

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EXPRESSÃO GÊNICA EM COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO  
BOVINOS SELECIONADOS PELA ATIVIDADE DA  
GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE**

**ELIANA FRANCO LOPES**

**PORTO ALEGRE, 2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EXPRESSÃO GÊNICA EM COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO BOVINOS  
SELECIONADOS PELA ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO  
DESIDROGENASE

Autora: Eliana Franco Lopes

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutora em Ciências  
Veterinárias na Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Fernando Felix Lopes

PORTO ALEGRE, 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Lopes, Eliana Franco  
Expressão gênica em complexos cumulus-oócito  
bovinos selecionados pela atividade da glicose-6-  
fosfato desidrogenase / Eliana Franco Lopes. -- 2013.  
84 f.

Orientador: José Luiz Rodrigues.  
Coorientador: Rui Fernando Felix Lopes.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2013.

1. complexos cumulus-oócito . 2. azul cresil  
brilhante . 3. transportadores de monocarboxilatos.  
4. expressão gênica . 5. bovinos. I. Rodrigues, José  
Luiz , orient. II. Lopes, Rui Fernando Felix,  
coorient. III. Título.

Eliana Franco Lopes

EXPRESSÃO GÊNICA EM COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO BOVINOS  
SELECIONADOS PELA ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO  
DESIDROGENASE

Aprovada em 25 de janeiro 2013

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. Rui Fernando Felix Lopes  
Co-orientador e Presidente da Comissão

---

Dra. Fabiana Forell (UDESC)  
Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Adriana Bos Mikich (UFRGS)  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira (UFPEL)  
Membro da Comissão

Aos meus pais  
Flávio (*in memoriam*) e Celi

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### **EXPRESSÃO GÊNICA EM COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO BOVINOS SELECIONADOS PELA ATIVIDADE DA GLICOSE-6- FOSFATO DESIDROGENASE**

AUTOR: ELIANA FRANCO LOPES  
ORIENTADOR: JOSÉ LUIZ RODRIGUES  
CO-ORIENTADOR: RUI FERNANDO FELIX LOPES  
Porto Alegre, janeiro de 2013.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de genes envolvidos no transporte de monocarboxilatos (*Mct1*, *Mct2*, *Mct3* e *Mct4*) e de genes específicos da oogênese (*Bmp15*, *Gdf9* e *Has2*) em complexos *cumulus*-oócito (CCOs) selecionados pelo teste BCB. Após seleção morfológica com base no grau de compactação das células do *cumulus* (CCs) e no grau de homogeneidade do citoplasma, os CCOs foram corados com 26  $\mu$ M BCB (azul cresil brilhante) por 90 min e divididos em dois grupos: BCB+, que apresentavam o ooplasma corado de azul, e BCB-, com ooplasma não corado. Foram utilizados dois grupos controles não expostos ao BCB: o grupo *holding* foi submetido às mesmas condições que os grupos corados e o outro grupo controle foi diretamente submetido à maturação *in vitro* (MIV), após a seleção morfológica dos CCOs. A expressão gênica relativa foi determinada por RT-PCR em CCOs coletados antes e ao final da maturação. A expressão também foi avaliada, separadamente, em oócitos desnudos (ODs) e células do cumulus (CCs) antes e após a maturação. A análise dos transcritos demonstrou que houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão relativa de *Gdf9* e *Bmp15* nos grupos BCB+, BCB- e *holding* antes da MIV, enquanto *Has2* teve aumento significativo ( $p < 0,01$ ) após a MIV apenas no grupo controle. Os outros genes analisados (*Mct1*, *Mct2* e *Mct4*) mantiveram-se estáveis durante a maturação. O aumento na abundância relativa de alguns transcritos durante a MIV pode ser atribuído as condições de incubações durante o teste BCB. Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, a expressão de *Mct1*, 2 e 4 em CCOs

bovinos. Enquanto o mRNA de *Mct1* e *Mct4* estava presente em ODs e em CC, o *Mct2* foi detectado somente em CCs. Não detectamos a expressão de transcritos de *Mct3* em CCOs. As diferenças na expressão dessas três isoformas sugerem um papel único para esses transportadores durante a maturação.

Palavras-Chave: teste BCB, complexos *cumulus*-oócito, expressão gênica, transportadores de monocarboxilatos, fatores secretados por oócitos.

ABSTRACT  
Doctoral Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

GENETIC EXPRESSION IN BOVINE *CUMULUS* OOCYTE COMPLEXES  
SELECTED BY ACTIVITY OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE  
DEHYDROGENASE

AUTHOR: ELIANA FRANCO LOPES  
ADVISER: JOSÉ LUIZ RODRIGUES  
SUPERVISER: RUI FERNANDO FELIX LOPES  
Porto Alegre, January, 2013

*The aim of this study was to determine the relative expression of genes involved in transport of monocarboxylates (Mct1, Mct2, Mct3 e Mct4) and oogenesis specific genes (Bmp15, Gdf9 and Has2) in immature and mature bovine cumulus-oocyte complexes (COC) after selection by BCB. Immature COCs underwent morphological selection and were stained with 26 mM BCB for 90 min. Based on ooplasm staining, oocytes were distributed in two groups BCB+ (blue color) and BCB- (non-stained). The holding control group was exposed to the same incubation conditions as stained COCs, but without BCB. Control group was submitted to in vitro maturation (IVM) immediately after morphological selection. mRNA expression was investigated by RT-PCR in COCs before and after IVM. No relationship was observed in the relative expression of Has2, Gdf9, Bmp15 or Mct1, 2 and 4 transcripts between BCB- and BCB+ COCs. Transcripts analysis showed that Gdf9 and Bmp15 in BCB+, BCB- and holding groups were up-regulated ( $p < 0.05$ ) before IVM, while Has2 was up-regulated ( $p < 0.01$ ) after IVM in the control group. Others genes remained stable during maturation (Mct1, 2 and 4). The increase in relative abundance of some transcripts during IVM may be attributed to incubation conditions during the BCB test. Our results showed, for the first time, Mct1, 2 and 4 expression in bovine COCs. Mct1 and Mct4 transcripts were present in denuded oocytes and cumulus cell, while Mct2 was detected only in cumulus cells. These differences between the three isoforms in localization suggest unique roles for each in monocarboxylate transport during maturation.*

*Key-words: BCB test, cumulus-oocyte complexes, gene expression, monocarboxylate transporter, oocyte-secreted factors.*



## LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

<b>Table 1.</b> Details of primers used in RT-PCR analysis.....	55
<b>Fig. 1.</b> Relative abundance of <i>Mct1</i> , <i>Mct2</i> and <i>Mct4</i> mRNA (mean $\pm$ SD) in bovine COCs. ....	57
<b>Fig. 2.</b> Representative agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplicons for the monocarboxylate transporter mRNA expression in bovine COCs. ....	57
<b>Fig. 3</b> Relative abundance of <i>Has2</i> , <i>Bmp15</i> and <i>Gdf9</i> mRNA in bovine COCs after selection by BCB (mean $\pm$ SD).....	60
<b>Fig. 4.</b> Relative <i>Bmp15</i> , <i>Gdf9</i> and <i>Has2</i> mRNA abundance (mean $\pm$ SD) among immature and mature COCs. ....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
Bax	Proteína Bax
BCB	Azul Cresil Brilhante ( <i>Blue Cresyl Brilliant</i> )
Bcl2	Linfoma de células B2 ( <i>B-cell lymphoma 2</i> )
Bmp15	Proteína morfogenética óssea 15
BSA	Albumina Sérica Bovina
CC	Células do <i>Cumulus</i>
CCO	Complexo <i>Cumulus</i> -Oócito
COC	<i>Cumulus-oocyte Complexes</i>
CG	Células da Granulosa
CHC	Alfa-Ciano-4-Hidroxicinâmico
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
Cox2	Ciclooxigenase 2
CP	Corpúsculo Polar
D7	Embrião dia 7 após a fecundação
EGF	Fator de Crescimento Epidermal ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
FBS	Soro Fetal Bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FIV	Fecundação <i>In Vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G6PDH	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
GC	Grânulos Corticais
Gdf9	Fator de Diferenciação 9
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
GSH	Glutationa
GV	Vesícula Germinal ( <i>Germinal Vesicle</i> )
HA	Ácido Hialurônico
Has2	Ácido Hialurônico Sintase ( <i>Hyaluronan Synthase 2</i> )
Hba	Alpha 2 Globina
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HPB	Via Hexosamina
LH	Hormônio Luteinizante

MII	Metáfase II
Mct	Proteína Transportadora de Monocarboxilato
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Dinucleotídio de Nicotinamida e Adenina
NADPH	Fosfato de Dinucleotídio de Nicotinamida e Adenina
ODs	Oócitos Desnudos
OSF	Fatores de Crescimento Secretados pelos Oócitos
PFK	Fosfofrutoquinase
PIV	Produção <i>In Vitro</i>
PVA	Poliálcool Vinílico ( <i>Polyvinyl Alcohol</i> )
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
QVG	Quebra da Vesícula Germinativa
RNA	Ácido Ribonucléico
RPE	Epitélio Pigmentar da Retina ( <i>Retinal Pigment Epithelium</i> )
RT-PCR	Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase
SLC16	<i>Solute Carrier Family</i>
Star	Proteína Reguladora Aguda
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
TGFB	Fator de Transformação do Crescimento Beta
uPA	Plasminogênio Uroquinase
VG	Vesícula Germinativa
ZP	Zona Pelúcida

Obs: Os símbolos de proteínas e genes constantes neste documento seguem as regras de nomenclatura propostas pelo “*HUGO Gene Nomenclature Committee*” (HGNC). Este comitê recomenda que os nomes/símbolos para designar genes sejam os mesmos usados para as proteínas, com a diferenciação de estarem sempre grafados em itálico. Genes e proteínas humanas devem ser grafados sempre em caracteres maiúsculos para a diferenciação de outras espécies. Nos símbolos não são permitidos o uso de hífens, algarismos romanos ou letras do alfabeto grego.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Foliculogênese.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Maturação oocitária.....</b>	<b>17</b>
2.2.1	Maturação nuclear.....	18
2.2.2	Maturação citoplasmática.....	19
2.2.3	Maturação molecular.....	20
<b>2.3</b>	<b>Crítérios de seleção de oócitos.....</b>	<b>21</b>
2.3.1	Morfologia .....	21
2.3.2	Avaliação das células do <i>cumulus</i> .....	24
2.3.3	Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	26
2.3.4	Ambiente folicular .....	28
2.3.5	Outros parâmetros .....	29
<b>2.4</b>	<b>Metabolismo no complexo <i>cumulus</i> oócito.....</b>	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>Transportadores de monocarboxilatos .....</b>	<b>35</b>
<b>2.6</b>	<b>Fatores secretados por oócitos .....</b>	<b>40</b>
<b>2.7</b>	<b>Ácido hialurônico sintase 2 (Has2).....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Artigo.....</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>73</b>
	REFERÊNCIAS.....	74

## 1 INTRODUÇÃO

Os primeiros trabalhos de embriologia bovina foram realizados na metade do século XX por Winters *et al.* (1942) e Hamilton e Laig (1946). Seus esforços, para compreender e detalhar o desenvolvimento embrionário nos estádios de pré-implantação, levaram às primeiras tentativas de manipulação da produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV). Trabalhos posteriores geraram esclarecimentos adicionais da fisiologia, da gametogênese, da fecundação e do desenvolvimento embrionário, culminando com um grande conhecimento na área da embriologia dentro da medicina veterinária.

