodutivas.

Durante a ovogênese são codificados genes de efeito materno, os quais são armazenados para funcionar posteriormente, na conclusão da meiose, iniciação da mitose, e ativação do genoma embrionário.

Tong *et al.* (2000) estudando a proteína MATER, em camundongos nocauteados, observaram que estes ovócitos apresentaram todos os estágios da foliculogênese ovariana. Ovularam normalmente após estímulo exógeno de gonadotrofinas, foram fertilizados *in vivo* normalmente, no entanto, os embriões não progrediram para os estágios além de duas células e alguns demonstrando sinais iniciais de degeneração, sugerindo o papel essencial dessa proteína além do estágio de duas células.

Em um estudo posterior Tong *et al.* (2004) utilizando camundongos, demonstraram a localização de MATER, em diversas organelas, sugerindo que esta proteína pode estar envolvida em diferentes atividades celulares. Sua presença em mitocôndrias sugere envolvimento no metabolismo citoplasmático e distúrbios na função dessas organelas podem comprometer a produção de ATP e induzir alterações no desenvolvimento embrionário.

Também foi observada que a presença de transcritos se manteve estável em ovócitos primários, com ativação durante a ovulação e maturação e degradação total em embriões de duas células. No estudo realizado por Pennetier *et al.* (2004) utilizando ovócitos bovinos, verificaram que a proteína está presente desde folículos primários com crescente acúmulo ao longo do desenvolvimento folicular, no entanto, durante a maturação, houve uma queda acentuada na expressão do gene MATER mantendo-se estável durante a fertilização.

Com os resultados obtidos, os autores sugerem que a proteína pode ser sintetizada apesar de não ser requerida ainda nestes estágios iniciais, sendo somente requerida após o rompimento da vesícula germinativa. Neste estudo, a expressão relativa do gene MATER não diferiu entre as classes morfológicas (Figura 2), esses resultados corroboram com os de (Tong *et al.*, 2000; Pennetier *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2004) considerando que todos os ovócitos utilizados neste estudo estavam em estágio de vesícula germinativa, momento este em que a proteína ainda não é requerida para progressão da maturação e ovulação.

Portanto, no presente estudo, não foi possível correlacionar a expressão do gene MATER, em ovócitos de diferentes classificações morfológicas, os resultados obtidos sugerem que os transcritos estão presentes, mesmo em ovócitos incapazes de continuar o desenvolvimento (grau 4), porém, após a quebra da vesícula germinativa, momento em que a proteína é requerida, não serão capazes de ser ativados.

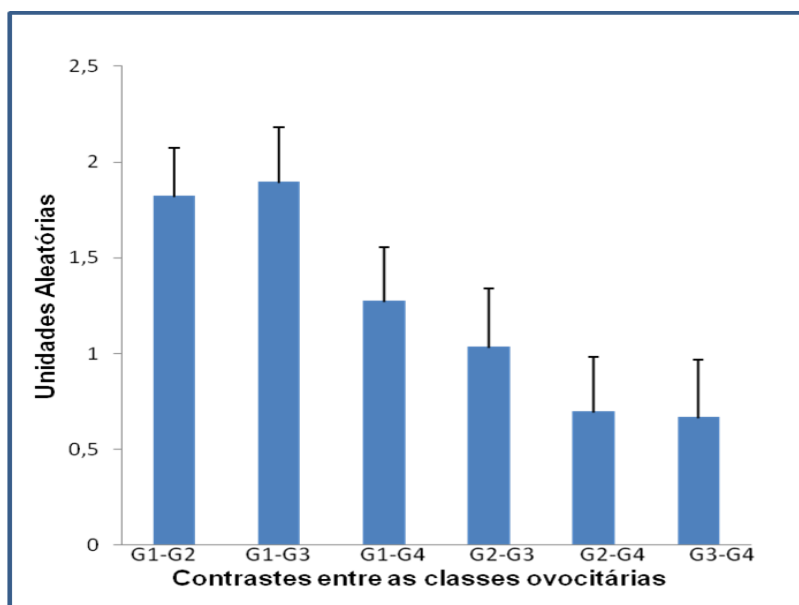


Figura 2 - Quantidade relativa de mRNA do gene MATER (Média ± EPM) nos contrastes entre as classes ovocitárias.