A primeira FIV de oócitos bovinos maturados artificialmente foi realizada por Iritani e Niwa (1977). Brackett *et al.* (1982) obtiveram o nascimento do primeiro terneiro de FIV utilizando oócito maturado *in vivo*. Hanada *et al.* (1986), produziram o primeiro terneiro após FIV de oócitos maturados artificialmente e cultivo em oviduto de coelha até blastocisto seguido de transferência para receptoras. E somente com os resultados do trabalho de Fukuda *et al.* (1990), houve o nascimento dos primeiros terneiros produtos do processo de MIV, FIV e cultivo *in vitro* (CIV).

Os ganhos científicos e econômicos obtidos a partir das biotecnologias da reprodução, indubitavelmente, foram e têm sido o ímpeto para revisões adicionais e para a busca de novos esclarecimentos nessa área. Contudo, embora atualmente já seja possível o uso de técnicas que poderiam parecer futuristas há poucas décadas, como a sexagem de sêmen e de embriões, a micromanipulação de embriões, a injeção intracitoplasmática de espermatozoide, a transferência nuclear para a produção de clones e transgênicos, ainda existem muitos fatores que limitam o progresso dessas técnicas.

A PIV de embriões constitui a caixa de ferramenta básica para o domínio da maioria das tecnologias relatadas, bem como para as pesquisas básicas sobre os mecanismos envolvidos na maturação, fecundação, cultivo e desenvolvimento embrionário inicial. E, por sua vez, a qualidade intrínseca do oócito tem sido considerada como o fator chave, ou condição prévia para se determinar o sucesso da PIV e de outras tecnologias.

O critério que tem sido amplamente usado para a seleção de oócitos imaturos de bovinos e de outros mamíferos, em diferentes categorias, baseia-se em características morfológicas. O objetivo dessa seleção é eliminar, já no início da produção, os possíveis oócitos com baixo potencial de desenvolvimento, aumentando a eficiência do procedimento de PIV.

Cabe salientar que em trabalhos de PIV de embriões bovinos, geralmente são utilizados ovários provenientes de animais de abatedouro, que por apresentarem um ambiente ovariano diverso levam a uma heterogeneidade dos gametas femininos. Essa heterogeneidade pode determinar diferenças no desenvolvimento da competência oocitária. Contudo, a seleção morfológica é uma análise subjetiva e, embora razoável para identificar a qualidade do oócito e a capacidade de MIV, não é suficiente para selecionar adequadamente os gametas com potencial de alcançar o estágio de blastocisto.

Neste contexto, a coloração com o azul cresil brilhante (BCB) tem sido utilizada na seleção de oócitos imaturos competentes para a maturação *in vitro*. Com a utilização deste corante, é possível diferenciar oócitos em diferentes estádios de desenvolvimento, através da medição indireta da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que por sua vez, está associada com a competência oocitária e seu desenvolvimento subsequente.

Entretanto, o conhecimento da possível associação da atividade da G6PDH e o perfil de expressão gênica durante a oogênese ainda é escasso e pouco esclarecedor. Sabe-se que o desenvolvimento da competência oocitária pode estar relacionado com a presença ou ausência de transcritos específicos, uma vez que os estádios iniciais da embriogênese são regulados por RNAs e proteínas maternas armazenadas dentro do oócito. Esses RNAs são necessários para garantir a síntese de proteínas durante a fase de silenciamento transcricional do genoma embrionário, que ocorre durante a maturação, fecundação e primeiras divisões embrionárias.

A utilização de marcadores moleculares pode ser empregada na validação de outros testes realizados na tecnologia de PIV, a exemplo do teste BCB. Esses marcadores podem ainda ser úteis para avaliar a competência do oócito e levar à compreensão de quando e como este adquire competência durante a foliculogênese, de quais são as cascatas metabólicas que ativam o

desenvolvimento e quais são os principais genes que disparam e regulam essas cascatas. Por sua vez, a elucidação desses mecanismos poderia melhorar a viabilidade embrionária, fator determinante para o estabelecimento de uma prenhez, além de permitir que outras técnicas de reprodução assistida possam avançar, abrindo novos horizontes para a pesquisa na área.

Considerando a importância do transporte dos monocarboxilatos e da comunicação bi-direcional entre o oócito e as células do *cumulus* o objetivo desse trabalho foi determinar a expressão relativa antes e após a maturação dos genes *Mct1*, *Mct2*, *Mct3*, *Mct4*, *Has2*, *Gdf9* e *Bmp15* em CCOs bovinos de acordo com a atividade da enzima G6PDH.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Foliculogênese

A foliculogênese, definida como o crescimento de um folículo através de diferentes estádios de desenvolvimento, inicia ainda durante a gestação, quando as células germinais primordiais e somáticas sofrem proliferação mitótica. As células germinais primordiais são derivadas da massa celular interna do blastocisto em desenvolvimento e vão originar todo o repertório de oócitos presentes no ovário adulto (PICTON, 2001).

No estágio inicial da embriogênese, as células germinais migram do epitélio do saco vitelínico até a gônada indiferenciada. Aos 45 dias de gestação o ovário apresenta um córtex bem definido, nesse momento, as células germinais iniciam sua diferenciação em oogônias. Os ciclos mitóticos se estendem até o período próximo do nascimento, resultando em aproximadamente 2 milhões por animal, embora somente cerca de 5% desse número restará ao nascimento. Ao final da proliferação mitótica, a oogônia entra em prófase da meiose e se diferencia em oócito primário. O oócito primário progride através da primeira prófase meiótica (leptóteno, zigóteno e paquíteno) e para no estágio de diplóteno ou de vesícula germinativa (VG) até que sejam induzidos a retomar a meiose sob estímulo de gonadotrofinas, pouco antes da ovulação. Nesse momento, são iniciadas as modificações celulares e nucleares necessárias para o estabelecimento de uma célula haplóide (ERICKSON, 1966). Durante a parada em diplóteno o oócito bovino pode aumentar de 30  $\mu\text{M}$  para 120-125  $\mu\text{M}$  de diâmetro, sendo essa modificação chamada de crescimento oocitário (HYTTEL *et al.*, 2005). O crescimento oocitário é acompanhado pelo desenvolvimento folicular e continua depois do nascimento. Embora aparentemente quiescentes durante a parada em prófase I, os oócitos contidos em folículos primordiais apresentam altos índices de síntese protéica. No entanto, pouco se conhece sobre os fatores de regulação que estimulam alguns folículos a crescer e outros a permanecer quiescentes por toda a vida do animal (DEAN, 2002; FAIR, 2003).



Os folículos primordiais, retidos em fase de repouso desde o tempo de seu desenvolvimento no ovário fetal, deixam o estágio de repouso e passam a ser folículos primários (HYTTEL *et al.*, 1997). O primeiro sinal que o oócito entrou em fase de crescimento é a modificação morfológica das células da granulosa para uma forma cubóide (MHAWI *et al.*, 1991). Após essa modificação, os folículos primários se desenvolvem por proliferação ativa das células da granulosa em folículos secundários e depois em terciários, estes caracterizados pelo aparecimento da cavidade antral (HYTTEL *et al.*, 1997).

Durante o crescimento oocitário, o oócito primário inicia a diferenciação das células somáticas que circundam o folículo em células da teca (folículo secundário). A formação do antro no folículo terciário desloca as células foliculares em relação ao oócito primário, nesse momento pode-se visualizar um aglomerado de células foliculares chamado de *cumulus oophorus*. Deste modo, o folículo vai se aproximando da superfície da gônada culminando com a ovulação do complexo *cumulus oophorus*-oócito (CCO). Esse conjunto de modificações é chamado de capacitação oocitária (HYTTEL *et al.*, 1997) e é essencial para o desenvolvimento da competência do oócito.

A competência oocitária, alcançada gradualmente durante a foliculogênese e crescimento oocitário, é definida como a habilidade de um oócito de completar meiose, tornando-se preparado para ser fecundado, se desenvolver até o estágio de blastocisto e como resultado final, dar origem a um indivíduo vivo e saudável (KRISHER, 2004). De um modo geral, a competência é adquirida logo após a formação do antro e quando os oócitos adquirem cerca de 80% do seu diâmetro final (BEVERS e IZADYAR, 2002).

Os oócitos não iniciam seu crescimento ao mesmo tempo dentro do ovário. Somente uma pequena população nos folículos primordiais entra na fase de crescimento e atinge seu tamanho final antes da ovulação. Aproximadamente 100.000 folículos primordiais estão contidos num par de ovários bovinos (ERICKSON, 1966).

Além do desenvolvimento das células somáticas e germinais, evidências sugerem que a cooperatividade metabólica entre elas é fundamental durante a foliculogênese (GILCHRIST *et al.*, 2004; EPPIG *et al.*, 2005; SIRARD *et al.*,

2006; GILBERT *et al.*, 2012). Os oócitos secretam fatores que regulam as funções das células da granulosa tais como proliferação, diferenciação e expansão do *cumulus*, como mostrado em camundongos e bovinos (ELVIN *et al.*, 1999, HUSSEIN *et al.*, 2006, OTSUKA *et al.*, 2011).

A influência da sinalização endócrina e parácrina sobre o crescimento e diferenciação das células somáticas foliculares durante o desenvolvimento folicular e durante a maturação oocitária não é ainda bem esclarecida (GALLOWAY *et al.*, 2000, PAULINE e MELO, 2010). Os oócitos e as células que o circundam mantêm uma associação próxima desde os estádios iniciais do desenvolvimento folicular. Essa associação é necessária para manter a capacidade de desenvolvimento, além de prover o oócito com nutrientes e sinais regulatórios necessários para a maturação nuclear e citoplasmática (KRISHER, 2004). Estudos recentes sobre a comunicação entre oócitos e células somáticas mostram que os fatores de crescimento secretados pelos oócitos (OSFs) influenciam o desenvolvimento folicular através de um processo de sinalização parácrina (HUSSEIN *et al.*, 2006; OTSUKA *et al.*, 2011). Entre eles, o fator de diferenciação 9 (Gdf9) e a proteína morfogenética óssea 15 (Bmp15) mostraram ser fundamentais durante a foliculogênese e maturação oocitária (ELVIN *et al.*, 1999; HUSSEIN *et al.*, 2006; OTSUKA *et al.*, 2011).