O gene ZAR1, é um fator que desempenha papel fundamental na transcrição e tradução durante a transição materno zigótica. Wu et al. (2003), estudando a expressão desse gene em camundongos nocauteados observaram que a foliculogênese era normal e grande presença de transcritos em ovócitos em estágio de vesícula germinativa, no entanto, após a fertilização os embriões permaneceram estacionados no estágio de duas células.

No estudo realizado por Whitworth et al. (2005) utilizando ovócitos suínos, verificaram um decréscimo na transcrição do gene ZAR1 em embriões na fase de quatro células e total degradação dos transcritos em blastocistos, sugerindo a importância destes transcritos para os estágios além de quatro células na espécie suína. No presente trabalho, avaliando a expressão desse gene, utilizando o modelo de classificação morfológica, não houve diferença na expressão deste transcritos para ovócitos de grau 1, 2 e 3, (Figura 3) estes resultados são em parte semelhantes aos registrados por outros autores (Wu et al., 2003; Whitworth et al., 2005).

Os estudos realizados por estes autores foram feitos utilizando apenas ovócitos de grau 1 e 2, portanto não é possível estabelecer uma relação com a presença destes transcritos em ovócitos de grau 3.

No presente estudo, a semelhança na expressão do gene ZAR1 nessa classe pode ser explicada, devido ao fato de que mesmo ovócitos de grau 3 não estejam competentes morfológicamente, os transcritos necessários para progressão desses ovócitos para além dos estágios embrionários, estão presentes. Como essa avaliação molecular não é possível utilizando o modelo morfológico, é possível sugerir no presente estudo que a avaliação morfológica não é totalmente eficaz para selecionar ovócitos competentes, embora, investigações utilizando ovócitos em outros estágios de desenvolvimento seja necessárias.

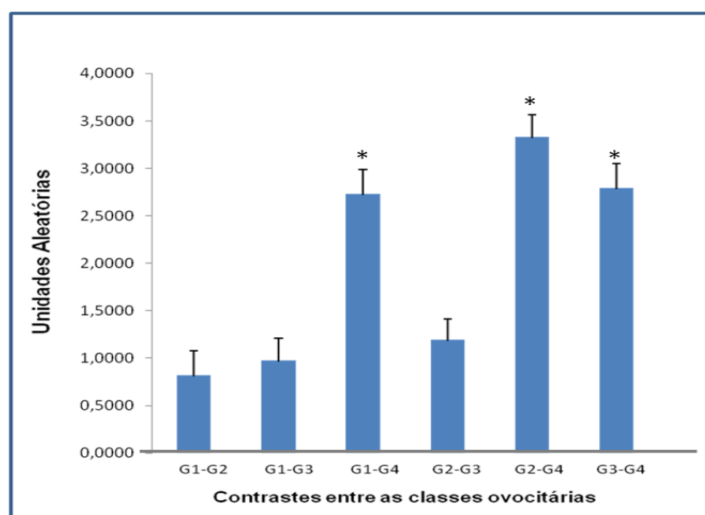


Figura 3 - Quantidade relativa de mRNA do gene ZAR1 (Média±EPM) nos contrastes entre as classes ovocitárias; * (p<0,01)

O gene RYBP é uma proteína que interage diretamente com o fator de transcrição YY1, que atua como iniciador da transcrição, regula os genes que estão envolvidos com os processos de proliferação e diferenciação celular em embriões (Seto et al., 1991). Os transcritos estão presentes em ovócitos em estágio de vesícula germinativa e continuam ativos após o período de ativação do genoma embrionário (Donohone et al., 1999; Vigneault et al., 2004; Purity et al., 2005).