Embora seja evidente a importância da interação bidirecional entre o oócito e as células do *cumulus* (CCs), ainda são escassos os esclarecimentos sobre os eventos celulares e moleculares que influenciam esses mecanismos (MOTA *et al.*, 2009; PURCELL e MOLEY, 2009).

## **2.2 Maturação oocitária**

Atualmente, a MIV de oócitos bovinos tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta de pesquisa dos processos envolvidos durante a maturação, fecundação e para o estudo de desenvolvimento embrionário no período pré-implantação. O principal motivo para esta utilização é o fato de que os oócitos são, em grande parte, obtidos de ovários retirados de vacas de abatedouro ou, por

punção folicular de animais vivos, representando, deste modo, uma origem acessível de material experimental (SIRARD *et al.*, 2006).

Com o propósito de melhor esclarecer os níveis essenciais para que um oócito torne-se competente para ser fecundado e se desenvolva até blastocisto, Sirard *et al.* (2006) dividiram a maturação oocitária em três níveis principais: a maturação nuclear que compreende a retomada e a finalização da primeira divisão meiótica; a maturação citoplasmática comumente definida por modificações que ocorrem no citoplasma de oócitos em desenvolvimento; e a maturação molecular que resulta em modificações genômicas que podem regular a expressão gênica.

### 2.2.1 Maturação nuclear

Os passos-chave que caracterizam a capacidade do oócito em desenvolver competência podem ser enumerados em cinco níveis e envolvem as habilidades de: (1) concluir a meiose, (2) clivar após a fecundação, (3) se desenvolver até blastocisto, (4) induzir prenhez e (5) de ter o nascimento de um indivíduo a termo e saudável (SIRARD *et al.*, 2006). Mesmo que a habilidade de retomar a meiose seja provavelmente a medida mais fácil de ser realizada, com a visualização sob microscópio da extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) ou através do uso de corantes (observação de metáfase), ela está no início de uma sincronia molecular e celular necessária para a obtenção da competência (SIRARD *et al.*, 2006).

Os oócitos que estão parados na prófase I desde a fase fetal retomam seu desenvolvimento na puberdade. A retomada da meiose é manifestada pela condensação dos cromossomos, desintegração do envelope nuclear (ou quebra da VG) e formação do primeiro fuso meiótico. A finalização da primeira divisão meiótica se dá pela segregação dos cromossomos homólogos e emissão do primeiro CP. Imediatamente, inicia a segunda divisão meiótica, a qual para em metáfase II (MII) até que ocorra a fecundação. Nesse momento, haverá segregação das cromátides e extrusão do segundo CP. Esse período compreendido entre a retomada da meiose até o estágio MII é definido como maturação nuclear do oócito (BEVERS e IZADYAR, 2002).

### 2.2.2 Maturação citoplasmática

Durante o processo de obtenção de competência, o oócito vai sofrer modificações não só em nível nuclear, mas também completará sua maturação citoplasmática através de modificações estruturais (LONERGAN *et al.*, 2003). Segundo Hyttel *et al.* (1997), as modificações que tornam o oócito maduro, em nível citoplasmático, capacitam e modulam a sua maquinaria celular para sustentar a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial.

A descrição inicial da maturação citoplasmática é baseada em observações estruturais realizadas poucos dias antes do pico de LH (SIRARD *et al.*, 2006). Segundo Hyttel *et al.* (1997), a primeira evidência de competência citoplasmática ocorre quando o oócito para sua fase de preparação de RNA e síntese protéica, através de modificações da maquinaria de transcrição e tradução (condensação do nucléolo e depleção de ribossomos). Uma segunda série de modificações ocorre próximo do pico de LH resultando na redistribuição das organelas citoplasmáticas tais como mitocôndrias e grânulos corticais (GC) (SIRARD *et al.*, 2006).

O movimento das mitocôndrias para áreas de alto consumo de energia é crucial para o oócito e para o embrião durante períodos críticos do ciclo celular (FERREIRA *et al.*, 2009). Análises ultra-estruturais de oócitos bovinos submetidos a MIV mostram que as mitocôndrias movem-se a partir de uma posição mais periférica para uma posição mais dispersa na área central, após um período de MIV de 22-24 h (SILVA *et al.*, 2011).

No final do período de maturação, quando os oócitos atingem MII, também ocorrerá uma reorganização dos GC. Os GC, que durante o estágio de VG encontravam-se distribuídos em grupos no citoplasma, serão agora distribuídos ao longo da superfície interna da membrana plasmática, um perfil estratégico necessário para evitar a entrada de mais de um espermatozoide (HOSOE *et al.*, 1997). Os GC são organelas exclusivamente encontradas em oócitos e a sua exocitose (reação cortical) é o mecanismo mais comum usado pelo oócito para evitar polispermia (HOSOE *et al.*, 1997).

### 2.2.3 Maturação molecular

A maturação molecular é a menos definida dos três níveis de maturação oocitária. A maioria dos oócitos totalmente crescidos sofre maturação meiótica e citoplasmática eficiente embora somente um grupo consiga se desenvolver até o estágio de blastocisto. A diferença entre um oócito capaz de se desenvolver e outro incompetente pode estar relacionada ao estado de diferenciação do folículo e das diferenças nem sempre visíveis no oócito num estudo ultra-estrutural (SIRARD *et al.*, 2006).

O processo de maturação molecular corresponde à fase de crescimento e maturação do oócito e envolve a transcrição, armazenamento e processamento de mRNAs transcritos e que podem ser posteriormente traduzidos em proteínas pelos ribossomos (SIRARD, 2001). O mRNA transcrito durante a maturação molecular será acumulado de modo estável embora inativo transitoriamente até que sinais para sua tradução sejam produzidos durante a maturação, fecundação e através do desenvolvimento embrionário inicial (TOMEK *et al.*, 2002).

A hipótese mais aceita para explicar a habilidade de um oócito desenvolver-se após fecundação é que ele armazena estoques de mRNA e proteínas que contribuem para a fase de desenvolvimento antes da ativação do genoma embrionário (período de silenciamento) (MERMILLOD *et al.*, 2008). De acordo com Telford *et al.* (1990), em bovinos, a maior transcrição de genes embrionários inicia no estágio de 8- para 16-células.

Os mRNAs maternos presentes no oócito podem ser armazenados dentro do citoplasma de maneira estável por longos períodos através do seu “empacotamento” por ribonucleoproteínas. Deste modo, o mRNA fica protegido da ação das enzimas nucleolíticas até que sinais específicos para o início da sua tradução sejam emitidos (FULKA *et al.*, 1998). Esse processo difere do que ocorre em tecidos somáticos, onde o conteúdo de mRNA reflete diretamente o perfil protéico contemporâneo da célula. Brevine-Gandolfi *et al.* (1999) apontaram o armazenamento inapropriado do mRNA e as diferenças da

adenilação do mRNA como fatores que poderiam afetar a habilidade de um oócito em sustentar as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento de técnicas moleculares mais eficazes tem permitido a identificação de vários genes expressos em CCOs. Além disso, a correlação desses resultados com a observação de outros parâmetros de qualidade tem auxiliado na compreensão do desenvolvimento da competência oocitária.

A natureza exata e a diversidade de moléculas sinalizadoras de oócitos e CCs são complexas e dinâmicas e, ainda que não esclarecidas, sabe-se que tem um profundo impacto na qualidade do oócito (ASSOU *et al.*, 2010).

### **2.3 Critérios de seleção de oócitos**

O objetivo da seleção de oócitos é eliminar, já no início da produção, os oócitos com baixo potencial de desenvolvimento aumentando a eficácia e a eficiência dos procedimentos de PIV. De um modo ideal, o método de seleção deveria ser simples, rápido, barato, além de permitir o processamento de vários CCOs, ser confiável e não-invasivo. Infelizmente, nenhuma técnica cumpre todos esses requisitos. Além disso, os critérios utilizados até o momento, embora razoáveis para identificar a qualidade do oócito e a capacidade de MIV, não são suficientes para selecionar adequadamente os gametas capazes de originar um zigoto com potencial de alcançar o estágio de blastocisto (OPIELA *et al.*, 2008).

#### **2.3.1 Morfologia**

Os oócitos imaturos exibem uma variedade de características morfológicas visíveis por microscopia de luz, tais como o número de camadas e o grau de compactação das células do CCs e a homogeneidade do citoplasma (LEIBFRIED e FIRST, 1979). A possibilidade de usar critérios morfológicos para identificar oócitos com o potencial de desenvolvimento até blastocisto após a fecundação pode ser vantajosa como uma ferramenta não-invasiva de seleção (HAZELEGER *et al.*, 1995). Atualmente, o critério que tem sido amplamente utilizado para a seleção de oócitos imaturos de bovinos e de outros mamíferos, em

diferentes categorias, baseia-se em características morfológicas. Contudo, os oócitos bovinos apresentam um ooplasma escuro que pode prejudicar a seleção, ao contrário do observado em oócitos humanos, onde a presença de grânulos e vacúolos é facilmente identificada (BORINI *et al.*, 2005). Além disso, a visualização do CP, da forma e do diâmetro do oócito é prejudicada pela presença de uma massa de CCs escura (GOOVAERSTS *et al.*, 2010).

As diferenças morfológicas demonstraram afetar a habilidade dos CCOs bovinos de maturar *in vitro* (LEIBFRIED e FIRST, 1979). Após a visualização dos CCOs sob microscopia, foi atribuído um escore numérico que varia de 1 a 3, para o ooplasma, e de 1 a 4, para as CCs, baseando-se em características morfológicas. O ooplasma com escore 1 possuía poucas granulações, cor parda e ocupava uniformemente a ZP; com escore 2, possuía grânulos acumulados no centro do oócito deixando a periferia clara ou distribuídos de maneira desigual e ocupava uniformemente a ZP; e, com o escore 3, aqueles ooplasmas encolhidos e afastados da ZP, degenerados, vacuolizados ou fragmentados. Quanto à presença de CCs, o escore 1 era atribuído aos CCOs que possuíam mais de três camadas de CCs compactas; o escore 2, aos CCOs com CCs presentes parcialmente, não circundando todo o oócito ou com menos de 3 camadas compactas; o escore 3, para os CCOs com CCs expandidas ou aglomeradas; e o escore 4, para os oócitos que não continham nenhum envoltório além da ZP íntegra. Após MIV, foi possível correlacionar os escores com a habilidade de um oócito de maturar *in vitro*. Quando a porcentagem de maturação foi calculada dentro de cada categoria de CCs e oócitos, taxas de maturação levemente mais altas foram observadas naquelas categorias com escores numéricos mais baixos, permitindo uma associação dos escores com as características designadas como ótimas.