Purity et al., (2005) avaliando a expressão desse gene em camundongos nocauteados, observaram que os embriões prosseguem as clivagens iniciais porém não são capazes de prosseguir além do estágio de blastocisto. Estudo realizado por Vigneault et al. (2004), utilizando ovócitos bovinos, avaliaram a expressão desse gene em ovócitos em estágio de vesícula germinativa, durante a maturação ovocitária, embriões de quatro e oito células e blastocistos. Os autores observaram uma diminuição na expressão desse gene durante a maturação até o estágio de oito células e um novo aumento na presença de transcritos em blastocistos, supondo-se que essa diminuição ocorre devido a tradução do mRNA, os autores sugerem o papel crucial desse fator para o desenvolvimento embrionário inicial durante o período de ativação do genoma embrionário. Corroborando, Dode et al. (2006) avaliaram a expressão desse gene nos embriões em diferentes estágios de clivagem após a fecundação. Os autores observaram que a expressão desse gene foi diminuída em embriões que tiveram a primeira clivagem 36 e 44 horas após a fecundação, sugerindo a importância deste transcrito para o desenvolvimento embrionário inicial.

No presente estudo, ovócitos de grau 1, 2 e 3, apresentaram expressão semelhante desse gene. Somente ovócitos de grau 4 diferiram das classes anteriormente citadas (Figura 4). Esse resultado corrobora em parte ao encontrado por Vigneault et al. (2004), onde encontraram grande presença de transcritos em ovócitos em estágio de vesícula germinativa, no entanto, estes autores utilizaram somente ovócitos de grau 1 e 2. Estes resultados sugerem que ovócitos de grau 3 são competentes para o desenvolvimento embrionário.

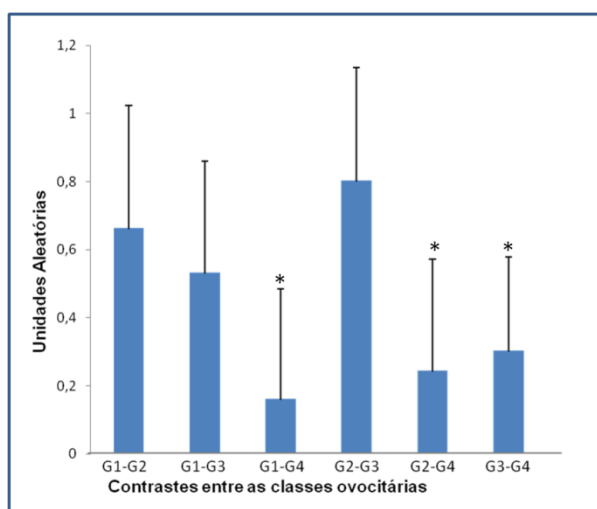


Figura 4 - Quantidade relativa de mRNA do gene RYBP (Média±EPM) nos contrastes entre as classes ovocitárias; * (p<0,01)