CCOs obtidos de folículos antrais (4-8 mm) de ovários provenientes de vacas de abatedouro foram distinguidos em 4 categorias após avaliação por microscopia de luz (LOOS *et al.*, 1989): 1) oócitos com ooplasma homogêneo, claro e transparente, envolto por uma multicamada de CCs compactas, claras e transparentes; 2) oócitos com ooplasma homogêneo, de ZP com aparência espessa e escura envolto por uma multicamada de CCs compactas, CCO levemente escuro e menos transparente quando comparado a categoria 1; 3) CCO mais escuro e com

CCs menos compactas que as categorias 1 e 2, contendo ooplasma irregular com grumos escuros; e 4) CCO escuro e irregular, CCs expandidas, escuras e mucificadas, ooplasma irregular com manchas escuras. Após seleção, essas quatro categorias foram submetidas a uma avaliação morfológica ultra-estrutural e sua capacidade de atingir MII foi observada após MIV. Apesar de oócitos imaturos das categorias 1, 2 e 3 demonstrarem uma grande variação na aparência a nível ultra-estrutural, isso não refletiu na capacidade de maturarem *in vitro*. Somente os CCOs da categoria 4 tiveram uma diminuição significativa da habilidade de atingir MII (34%), quando comparados com as categorias 1, 2 e 3 (respectivamente, 66, 78 e 76%).

Posteriormente, a correlação entre as características morfológicas de oócitos bovinos e o potencial de desenvolvimento *in vitro* foi observada (HALEZEGER *et al.*, 1995). Nove grupos morfológicos foram usados para classificar os CCOs imaturos: 1) camada de CCs completa e compacta circundando o oócito, ooplasma homogêneo contendo fina granulação, conferindo uma cor marrom; 2) camada de CCs completa e compacta, ooplasma levemente mais escuro que o grupo 1, contendo uma ZP mais escura; 3) camada de CCs completa mas começando a se expandir, ooplasma com grumos escuros, de cor marrom; 4) CCs totalmente irregulares, expandidas e mucificadas; 5) igual ao grupo 1, mas tanto as CCs como o ooplasma apresentavam cor pálida; 6) exposição das células da corona radiata, características citoplasmáticas variáveis; 7) camada de CCs completa e compacta, ooplasma uniformemente escuro; 8) ZP exposta, características citoplasmáticas variáveis e 9) similar ao grupo 1 mas com diâmetro menor que 110  $\mu$ M. Após PIV, o potencial de desenvolvimento mostrou estar correlacionado com a classificação morfológica utilizada. A taxa de blastocisto foi superior nos grupos 1, 2 e 3 (respectivamente, 50, 45 e 46%) quando comparado com o grupo 4, 5 e 8 (respectivamente, 10, 30 e 0%). Quando os três primeiros grupos foram cultivados juntos, houve 46% de blastocisto, enquanto que o cultivo dos demais grupos resultou em 10% de blastocisto.

Atualmente, a seleção morfológica de oócitos imaturos para a MIV preconiza a rejeição daqueles que possuem uma quantidade mínima de CCs e/ ou expandidas, e citoplasma não homogêneo, embora a exatidão dessa característica



em prever a qualidade dos oócitos ainda esteja em discussão. Assim, a seleção dos CCOs de melhor qualidade, com base em características morfológicas, e os avanços na PIV permitem que os índices de blastocistos obtidos *in vitro* atinjam média de 30-40% sugerindo a necessidade de outros parâmetros de seleção (GOOVAERTS *et al.*, 2010).

### 2.3.2 Avaliação das células do *cumulus*

O oócito é circundado por células somáticas denominadas de CG. A camada mais interna, em contato com o gameta, é denominada de corona radiata, a qual está envolvida por outras camadas celulares, nomeadas conjuntamente de CCs (NOTTOLA *et al.*, 1998). As CCs possuem um papel biológico importante na maturação citoplasmática do oócito, no mecanismo de controle da interação entre o oócito e o espermatozoide e na transferência de pequenas moléculas para os oócitos. As CCs se comunicam umas com as outras e com o gameta através de uma rede de junções comunicantes (*gap junctions*) (GILULA *et al.*, 1978). Essas junções são importantes para a transferência de moléculas como a adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que atua como fator inibidor da maturação do oócito, e outras substâncias importantes no processo de crescimento/capacitação e de maturação oocitária (MIYANO, 2005). Por outro lado, o oócito secreta substâncias que irão estimular a proliferação e a diferenciação das CCs. Deste modo, ao mesmo tempo em que a maturação do gameta é regulada através de produtos secretados pelas CCs, o oócito regula as funções das células que o circundam, como a proliferação, a diferenciação e a apoptose (HUSSEIN *et al.*, 2006). Embora os mecanismos pelos quais as CCs influenciem a competência do oócito não sejam totalmente conhecidos, as análises da viabilidade e do metabolismo das CCs podem ser úteis em prever o potencial de desenvolvimento do oócito.

Alguns grupos têm investigado marcadores moleculares de expressão nas CCs, através de RT-PCR ou *microarray*, como um método de buscar esclarecimentos sobre os genes envolvidos no crescimento folicular e no desenvolvimento oocitário (ASSIDI *et al.*, 2008; BETTEGOWDA *et al.*, 2008).

O perfil de expressão gênica em oócitos e em CCs de pacientes humanos submetidos a FIV foi observado através do uso da técnica de *microarray*, utilizando oligonucleotídeos capazes de cobrir a maioria dos genes identificados em humanos (ASSOU *et al.*, 2006). O perfil gênico das CCs demonstrou um aumento de 2600 genes e uma diminuição de 1514 genes em relação aos oócitos, entre eles o gene da hialuronidase sintase 2 (*HAS2*), principal enzima responsável pela produção do ácido hialurônico (HA) pelas CCs.

Com base em um estudo prévio (ALI e SIRARD, 2005), onde foi demonstrado que o tratamento com FSH nas primeiras 6 horas de MIV de oócitos bovinos poderia levar ao aumento da competência, produzindo uma taxa de blastocisto de 45%, Assidi *et al.* (2008) avaliaram se esse aumento da competência poderia ser mediado pela expressão diferenciada de genes. Deste modo, os autores observaram o perfil de expressão gênica das CCs nesses grupos em relação as CCs do controle (sem adição de hormônio) após 6 horas de MIV. Houve aumento na expressão do gene *Has2* nas CCs dos grupos tratados quando comparado ao controle sugerindo o uso desse gene como um bom candidato em prever competência oocitária (ASSIDI *et al.*, 2008).

A correlação na abundância do mRNA das catepsinas B, S e Z foi avaliada nas CCs de oócitos bovinos com o potencial de desenvolvimento até blastocisto *in vitro* (BETTEGOWDA *et al.*, 2008). De acordo com os resultados da RT-PCR, que mostraram uma associação negativa entre a expressão do mRNA dessas catepsinas nas CCs e a competência oocitária, os autores sugerem seu uso como ferramenta indireta em prever a capacidade de oócitos bovinos de alcançar o estágio de blastocisto após fecundação.

Embora essas correlações possam ser promissoras ainda não é certo se podem auxiliar em determinar a capacidade de desenvolvimento do oócito em maturar e alcançar o estágio de blastocisto após fecundação. Além disso, mesmo que o procedimento possa não prejudicar os CCOs, a obtenção das CC, realizada por biopsia, é uma técnica laboriosa e de pouca aplicação na rotina de PIV de embriões bovinos (GOOVAERTS *et al.*, 2010)

### 2.3.3 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A seleção de oócitos baseando-se na atividade da enzima G6PDH tem sido utilizada com sucesso na diferenciação entre oócitos competentes e incompetentes para sofrer maturação (WU *et al.*, 2007; OPIELA *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011) e para alcançar o estágio de blastocisto, após fecundação (TORNER *et al.*, 2008; OPIELA *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2009).

A G6PDH faz parte da via fosfato-pentose e tem papel importante na suplementação de energia nas células por manter o nível de NADPH. Ela está ativa em oócitos em desenvolvimento, mas apresenta atividade reduzida em oócitos que tiveram sua fase de crescimento concluída (MANGIA e EPSTEIN, 1975). O BCB é um corante reduzido através da ação da G6PDH para uma substância de cor mais clara. Deste modo, é possível medir indiretamente a atividade intracelular dessa enzima após a exposição e redução do corante. Assim, os oócitos que completaram sua fase de crescimento, permanecem com o citoplasma azul (BCB+), enquanto aqueles em crescimento apresentam o citoplasma claro (BCB-), devido à ação enzimática (GOOVAERTS *et al.*, 2010).

O potencial de desenvolvimento de oócitos de camundongos selecionados pelo teste BCB+ foi correlacionado com a maturação citoplasmática, determinada pelo nível intracelular de glutatona (GSH) e pelo perfil de distribuição mitocondrial (WU *et al.*, 2007). Os autores observaram que houve uma diferença significativa ( $p < 0.05$ ) na concentração de GSH entre oócitos BCB+ e BCB- (7,44 e 3,57 pmol/oócito, respectivamente). O perfil de distribuição mitocondrial após coloração com rodamina 123 mostrou que nos oócitos BCB+, a maioria das mitocôndrias estava agregada próximo ao fuso meiótico (MII) do oócito.

A razão entre duas proteínas relacionadas à apoptose (Bcl2/Bax) e a tendência de um oócito de sofrer apoptose ou se desenvolver foram correlacionados com a coloração pelo BCB. Essa informação seria útil para sugerir que a atividade da G6PDH poderia ser utilizada como marcador para determinar qualidade oocitária, validando o teste BCB (OPIELA *et al.*, 2008).

Não houve correlação entre a coloração por BCB e a expressão desses genes apoptóticos em oócitos imaturos. No entanto, o número de blastocistos eclodidos/total de blastocisto foi significativamente maior no grupo BCB+ (21,5%) quando comparado ao grupo BCB- (7,7%) ou ao grupo controle (19,6%).

As características de oócitos bovinos com diferentes atividades de G6PDH foi avaliada através da técnica de *microarray* (TORNER *et al.*, 2008). Foram identificados 185 genes diferentemente expressados entre oócitos BCB+ e BCB-, sendo destes, 85 com regulação aumentada e 100 com regulação diminuída em BCB+ quando comparados com BCB-. Em relação aos processos biológicos, o perfil de expressão de oócitos BCB+ foi marcadamente diferente dos BCB-. A maioria dos genes com função conhecida expressa em oócitos BCB+ estava relacionada à regulação do ciclo celular. Nos oócitos BCB- predominavam os genes envolvidos no controle da síntese de ATP, transporte de elétron na mitocôndria e ligantes do íon cálcio. Embora o gene *Bmp15* tenha mostrado uma tendência de ter maior expressão em BCB-, não houve diferença significativa em relação aos oócitos BCB+.

Em nosso grupo de trabalho, Silva *et al.* (2011) correlacionaram a atividade da G6PDH e a capacidade de CCOs bovinos em sofrer maturação nuclear e citoplasmática. A maturação nuclear foi determinada através da identificação da extrusão do primeiro CP, enquanto a maturação citoplasmática foi realizada com base na migração dos GC e na distribuição das mitocôndrias. A presença de CP, migração periférica dos GC e mitocôndrias localizadas centralmente foi significativamente maior em oócitos BCB+ quando comparados com BCB- (presença de CP: 65% x 20%; GC periféricos: 72% x 14%; e mitocôndrias centrais: 85% x 19%, respectivamente). A eficácia da seleção pelo teste BCB no desenvolvimento *in vitro* também foi avaliada. As taxas de blastocisto (D7) foi significativamente maior em oócitos BCB+ (35%) quando comparados com oócitos BCB- (10%). Deste modo, o teste BCB se mostrou eficiente em selecionar adequadamente oócitos bovinos imaturos competentes para sofrer maturação nuclear e citoplasmática, o que foi corroborado com o potencial de desenvolvimento *in vitro*.

#### 2.3.4 Ambiente folicular

A competência do desenvolvimento de um oócito é obtida progressivamente durante o crescimento folicular dentro do ovário. Por sua vez, o ambiente folicular é um reflexo do estado fisiológico do animal e variações nesse ambiente poderão levar a efeitos significativos na atividade metabólica do oócito (MERMILLOD *et al.*, 2008). Uma vez que, o metabolismo inapropriado do oócito pode reduzir a qualidade do oócito e, posteriormente, o desenvolvimento embrionário, a relação entre o ambiente folicular (tamanho do folículo, grau de atresia, características bioquímicas do fluido, etc.) e a competência de um oócito é evidente (NANDI *et al.*, 2008; SPLINDER *et al.*, 2000).

O fluido folicular é derivado do sangue que irriga os capilares da teca e, posteriormente, atravessa o interstício da teca, a lâmina basal do folículo e a camada de CGs. Enquanto o desenvolvimento folicular progride, o fluido se acumula no antro banhando o oócito e fornecendo o ambiente que ele necessita para maturar (RODGERS e IRVING-RODGERS, 2010). A composição do fluido folicular consiste de vários nutrientes, fatores de crescimento hormônios, eletrólitos e enzimas. Este ambiente protege o oócito de fatores que induziriam a retomada da meiose prematura, do ataque de enzimas proteolíticas, facilita a extrusão durante a ovulação e aumenta a atração, motilidade e reação de acrossoma do espermatozoide (AVERY *et al.*, 2003). Alguns componentes do fluido são produtos sintetizados pelas células foliculares e oócitos.

As concentrações de glicose, lactato e piruvato no fluido folicular em relação ao tamanho do folículo em búfalas e ovelhas foram determinadas, além da avaliação dos efeitos de concentrações não fisiológicas desses substratos no meio de maturação (NANDI *et al.*, 2008). Em ovelhas e búfalas, com o aumento do tamanho dos folículos, as concentrações de glicose aumentaram e as de lactato diminuíram significativamente, mas a concentração de piruvato não se alterou. Na MIV, a maturação de oócitos e o crescimento das CCs e granulosas foram mais altas em meio contendo somente altas concentrações de glicose (5 mM), de piruvato (10 mM) ou em meio contendo concentrações fisiológicas e combinadas de glicose, lactato e piruvato. Concentrações fisiológicas ou subfisiológicas de

glicose, lactato ou piruvato sozinhas não permitiram o crescimento de oócitos ou de células foliculares. O efeito desses substratos energéticos no crescimento das células foliculares demonstrou uma preferência por glicose e piruvato ao lactato, como fontes energéticas. De acordo com os autores, o lactato poderia ter um papel não-metabólico na acidificação no ambiente local.

Embora a conexão entre ambiente folicular e oócito seja clara, essa relação é perdida nas produções de embriões comerciais ou pesquisas, onde geralmente se utilizam *pools* de oócitos obtidos a partir de folículos em estádios diferentes de crescimento e não são feitas associações com o seu microambiente.

### 2.3.5 Outros parâmetros

Outros parâmetros intrínsecos de qualidade oocitária podem ser medidos, tais como atividade mitocondrial, número de cópias de DNA mitocondrial, conteúdo de cálcio, atividade de fosfodiesterase, expressão de transcritos, entre outros. Embora eles possam ser utilizados para avaliar a qualidade global de oócitos provenientes de diferentes tratamentos *in vitro* ou *in vivo*, não podem ser considerados como parâmetros preditivos de qualidade oocitária, já que necessitam a destruição dos oócitos (MERMILLOD *et al.*, 2008). Muitos autores têm utilizado esses parâmetros na tentativa de validar outros métodos utilizados na seleção de oócitos (OPIELA *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2009; OPIELA *et al.*, 2010).

## 2.4 Metabolismo no complexo *cumulus* oócito

Oócitos maturados *in vitro* podem ter seu potencial de desenvolvimento reduzido e seu metabolismo energético alterado como consequência de uma deficiência do meio de maturação e ou de uma inabilidade intrínseca (KRISHER *et al.*, 2004). A regulação do metabolismo de nutrientes é controlada em vários níveis incluindo: a disponibilidade de substratos no ambiente, o sistema de transporte através da membrana e a regulação e atividade enzimática (LANE e GARDNER *et al.*, 2000). Esses mecanismos podem ser fundamentais para criar um microambiente que permita a maturação do oócito. A suplementação adequada de nutrientes não é somente essencial para os processos que antecedem a implantação, mas também tem mostrado ser importante na programação metabólica que influenciará o crescimento posterior e doenças em adultos (PANTALEON *et al.*, 2008).

A glicose, o lactato e o piruvato são os pré-requisitos necessários para o crescimento de oócitos e células foliculares *in vitro* (NANDI *et al.*, 2008). No entanto, outros compostos também são importantes nos estádios da maturação oocitária, tais como: ácidos graxos, aminoácidos, eletrólitos, purinas e pirimidinas (SUTTON-MCDOWALD *et al.*, 2010).

A necessidade de glicose nos estádios iniciais de desenvolvimento tem se mostrado um paradoxo (JANSEN *et al.*, 2006). Mesmo que não seja necessária como substrato energético (BIGGERS *et al.* 1967; LEESE e BARTON, 1984), a exposição a ela antes do estágio de 8-células foi fundamental para a formação de blastocistos em camundongos (CHATOT *et al.*, 1989). Deste modo, a glicose tem mostrado atuar como um importante sinalizador celular, facilitando a expressão de proteínas transportadoras de glicose (PANTALEON *et al.*, 2008) e de monocarboxilados (JANSEN *et al.*, 2006). Assim, as alterações no metabolismo da glicose e em seus substratos são apontadas como causas da diminuição da competência oocitária e da fertilidade (SUTTON-MCDOWALD *et al.*, 2010).

É bem aceito que o ambiente em que os oócitos são cultivados durante a MIV, desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário subsequente. O tipo e as concentrações de substratos energéticos adicionados ao

meio podem alterar o perfil metabólico e a maturação dos oócitos (SUTTON *et al.*, 2003). Dentro do CCO, a glicose tem vários destinos durante a MIV, sendo utilizada principalmente por quatro vias: a glicólise levará a produção de ATP e substratos; a via fosfato-pentose fornecerá substratos que contribuirão para a integridade do ooplasma, além de atuar na regulação da maturação meiótica; a via hexosamina (HPB) será a responsável por gerar substratos usados na produção da matriz; e a via do poliol, que oxidará a glicose em sorbitol e frutose (SUTTON-MCDOWALD *et al.*, 2010).

Vários autores têm descrito a importância das CCs na facilitação da transferência de nutrientes e fatores essenciais para o desenvolvimento do oócito, tais como metabólitos, aminoácidos e moléculas utilizadas na transdução de sinais (BIGGERS *et al.*, 1967; GILCHRIST *et al.*, 2004; EPIG *et al.*, 2005). Antes da ovulação, o oócito já está intimamente ligado às CCs através de processos transzonais, o que facilita a comunicação bi-direcional entre eles via junções comunicantes e sinais parácrinos (GILCHRIST *et al.*, 2004).

O oócito bovino possui uma baixa capacidade de captar glicose associada com uma baixa atividade da enzima fosfofrutoquinase (PFK), uma enzima que limita a glicólise (AUGUSTIN *et al.*, 2001). Como consequência possui uma baixa taxa glicolítica quando comparado com as CCs. Assim, vários autores têm sugerido que o destino da glicose dentro das CCs é primariamente a via glicolítica (STEEVES e GARDNER, 1999; SUTTON *et al.*, 2003). As CCs converteriam a glicose em substratos que o oócito poderia facilmente utilizar tais como os monocarboxilatos, piruvato e lactato (BIGGERS *et al.*, 1967; DONAHUE e STERN, 1968; LEESE e BARTON, 1984; SUTTON-MCDOWALD *et al.*, 2010).

Os monocarboxilatos apresentam um papel importante no metabolismo de todas as células, sendo o lactato, produto final da glicólise, de especial importância. Alguns tecidos como os músculos esqueléticos, hemácias e muitos tumores, usam a glicólise para produzir ATP sob condições fisiológicas, enquanto todos tecidos tornam-se dependentes dessa via durante situações de hipóxia ou isquemia. A glicólise produz duas moléculas de ácido láctico para cada molécula de glicose consumida, que podem ser transportadas para fora da célula se altas taxas de glicólise são mantidas. Se o efluxo do lactato não acompanhar a



produção, poderá haver aumento de sua concentração intracelular causando a diminuição do pH do citosol. Isto leva a uma inibição da PFK e conseqüentemente uma inibição da glicólise (HALLESTRAP e PRICE, 1999).

Dentro do CCO, a via glicolítica responde por um grande consumo de glicose e produção de ATP, lactato e piruvato, sendo de grande importância no metabolismo oocitário. No oócito esses monocarboxilatos são metabolizados via ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), seguido por fosforilação oxidativa para produção de energia na forma de ATP (STEEVES e GARDNER, 1999; CETICA *et al.*, 2003).