7. CONCLUSÕES

Os genes BMP15, RYBP e ZAR1 foram expressos de forma semelhante em ovócitos de classificação 1, 2 e 3, sugerindo que estes genes estão associados como o desenvolvimento ovocitário. No entanto, no presente estudo, não foi possível associar o envolvimento do gene MATER em ovócitos de diferentes categorias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRU, F.; BEBBERE, D.; SUCCU, S.; TORE, S.; BOGLIOLO, L.; FOIS, S. Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (zar1) gene in ovine oocytes and pre-implantation embryos. **Reproduction, Fertility and Development**. v.19.p.245. 2006.
- ALBUQUERQUE F.T.; BARRETO FILHO J. B.; VIANA, J. H. M. V. Dinâmica ovariana. In: **Manipulação do ciclo estral em bovinos de corte**. Lavras. p. 4-30. 2004.
- ALGRIANY, O.; BEVERS, M.; SCHOEVERS, E.; COLENBRANDER, B.; DIELEMAN S. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on in vitro cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. **Theriogenology**. v. 62. p. 1483–1497. 2004.
- ANDERSON, L. L.; HAFEZ, E. S. E. Suínos. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole. 7 ed. p. 183-192. 2004.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**. v.47. p.1221-1236. 1997.
- BRISTOL-GOULD, S.K.; KREEGER, P.K.; SELKIRK, C.G.; KILEN, S.M.; COOK, R.W.; KIPP, J.L.; SHEA, L.D.; MAYO, K.E.; WOODRUFF, T.K. Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. **Development Biology**. v.298. p. 132–148. 2006.
- COTICCHIO, G.; SERENI, E.; SERRAO, L.; MAZZONE, S.; IADAROLA, I.; BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann. N Y Acad Sci*.1034, p. 132-44. 2004.
- DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 21., Araxá, 2006. **Anais. Araxá: SBTE**. p.115-29. 2006.
- DONOHUE, M.; ZHANG, X.; MCGINNIS, L.; BIGGERS, J.; LI, E., YAN, S. Targeted Disruption of Mouse Yin Yang 1 Transcription Factor Results in Peri-Implantation Lethality. **Molecular and Cellular Biology**. v. 19. p. 7237-7244. 1999.
- DONNISON, M.; PFEFFER, P.L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of Reproduction**. v.71. p.1813-21. 2004.

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

DUBE, J.L.; WANG, P.; ELVIN, J.; LYONS, K.M.; CELESTE, A.J.; MATZUK, M.M. The bone morphogenetic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes. **Molecular Endocrinology**. v.12. p.1809–1817. 1998.

EVSIKOV, A.V.; GRABER, J.H.; BROCKMAN, J.M.; HAMPL, A.; HOLBROOK, A.E.; SINGH, P.; EPPIG, J.J.; SOLTER, D.; BARBARA, K. Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. **Genes e Development**. v.20. p. 2713-2727. 2006.

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

FAIR, T.; CARTER, F.; PARK, S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Global genes expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. **Theriogenology**. v.68.p. 91-97. 2007.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**. v.98. p.97-112. 2007.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIN, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1.ed, São Paulo, Varela, p. 227-260. 2002.

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

GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIDGE, L.M.; LAITINEN, M.P.E.; JUENGEL, J.L.; JORIKANTA, T.S.; MCLAREN, R.J.; LUIRO, K.; DODDS, K.G.; MONTGOMERY, G.W.; BEATTIE, A.E.; DAVIS, G.H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**. v. 25. p. 279–283. 2000.

GHANEM, N.; HÖLKER, M.; RINGS, F.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.A. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. **Developmental Biology**. v.7. p. 10-19. 2007.

GIBBONS, J.R.; BEAL, W.E.; KRISHER, R.L.; FABER, E.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**., v.42. p.405-419. 1994.

GITTENS, J.E.; KIDDER, G.M. Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. **Journal Cell Science**. v. 118. p. 113-122. 2005.

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. **Cambridge: CAB International: Raven Press** .p. 43-49. 1994.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v.31, p.212-217. 2007.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P.N.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**. v 68. p. 441-448. 2004.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 7 ed, p. 261- 278. 2004.

HAO, Y.; LAI, L.; MAO, J.; IM, G.; BONK, A.; PRATHER, R.S. Apoptosis and *in vitro* development of preimplantation porcine embryos derived *in vitro* or by nuclear transfer. **Biology of Reproduction**. v 69, p. 501–507. 2003.

HEIKINHEIMO, O.; GIBBONS, W. E. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. **Molecular Human Reproduction**. v. 4. p. 745–756. 1998.

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

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **The Veterinary Quartely**. v.2. p.78-80. 1994.

HUNTER, M.G.; ROBINSON, G.E.; WEBB, M.R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal Reproduction Science**. v. 82. p.461-477. 2004.

HUNT, P.A.; HASSOLD, T, J. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? **Trends in Genetics**. v. 24. p.86-93. 2008.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**. v.47. p. 23-32. 1997.

ISHIZAKI, C.; WATANABE, H.; BHUIYAN, M.M.U.; FUKUI, Y. Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture medium. **Theriogenology**. v.72. 72–80. 2009.

ISOM, S.C.; LI, F.R.; WHITWORTH, K.M.; PRATHER, R.S. Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the in vitro developmental potential of porcine embryos derived from in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. **Molecular Reproduction & Development**. v. 79. p.197–207. 2012.

JUENGEL, J.L.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; READER, K.L.; LAWRENCE, S.B.; O'CONNELL, A.R.; LAITINEN, M.P.E.; CRANFIELD, M.; GROOME, N.P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K.P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of Reproduction**. v.267 . p.1777 – 1789. 2002.

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

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

LAN, Z.J.; GU, P.; XU, X.; JACKSON, K.; DEMAYO, F.J.; O'MALLEY, B.W.; COONEY, A.J. GDNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. **Embo Journal**.v .22. p.1–12. 2003.

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

LI, H.K.; KUO, T.Y.; YANG, H.S.; CHEN, L.R.; LI, S.S.L.; HUANG, H.W.; Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. **Animal Reproducton Science**. v.103. p. 312-322. 2008.

LIAO, W.X.; MOORE, R.K.; OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15) and Growth and Differentiation Factor-9. **Journal of Biological Chemistry**. v.278. p.3713–3719. 2003.

LIVAK, K. J., SCHMITTIGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DDCt method. **Methods**. v. 25. 402-408. 2001.

LONERGAN, P.; RREZ-ADAÂ, A.G.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; DE LA FUENTE, J. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I Growth Factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**. v. 57. p. 146-52. 2000.

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

- LUNNEY, J.K. Advances in swine biomedical model genomics. **International Journal of Biological Sciences**. v.3. p. 179-184. 2007.
- MACHÁTY, Z.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S. Development of Early Porcine Embryos In Vitro and In Vivo. **Biology of reproduction**. v. 59. p.451–455. 1998.
- MANDON-PEPIN, B.; OUSTRY-VAIMAN, A.; VIGIER, B.; PIUMI, F.; CRIBIU, E.; COTINOT, C. Expression profiles and chromosomal localization of genes controlling meiosis and follicular development in the sheep ovary. **Biology of Reproduction**. v.68. p.985–995. 2003.
- MARCHAL, R.; VIGNERON, C.; PERREAU, C.; BALI-PAPP, A.; MERMILLOD, P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. **Theriogenology**. v.57. p. 1523- 1532. 2002.
- MARMORSTEIN, R. Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.2. p.422-432. 2001.
- McCOARD, S.A.; WISE, T.H.; FAHRENKRUG, S.C.; FORD, J.J. Temporal and special localization patterns of Gata4 during porcine gonadogenesis. **Biology of Reproduction**. v.65. p. 366-374. 2001.
- MEINECKE B, JANAS U, PODHAJSKY E, MEINECKE-TILLMANN S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**. v.36. p.183-188. 2001.
- MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIÉ, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **Journal of reproduction and fertility**. v. 54. p. 449 -460. 1999.
- MEMILI, E.; FRIST, N,L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**. v.8. p. 87 -96. 2000.
- MITO T, YOSHIOKA K, NAGANO M, SUZUKI C, YAMASHITA S, HOSHI H. Transforming growth factor- α in a defined medium during in vitro maturation of porcine oocytes improves their developmental competence and intracellular ultrastructure. **Theriogenology**. v. 72. p. 841–850. 2009.
- MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. Início do desenvolvimento humano. In Moore, K.L. e Persaud, T.V.N. **Embriologia Clínica**. Guanabara Koogan (Ed.), 5a ed, p. 13-38. 1994.
- MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction Development**. v. 73. p. 1367-1379. 2006.
- OTSHUKA, F.; SHIMASAKI, S. A novel function of Bone Morphogenetic Protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. **Endocrinology**. v.146. p. 4938–4941. 2002.

PARADIS, F.; NOVAK, S.; MURDOCH, G.K.; DYCK, M.K.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R. Temporal regulation of BMP2, BMP6, BMP15, GDF9, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2 and TGFBR1 mRNA expression in the oocyte, granulosa and theca cells of developing preovulatory follicles in the pig. **Reproduction**. v.139. p. 115-129. 2009.