As CCs podem levar a progressão da MIV a partir do estado de VG até metáfase II em oócitos murinos cultivados em meio contendo somente glicose como fonte energética (BIGGERS *et al.*, 1967). Quando cultivados sem as CCs, é necessária a presença de piruvato ou oxalacetato para que ocorra MIV. Donahue e Stern (1968) mediram a quantidade de piruvato produzido pelas CCs e observaram que sua formação somente era possível quando havia a combinação de glicose e CCs, indicando que a maturação do oócito poderia ser sustentada pelo TCA (BIGGERS *et al.*, 1967; DONAHUE e STERN, 1968).

Resultados semelhantes foram observados para a maturação de oócitos bovinos em meio TCM 199 desprovido de soro fetal (GESHI *et al.*, 2000). A taxa de maturação de oócitos desnudos (ODs) cultivados na presença de piruvato ( $71,9\% \pm 5,7$ ) foi semelhante à de CCOs maturados na ausência ( $77,7\% \pm 1,8$ ) ou presença ( $78,5\% \pm 2,8$ ) de piruvato, enquanto foi significativamente maior que a taxa de ODs cultivados sem adição de piruvato ( $19,6\% \pm 6,6$ ). As taxas de fecundação seguiram o mesmo padrão. ODs maturados na presença de piruvato ( $42,6\% \pm 6,0$ ) e de CCOs maturados na ausência ( $53,3\% \pm 2,7$ ) ou presença ( $58,1\% \pm 4,3$ ) de piruvato apresentaram taxas de fecundação superiores a dos ODs cultivados sem piruvato ( $16\% \pm 4,5$ ). Contudo a suplementação de piruvato não foi suficiente para que os ODs apresentassem a mesma taxa de formação de blastocisto que CCOs. Esses resultados demonstram que embora a suplementação de piruvato promova a maturação nuclear de ODs bovinos, a presença das CCs é

importante para o desenvolvimento subsequente de zigotos até o estágio de blastocisto (GESHI *et al.*, 2000).

Associando-se o conhecimento de que a glicólise seja considerada a via metabólica predominante para a utilização da glicose pelas CCs; que os ODs possuem baixa atividade glicolítica e que a maturação do oócito poderia ser mantida pelo TCA, tem sido sugerido que as CCs metabolizam a glicose em piruvato como substrato oxidativo preferido do oócito (CETICA *et al.*, 2003).

O metabolismo oxidativo do piruvato, durante a maturação do oócito, aumenta após a quebra da VG (KRISCHER e BAVISTER, 1998) e é maior que o da glicose até que ocorra a compactação, momento onde a glicose torna-se a principal origem de nutriente necessária para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (JANSEN *et al.*, 2006).

O transporte de piruvato e lactato através da membrana plasmática ocorre via uma família de proteínas transportadoras de monocarboxilatos (MCT, do inglês, *monocarboxylate transporter*, ou SLC, *solute carrier family*). Assim, esses transportadores podem estar envolvidos no aumento da captação de piruvato e lactato em oócitos murinos (JANSEN *et al.*, 2006).

Tecidos como o cérebro, coração e musculatura esquelética vermelha, facilmente oxidam o ácido láctico, o qual pode se tornar o principal combustível sob algumas condições; nesses tecidos deve ser rapidamente transportado para dentro da célula. Embora o lactato seja produzido e utilizado pelo metabolismo da célula, seu pK é 3,86, o que garante que ele seja quase totalmente dissociado para o ânion lactato em um pH fisiológico. Esse íon não pode atravessar a membrana plástica por difusão livre, mas requer um mecanismo de transporte específico fornecido por transportadores de monocarboxilatos ligados a prótons. Esses transportadores catalisam a difusão facilitada do lactato com um próton. Embora o lactato seja o monocarboxilato de maior quantidade a ser transportado através da membrana plástica, os MCTs são também essenciais para o transporte de outros monocarboxilatos metabolicamente importantes como o piruvato, e os corpos cetônicos acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato e acetato. Deste modo, os MCTs possuem um papel central no metabolismo dos mamíferos sendo críticos para a comunicação metabólica entre as células (HALLESTRAP e PRICE, 1999).

A detecção de um sistema de transporte específico para o piruvato e glicose através da membrana plasmática foi observado em diferentes estádios de desenvolvimento em embriões de camundongos (GARDNER e LEESE, 1988). Antes do estágio de 2-células, os autores não encontraram evidência de um sistema de transporte ativo para a glicose em camundongos, contudo ao longo do desenvolvimento embrionário (2-, 4-, 8-células e blastocisto) a captação de piruvato mostrou ser mediada por um sistema de transporte.

Para avaliar se a expressão do *Mct1* poderia ser afetada pela glicose durante o desenvolvimento embrionário inicial, Jansen *et al.* (2006) cultivaram zigotos de camundongos coletados 18 h após a injeção de gonadotrofina coriônica humana (hCG). A detecção dos transcritos foi realizada por RT-PCR e da proteína, por imunohistoquímica. O cultivo foi realizado em dois meios diferentes conforme a presença ou ausência de glicose (KSOM livre ou contendo 0,6 mmol/L). Um terceiro grupo de embriões no estágio de 4-células foi exposto brevemente à glicose (27 mmol/L por 3 h) e, após esse “pulso”, retornaram para o cultivo em meio livre de glicose. Não houve detecção da expressão do mRNA do *Mct1* em mórulas cultivadas na ausência de glicose (até 90 h após o hCG), mas a expressão deste gene foi detectada em mórulas expostas à glicose durante todo o cultivo. Mórulas que receberam apenas um “pulso” de glicose mantiveram sua habilidade de expressar o *Mct1* mesmo quando posteriormente cultivados num ambiente livre de glicose. Contudo, houve intensidade similar das bandas de proteína relativas à presença de *Mct1* nos três grupos. Essa discrepância levou os autores a seguirem o CIV até 112 h após o hCG para avaliar se a presença da proteína persistia na ausência de glicose. A diminuição da imunoreatividade de *Mct1* ocorreu entre 90 h e 98 h após o hCG e foi fracamente visualizada às 105 e 112 h, coincidindo com a falha dos embriões em se desenvolverem até blastocisto. Deste modo, a detecção continuada do mRNA do *Mct1* e de sua proteína mostraram ser dependentes da exposição prévia à glicose, sugerindo que a mesma poderia atuar como um sinal, conforme relatado previamente por Leese e Barton (1984).

Posteriormente, Jansen *et al.* (2008) observaram como a exposição à glicose no meio de CIV poderia afetar os transcritos de *Mct2* e *Mct4* em embriões

de camundongos. Na ausência de glicose não foi possível a visualização do mRNA do *Mct4* em mórulas, mas aquelas submetidas a um “pulso” de glicose mantiveram sua habilidade de expressar o *Mct4*, estando esse transcrito sob influência da glicose de modo semelhante ao *Mct1*. Contudo, a intensidade das bandas relativa à presença das proteínas Mct2 e Mct4 não apresentou comportamento semelhante à Mct1 em embriões expostos ou não a glicose. A proteína Mct4 não variou sua quantidade ou localização ao longo do desenvolvimento embrionário de camundongos, nem após um breve “pulso” por glicose. Já o desenvolvimento na ausência de glicose causou um aumento significativo na quantidade da proteína Mct2. Os autores não citam se a glicose influenciou os transcritos de *Mct2*, mas enfatizam a complexidade da regulação e da expressão dos transportadores de monocarboxilatos durante o desenvolvimento embrionário inicial.

## 2.5 Transportadores de monocarboxilatos

É aceito que a glicose não pode manter o desenvolvimento inicial do embrião (LEESE e BARTON, 1984), contudo atua na facilitação de proteínas transportadores de glicose (PANTALEON *et al.*, 2008) e monocarboxilatos (JANSEN *et al.*, 2006; JANSEN *et al.*, 2008). Deste modo, tem sido de particular importância a compreensão de como ocorre a regulação no âmbito metabólico em oócitos e embriões durante as primeiras clivagens e de como é regulada a passagem de moléculas através da membrana plástica.

Atualmente, sabe-se que o transporte de monocarboxilatos é realizado por uma família de proteínas, os Mcts, ou Slc16, que medeiam o transporte de um próton e um íon monocarboxilato. O transporte via Mct é totalmente reversível, sendo a direção de transporte guiada pelo gradiente do substrato e pelo próton co-transportado (HARDING *et al.*, 1999). Das 14 seqüências identificadas até agora em mamíferos, somente os MCTs de 1, 2, 3 e 4 têm análise detalhada de seus substratos e inibidores (HÉRUBEL *et al.*, 2002). O MCT8 e MCT10 mostraram atuar no transporte dos hormônios tireoidianos, sendo que este último pertence também ao sistema de transporte de aminoácidos aromáticos, enquanto que as

substâncias transportadas pelo MCTs 5-7, MCT9 e MCTs 11-14 ainda são desconhecidas (NAGAI *et al.*, 2010). Deste modo, a expressão dos quatro primeiros transportadores tem sido estudada em oócitos e embriões de camundongos e humanos. As únicas descrições da presença do *Mct1* em embriões bovinos foram realizadas no nosso grupo de trabalho, nos quais a expressão de transcritos do *Mct1* foi identificada por RT-PCR semiquantitativo em mórulas e embriões bovinos produzidos *in vitro* (LINO *et al.*, 2008; AREND *et al.*, 2009).

A detecção de um sistema de transporte que controlava a captação de piruvato foi observada em oócitos (LEESE e BARTON, 1984) e embriões de camundongos (LEESE e BARTON, 1984; GARDNER e LEESE, 1988). Os autores observaram que a captação variava em função da concentração de piruvato presente no meio e diminuía ao usar alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHC). Essa substância é conhecida por impedir a difusão facilitada de piruvato e lactato, atuando como um bloqueador competitivo dos MCTs (GIBB *et al.*, 1997; MEREDITH *et al.*, 2002; LAM *et al.*, 2010). Ao utilizarem o CHC, Gibb *et al.* (1997) demonstraram que o controle do pH em embriões murinos de 2-células era influenciado por um sistema de co-transporte do lactato e  $H^+$ . Através de testes químicos, estes autores observaram que o piruvato era transportado pelo mesmo sistema do lactato. Os autores demonstraram que esse sistema de transporte era compatível com o *Mct1*, ao investigarem a sensibilidade através do uso de bloqueadores não competitivos e competitivos de *Mct1*.

A presença dos mRNAs de *Mct1-3* em oócitos e embriões de camundongos e a atividade desses transportadores foi analisada durante o desenvolvimento pré-implantação em relação a regulação do pH e no transporte de lactato e piruvato (HARDING *et al.*, 1999). Subseqüentemente, Hérubel *et al.* (2002) identificaram o mRNA do *Mct1*, *Mct2* em oócitos e em embriões pré-implantação humanos e murinos, mas o mRNA do *Mct4* somente estava presente em oócitos e embriões de camundongos.