PAYNTON, B.V.; REMPEL, R.; BACHVAROVA, R. Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Developmental Biology*. v. 129. p. 304-314. 1988.

PENNETIER, S.; PERREAU, C.; UZBEKOVA, S.; THÉLIE, A.; DELALEU, B.; MERMILLOD, P.; TRA, P.R. MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. **Developmental Biology**. v.26, p.1-9. 2006.

PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MERMILLOD, P.; DALBIE'S-TRAN, R. Spatio-Temporal Expression of the Germ Cell Marker Genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in Adult Bovine Tissues, Oocytes, and Preimplantation Embryos. **Biology of Reproduction**. v.71. p. 1359-1366. 2004.

PEPLING, M.E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. **Genesis**, v.44. p.622-632. 2006.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29. p. 45. 2001.

PIRITY, M. K.; LOCKER, J.; SCHREIBER, N. Rybp/DEDAF Is Required for Early Postimplantation and for Central Nervous System Development. *Molecular and Cellular Biology*. v. 16. p. 7193-7202. 2005.

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

RAJKOVICK, A.; PANGAS, S.A.; BALLOW, D.; SUZUMORI, N.; MATZUK, M.M. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. **Science**. v.305. p.1157-1159. 2004.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; LUCAS, X. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. **Reproduction Fertility and Development**. v.10. p. 479-485. 1998.

- ROSSETTI, R.; DI PASQUALE, E.; MAROZZI, A.; BIONE, S.; TONIOLO, D.; GRAMMATICO, P.; NELSON, L.M.; BECK-PECCOZ, P.; PERSANI, L. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. **Human Mutation**. v.30, p. 804-810. 2009.
- RUSSE, I. Oogenesis in Cattle and Sheep. **Bibliotheca Anatomica**. v.24. p.77-92. 1983.
- SAITO, S.; YANO, K.; SHARMA, S.; MCMAHON, H.E.; SHIMASAKI, S. Characterization of the post-translational modification of recombinant human BMP-15 mature protein. **Protein Science**. v.17. p.362–370. 2008.
- SAS Institute Inc. **SAS/STAT® 9.2 User's Guide**. 2nd ed. Cary, NC. 2009.
- SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. **Veterinary Record**. v. 167. p. 205-218. 1991.
- SAWA, C.; YOSHIKAWA, T.; MATSUDA-SUZUKI, F.; DELEHOZEE, S.; GOTO, M.; WATANABE, H.; SAWADA, J.; KATAOKA, K.; HANDA, H. YEAF1/RYPB and YAF-2 are functionally distinct members of a cofactor family for the YY1 and E4TF1/hGABP transcription factors. **Journal of Biological Chemistry**. v.277. p.22484–22490. 2002.
- SENEDA, M.M.; BORDIGNON, V. Novos conceitos em foliculogênese. XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35 (Supl. 3). 2007.
- SETO, E.; SHI, Y.; SHENK, T. YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. **Nature**. v.354. p. 241-245. 1991.
- SCHULTZ, R.M.; DAVIS, W. J.R.; STEIN, P.; SVOBODA, P. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. **Journal of Experimental Zoology**. v.285. p.276-282. 1999.
- 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.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**.v. 65. p. 126-36. 2006.
- SONG, J.L.; WESSEL, G.M. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. **International Society of Differentiation**. v.73, 1-17. 2005.
- STEIBEL, J.P., POLETTO, R., COUSSENS, P. M., ROSA, G. J.M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**. v.94. p.146–152. 2009

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

SUN, Q.; NAGAI, T. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. **Journal of Reproduction and Development**. v. 45. p. 348-359. 2003.

SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; WOO, Y.; WIGGLESWORTH, K.; KAMDAR, S.; AFFOURTIT, J.; EPPIG, J. Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. **Developmental Biology**. v. 302, p. 104–117. 2007.