Os estudos iniciais sobre o transporte de lactato e piruvato através da membrana plasmática foram realizados usando hemácias, por serem células facilmente obtidas, e permitirem a identificação das proteínas responsáveis por esse transporte (POOLE e HALESTRAP, 1993). Dos Mcts caracterizados,

somente o Mct1 ou Slc16A1 é expresso nessas células e mostrou um mecanismo de transporte ordenado e seqüencial. O transporte do lactato via Mct inicialmente envolve a ligação de um próton ao transportador, seguido por um ânion lactato, que serão translocados pela membrana e subseqüentemente liberados. Esse processo é bidirecional, com o equilíbrio sendo alcançado quando a razão entre as concentrações de lactato dentro e fora da célula é igual à razão entre as concentrações de íon hidrogênio fora e dentro da célula  $\{[\text{lactato}]_{\text{dentro}} / [\text{lactato}]_{\text{fora}} = [\text{H}^+]_{\text{fora}} / [\text{H}^+]_{\text{dentro}}\}$ . O ciclo de translocação termina quando o carreador livre retorna para o outro lado da membrana (BRUIJNE *et al.*, 1983).

O Mct1 pode transportar uma ampla gama de monocarboxilatos de cadeia curta, sendo que a afinidade aumenta quando o comprimento da cadeia aumenta de dois para quatro átomos de carbono. Muitos dos monocarboxilatos de ocorrência natural, como o piruvato, o lactato, o acetoacetato e o  $\beta$ -hidroxibutirato estão incluídos nessa categoria. Monocarboxilatos de cadeia longa também podem se ligar aos Mcts, mas como não são facilmente liberados após a translocação podem atuar como potentes inibidores, a exemplo do CHC (HALESTRAP e PRICE, 1999).

O Mct1 possui maior afinidade pelo piruvato do que pelo lactato (HALESTRAP e PRICE, 1999). Como o piruvato é necessário para as primeiras clivagens em embriões de camundongos (BIGGERS *et al.*, 1967; LEESE e BARTON, 1984), Harding *et al.* (1999) e Jansen *et al.* (2006) sugeriram que o *Mct1* seria a isoforma predominante durante o desenvolvimento embrionário inicial de camundongos. Além disso, atuaria na regulação intracelular do lactato, do balanço de nutrientes, do pH e estado redox (HARDING *et al.*, 1999; JANSEN *et al.*, 2006).

O Mct2, ou Slc16A7, apresenta forte afinidade por monocarboxilatos, sendo esta 10 vezes maior que a do MCT1 (HARDING *et al.*, 1999). Sua afinidade é maior pelo piruvato do que pelo lactato, do mesmo modo que o Mct1 (HALESTRAP e PRICE, 1999). O Mct2 está presente em células onde uma captação rápida, num ambiente com concentrações baixas pode ser necessária, tais como os túbulos proximais dos rins, neurônios, miócitos cardíacos e cauda dos espermatozoides (HARDING *et al.*, 1999).

A localização distinta dos transportadores Mct1 e Mct2 em embriões de camundongos sugeriu que esses transportadores possuam funções diferentes (JANSEN *et al.*, 2008). Em embriões murinos próximos do momento da clivagem, o Mct2 estava presente na membrana plasmática, o que poderia ser justificado pela necessidade do piruvato como fonte nutritiva neste período. Em estádios mais tardios, esse transportador se encontrava na superfície apical de blastômeros em mórulas e no trofoblasto apical de blastocistos. Sabe-se que os blastocistos predominantemente utilizam glicose via glicólise, resultando no acúmulo do ácido láctico nas células e na blastocele. A localização do Mct2 observada nesse estágio do desenvolvimento poderia facilitar uma troca mais rápida de monocarboxilatos e prótons para a regulação do pH (JANSEN *et al.*, 2008).

Em trabalhos anteriores do mesmo grupo (JANSEN *et al.*, 2006), os autores haviam correlacionado a localização da proteína Mct1 na massa celular interna (MCI) de blastocistos de camundongos com a capacidade desse transportador, no momento da implantação, em otimizar uma troca rápida de piruvato/lactato com a circulação materno-fetal. A observação da presença da proteína Mct1 na placenta de camundongos corroborou com a possível função do Mct1 na circulação fetal (NAGAI *et al.*, 2010)

A proteína Mct1 é a isoforma predominante responsável pela regulação do pH no desenvolvimento embrionário inicial do camundongo (HARDING *et al.* 1999). A atividade da Mct1 e da Mct2 foi distinguida com base em suas sensibilidades químicas diferenciais. Deste modo, foi observado que o transporte de lactato nos embriões de 2- e 8-células, além de blastocistos, foi completamente inibido, sugerindo que o transportador ativo era realizado pela Mct1, embora o mRNA do *Mct2* tenha sido detectado (HARDING *et al.* 1999).. O autor sugere que as proteínas do Mct2 não são produzidas antes do estágio de blastocisto. Além disso, em outros tecidos, onde o MCT1 e MCT2 são co-expressados (fígado, rim, cérebro, testículo), eles mostram localizações distintas, sugerindo funções diferentes (HALESTRAP e PRICE, 1999). Deste modo, são necessárias mais informações para o esclarecimento das diferentes funções entre esses dois transportadores durante o desenvolvimento embrionário inicial.

A presença do mRNA do *MCT1* e *MCT2* em ócitos imaturos (VG) e maduros (MII) de humanos e camundongos foi detectada através da técnica de RT-nested PCR (HÉRUBEL *et al.*, 2002). A expressão dos transcritos dessas duas isoformas também foi observada ao longo do desenvolvimento embrionário inicial (2-, 4-, 8-e 16-células, mórula e blastocisto). Os resultados para humanos estão de acordo com a sugestão feita por Butcher *et al.* (1998) sobre a presença de transportadores de monocarboxilatos em embriões humanos nos estádios iniciais (2-, 4-, 6-, 8-células).

O MCT3, ou SLC16A8 não é amplamente distribuído como o MCT1, sendo encontrado somente no epitélio pigmentar da retina e no plexo coróide (PHILP *et al.*, 1998; HALLESTRAP e PRICE, 1999; PHILP *et al.*, 2001). Devido a sua característica de possuir maior afinidade no transporte do lactato que no do piruvato, o MCT3 tem sido considerado importante no controle do pH e nutrientes no epitélio pigmentar da retina (PHILP *et al.*, 1998) e na manutenção das concentrações de lactato no fluido-cérebro-espinhal através de seu transporte para fora do plexo coróide (PHILP *et al.*, 2001). Essas propriedades do MCT3, mais o fato de blastocistos metabolizarem glicose principalmente via glicólise, assim como a retina, levou alguns autores a propor que essa isoforma poderia ter uma função similar em embriões com aquela observada na retina (HÉRUBEL *et al.*, 2002; JANSEN *et al.*, 2006).

A presença de transcritos para o gene *Mct3* em embriões de camundongos gerou resultados conflitantes. Harding *et al.* (1999) demonstraram a presença dessa isoforma em oócitos imaturos e durante o desenvolvimento embrionário inicial de camundongos por RT-PCR seguido da confirmação da identidade de seus transcritos por seqüenciamento. Contudo, Hérubel *et al.* (2002) não detectaram a presença do mRNA do *MCT3* por RT-PCR em oócitos ou embriões de humanos ou camundongos. Esse último resultado está em acordo com Jansen *et al.* (2006) que não detectaram a presença do mRNA por RT-PCR ou da proteína *Mct3* por *western blotting* durante o mesmo período do desenvolvimento em camundongos. Outros trabalhos na tentativa de esclarecer um possível papel ou a simples presença desse gene em oócitos ou embriões, ainda não foram descritos.



Assim como o MCT3, o MCT4 (ou SLC16A3) é um transportador com baixa afinidade por piruvato, mas com alta afinidade e preferência por lactato, contrastando com os MCT1 e MCT2. O MCT4 é predominante em tecidos onde o metabolismo glicolítico é mais intenso, como a musculatura branca, células tumorais e leucócitos (FOX *et al.*, 2000). Segundo Hérubel *et al.* (2002) isso faz desse transportador um forte candidato para a regulação da acidose durante o desenvolvimento embrionário, através do efluxo de prótons associados com o lactato.

Durante o desenvolvimento embrionário inicial, a expressão de transcritos de *MCT4* foi diferente entre camundongos e humanos (HÉRUBEL *et al.*, 2002). Enquanto presente em oócitos em estágio VG e MII, e em embriões (2-, 4-, 8-, 16-células, mórula e blastocisto) de camundongos, não foi possível a identificação de transcritos de *MCT4* em oócitos ou embriões pré-implantação de humanos, quando avaliados no mesmo estágio. A não expressão desse gene poderia justificar, em parte, a baixa capacidade desses embriões em regular a acidose citosólica, além de poder explicar porque o lactato é importante no meio de CIV de embriões de camundongos, mas não no de humanos. Embriões de camundongos podem usar o lactato para a regulação intracelular do pH e para a manutenção da razão interna de NAD<sup>+</sup>/NADH, via transporte de MCT; em humanos, sem o MCT4, o efluxo do lactato é certamente limitado e uma alta concentração no meio de cultura poderia levar ao seu acúmulo no citoplasma com conseqüente acidificação intracelular e, assim, modificar a razão NAD<sup>+</sup>/NADH do embrião (HÉRUBEL *et al.*, 2002).

## **2.6 Fatores secretados por oócitos**

Historicamente, o controle da foliculogênese foi atribuído somente a fatores endócrinos de atuação direta no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Esse controle endócrino é mediado por hormônios específicos: hormônios esteróides, citocinas e prostanóides. Os eventos que ocorrem durante o ciclo estral são regulados basicamente por uma interação hormonal do GnRH, FSH, LH, estradiol, progesterona e prostaglandinas (PAULINE e MELO, 2010).

Atualmente, novas pesquisas têm focado no controle realizado por sinais intrafoliculares, os quais têm mostrado desempenhar papel decisivo no desenvolvimento folicular e na coordenação entre o oócito e as células foliculares através de um processo de sinalização parácrina (HUSSEIN *et al.*, 2006; OTSUKA *et al.*, 2011).

Dentro do ovário, enquanto o folículo cresce e o antro é formado, o oócito secreta fatores de crescimento que atuam na diferenciação das células da granulosa em dois subtipos distintos, CCs e células da granulosa mural, as quais se tornam fenotipicamente e funcionalmente distintas (EPPIG *et al.*, 2005). Segundo Sugiura *et al.* (2005), o oócito promove a chave metabólica necessária para a sua própria maturação meiótica.