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

TAKEMOTO H, MUTO N, SUNAGAWA I, SHINJO A, NAKADA T. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biology of Reproduction**. v.71. p.1150–1157. 2004.

TONG, Z-B.; GOLD, L.; DE POL, A.; VANEVSKI, A; DORWARD, H.; SENA, P.; PALUMBO, C.; BONDY, C.A.; NELSON, L.M. Developmental expression and subcellular localization of mouse MATER, an oocyte-specific protein essential for early development. **Endocrinology**. v.145. p. 1427-1434. 2004.

TONG, Z.B.; GOLD, L.; PFEIFER, K.E.; DORWARD, H.; LEE, E.; BONDY, C.A.; Dean, J.; Nelson, L.M. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. **Nature Genetics**. v.26. p. 267–268. 2000.

UZBEKOVA, S.; ROY-SABA, M.; DALBIÈS-TRAN R.; PERREAU, C.; PAPILLIER P.; MOMPART F.; THELIE, A.; PENNETIER ,S.; COGNIE, J.; CADORET V.; ROYERE, D.; MONGET, P.; MERMILLOD, P. Zygote arrest 1 gene in pig, cattle and human: evidence of different transcript variants in male and female germ cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.4. p.4-12. 2006.

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

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKER, J.F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**.v.47. p.73-82. 1997.

VAN DEN HURK, R.V.; ZHAOB, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles, **Theriogenology**.v.63. p. 1717–1751. 2005.

VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. **Biology of Reproduction**., v. 70. p.1701–1709. 2004.

WARNER, C.M.; MC ELHINNY, A.S.; WU, L.; CIELUCH, C.; KE, X.; CAO, W.; TANG, C.; EXLEY, G.E. Role of the *ped* gene and apoptosis genes in control of preimplantation development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. v.15. 331–337. 1998.

WANG W, DAY BN, WU G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research and Technique**. v.61. p.335-341. 2003.

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

WHITWORTH, K.M.; AGCA, C.; KIM, J.G.; PATEL, R.V.; SPRINGER, G.K.; BIVENS, N.J.; FORREST, L.J.; MATHIALANGA, N.; GREEN, J.A.; PRATHER, R.S. Transcriptional Profiling of Pig Embryogenesis by Using a 15-K Member Unigene Set Specific for Pig Reproductive Tissues and Embryos. **Biology of Reproduction**. v.72. p.1437–1451. 2005.

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; YAMASAKI, H.; AGUNG.; TANIGUCHI, B. M.; VNAOI, H.; SHIMIZU, R.; NAGAI, T. Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos. **Theriogenology**. v.66. p.366–372. 2006.

WU, X.; WANG, P.; BROWN, C.A.; ZILINSKI ,C.A.; MATZUK, M.M. Zygote arrest 1 (*Zar1*) is an evolutionarily conserved gene expressed in vertebrate ovaries. **Biology of Reproduction**., v.69. p 861-867. 2003.

WU, Y-G.; LIU, Y.; ZHOU, P.; LAN, G-C.; HAN, D.; MIAO, D-Q.; TAN, J-H. Selection of oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. **Cell Research**.v.17. p. 722-731. 2007.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F.J.; ELVIN, J.A.; CARINO, C.; PRASAD, S.V.; SKINNER, S.S.; DUNBAR, B.S.; DUBE, J.L.; CELESTE, A.J.; MATZUK, M.M. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Molecular Endocrinology**. v.6. p. 854-866. 2001.

YOSHIDA, M.; ISHIZAKI, Y.; KAWAGISHI, K.; BAMBA, K; KOJIMA, Y. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**., v.95. p.481– 488. 1992.

YOSHIOKA K, SUZUKI C, ONISHI A, Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. **Journal of Reproduction and Development**. v.54. p. 208–213. 2008.

YOSHIOKA, K.; NOGUCHI, M. SUZUKI, C. Production of piglets from in vitro-produced embryos following non-surgical transfer. **Animal Reproduction Science**. v.131. p. 23-29. 2012.

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