Entre os fatores secretados pelo oócito, dois membros da superfamília dos fatores de transformação do crescimento beta (TGFB), o Gdf9 e o Bmp15, mostraram ser fundamentais durante a foliculogênese e na maturação oocitária (ELVIN *et al.*, 1999; HUSSEIN *et al.*, 2006; OTSUKA *et al.*, 2011). O Gdf9 é necessário para otimizar o microambiente oocitário, o crescimento folicular e atresia, a ovulação, a fecundação e a reprodução normal, além de induzir a expressão de genes da Has2, da ciclooxygenase 2 (Cox2) e da prostaglandina nas CCs, que são essenciais para a sua expansão durante a maturação do oócito e antes da ovulação (ELVIN *et al.*, 1999). O Bmp15, também conhecido como Gdf9B, tem papel fundamental na regulação do desenvolvimento folicular em mamíferos (GALLOWAY *et al.*, 2000). Esse fator estimula a proliferação das CG e modula a expressão de hormônios esteróides, havendo um pico na expressão da Bmp15 no momento da expansão das CCs, que ocorre após a maturação do oócito (GALLOWAY *et al.*, 2000). A manutenção de níveis adequados de Bmp15 e Gdf9 em oócitos é essencial para o desenvolvimento folicular apropriado e, conseqüentemente, uma eficiente fertilidade da fêmea (ELVIN *et al.*, 1999; GALLOWAY *et al.*, 2000).

A presença de transcritos de *Bmp15* e *Gdf9* foi demonstrada em oócitos de roedores, suínos, ovinos, caprinos e bovinos (McNATTY *et al.*, 2005; HUSSEIN *et al.*, 2006; HOSOE *et al.*, 2011, CRAWFORD e McNATTY, 2012), contudo a expressão desses genes em CCs tem gerado resultados conflitantes.

O perfil de expressão gênica e das proteínas Bmp15 e Gdf9 em oócitos e CCs de vacas adultas e terneiras foi detectado através de qPCR (HOSOE *et al.*, 2011). Houve menor expressão do *Gdf9* e *Bmp15* nas CCs de terneiras quando comparado a vacas adultas, e expressão similar de transcritos de *Bmp15* em oócitos. Entretanto, o *Gdf9* mostrou maior expressão nos oócitos de terneiras quando comparado com oócitos de vacas adultas. Os autores sugeriram que a baixa competência de desenvolvimento de oócitos de terneiras em relação a oócitos de vacas adultas poderia ser decorrente de uma deficiência da Bmp15 em CCs, enquanto esclarecem que são necessárias mais investigações entre o Gdf9 e a competência oocitária em terneiras.

Ao realizar qPCR, Crawford e McNatty (2012), obtiveram resultados diferentes dos obtidos por Hosoe *et al.* (2011) na expressão do *Gdf9* e *Bmp15* em CCs de camundongos, ratos, suínos, ovelhas, vacas e veados. Os autores não observaram níveis detectáveis de mRNA desses dois fatores em CCs de nenhuma das espécies testadas. Eles consideram que o ponto chave que determina a detecção dessa expressão é a separação cuidadosa das CCs a partir dos CCOs, evitando a contaminação por material proveniente dos oócitos.

O papel da proteína recombinante Gdf9 na regulação de vários genes produzidos pelos ovários de camundongos, fundamentais na foliculogênese e na expansão das CCs foi analisado através de um sistema de cultura de células da granulosa e RT-PCR semiquantitativo (ELVIN *et al.*, 1999). Foi demonstrado que o Gdf9 pode se ligar a receptores das células da granulosa e regular a expressão de um grande número de genes. Assim, o Gdf9 mostrou induzir a síntese de mRNA da Has2, da Cox2 e da proteína reguladora aguda (Star) e suprimir a síntese do mRNA do ativador de plasminogênio uroquinase (uPA). Deste modo, o Gdf9 atuou como um fator parácrino na regulação de várias enzimas fundamentais das células da granulosa envolvidas na expansão das CCs e na manutenção de um microambiente ótimo para o oócito, processos que são essenciais para a ovulação normal, fecundação e reprodução da fêmea.

As proteínas Bmp15 e Gdf9 aumentaram a competência do desenvolvimento embrionário, fornecendo evidências que os OSF teriam uma influência direta no desenvolvimento da competência durante a MIV de CCOs bovinos (HUSSEIN *et*

Os CCOs foram co-cultivados com oócitos desnudos ou tratados com as proteínas recombinantes Bmp15 e Gdf9. O co-cultivo com os oócitos desnudos não afetou a taxa de clivagem, mas aumentou a proporção de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto eclodido, de 39% para 51%, quando não co-cultivados. As proteínas Bmp15 e Gdf9 sozinhas ou em combinação, aumentaram a proporção de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto eclodido de 41% (controle) para 58% e de 50% (controle) para 55%, respectivamente.

Os OSF, Gdf9 e Bmp15 demonstraram cooperar de um modo sinérgico e de uma maneira espécie-específica para influenciar a proliferação das CG de ovelhas e bovinos sob condições *in vitro* (MCNATTY et al., 2005). Os autores avaliaram os efeitos dessas proteínas separadamente ou juntas na função das células da granulosa. As proteínas recombinantes utilizadas foram construídas com base na seqüência de ovinos e camundongos. Os resultados indicam que os efeitos dessas proteínas variam conforme a espécie de origem do fator de crescimento. Entretanto, os efeitos do Gdf9 e Bmp15 foram freqüentemente cooperativos e nem sempre apresentavam a mesma função quando juntos do que aquela observada quando separados.

Com base na teoria que os genes *Gdf9* e *Bmp15* poderiam ser co-regulados, Crawford e McNatty (2012) questionaram se a razão entre *Gdf9* e *Bmp15*, em diferentes espécies, poderia estar relacionada com a capacidade de um oócito em maturar e ser ovulado. O número de folículos que ovula é criticamente dependente do número de células da granulosa que adquirem receptores para o LH durante os últimos estádios do crescimento folicular. O LH, por sua vez, atua na expansão das CCs levando a modificações importantes para a ocorrência de maturação (LONERGAN et al., 2003). Segundo Crawford e McNatty (2012), a compreensão de como e se esses fatores cooperam entre si poderia ajudar a esclarecer os mecanismos que regulam as diferenças no número de oócitos ovulados por ciclo entre as espécies com diferentes tipos de ovulação. Enquanto mamíferos como a vaca e o veado normalmente ovulam somente um oócito por ciclo, outras espécies multi-ovulatórias, como camundongos, ratos e suínos, podem ovular 10 ou mais oócitos por ciclo. Crawford e McNatty (2012) observaram que os níveis de expressão da razão *Gdf9/Bmp15* em ODs estavam

significativamente correlacionados dentro das espécies testadas (camundongo, rato, suíno, ovino, bovino e veado), indicando que esses genes são co-regulados. Além disso, essa razão foi significativamente diferente entre cada espécie testada, indicando um mecanismo que pode estar atuando na regulação da taxa de ovulação. No entanto, como não houve relação entre essa razão e o tipo de ovulação (mono ou multi-ovulatório), esse mecanismo precisa ser ainda melhor compreendido (CRAWFORD e MCNATTY, 2012).

## 2.7 Ácido hialurônico sintase 2 (HAS2)

No folículo pré-ovulatório bovino, o *cumulus oophorus* expande consideravelmente quando as CCs são induzidas a sintetizar grandes quantidades de ácido hialurônico. O ácido hialurônico (HA) interage com componentes específicos da matriz, formando uma matriz extracelular altamente hidratada e viscosa nos espaços intercelulares, resultando em um aumento de volume de 20 a 40 vezes do CCOs. Essa expansão do CCOs pode facilitar a extrusão do oócito no momento da ovulação. Além disso, a matriz extracelular rica em ácido hialurônico pode facilitar a fecundação através da estabilização da zona pelúcida (TIRONE *et al.*, 1997).

O HA é sintetizado pela enzima Has. Em mamíferos, a família Has consiste de três isoenzimas, a Has1, a Has2 e a Has3 (SCHOENFELDER e EINSPANIER, 2003). Fulop *et al.* (1997) sugeriu que a grande quantidade de HA produzida pelas CCs durante a expansão é controlada ao nível de transcrição pelo mRNA da Has2. Esse mRNA, ausente inicialmente nas CCs no CCO durante a fase pré-ovulatória, aparece logo após a administração do hCG, ou pico do LH, e não está mais presente no momento que termina a síntese do HA (SAITO *et al.*, 2000).

Em CCOs de camundongos, a expressão do mRNA de *Has2* demonstrou estar sob influência da proteína recombinante Gdf9. Elvin *et al.* (1999), avaliaram a relação entre a síntese do mRNA do *Has2* pelas CCs murinas e a exposição a diferentes concentrações de Gdf9 e demonstraram que o Gdf9 atua como um fator

parácrino na regulação da expressão do *Has2*. Contudo, a proteína recombinante Bmp15 não estimulou ou suprimiu a expressão do *Has2*.

Em CCOs bovinos, o aumento da transcrição do *Has2* parece ser um pré-requisito importante para o início dos efeitos mediados pelo HA no final do desenvolvimento oocitário e nas interações oócito-espermatozoide (SCHOENFELDER e EINSPANIER, 2003). Em humanos, a expressão do gene *HAS2* foi maior em oócitos que se desenvolveram em embriões de alta qualidade, demonstrando a existência de uma correlação da expressão de *HAS2* com as características morfológicas dos embriões em desenvolvimento (MCKENZIE *et al.*, 2004). Esses argumentos sugerem o *Has2* como um potente marcador de competência oocitária (ASSIDI *et al.*, 2008).

### 3 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Artigo

##### **Gene Expression of Monocarboxylate Transporters and Oocyte-secreted Factors in Bovine Cumulus-oocyte Complexes Selected by Brilliant Cresyl Blue**

(Expressão Gênica de Transportadores de Monocarboxilatos e de Fatores Secretados por Oócitos em Complexos *Cumulus*-oócitos Bovinos Seleccionados pelo Teste BCB)

Eliana Franco Lopes<sup>1,2</sup>, Lis Santos Marques<sup>1</sup>, Roberta Gomes Duranti<sup>2</sup>, Alexandre Tavares Duarte de Oliveira<sup>3</sup>, Rui Fernando Felix Lopes<sup>2</sup> and José Luiz Rodrigues<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

## Contents

Oocyte selection based on brilliant cresyl blue (BCB) staining test has been successfully used to differentiate between competent and incompetent bovine oocytes. Here, the expression of genes involved in transport of monocarboxylates (*Mct1-4*) and oogenesis specific genes (*Bmp15*, *Gdf9* and *Has2*) in BCB selected immature and mature bovine cumulus-oocyte complexes (COC) was evaluated. Immature COCs morphological appropriate were (1) stained with 26 mM BCB for 90 min before IVM, (2) exposed to same incubation conditions as stained COCs, but without BCB (holding group) or (3) transferred into a maturation medium immediately after morphological selection (control group). mRNA expression was investigated by RT-PCR in COCs before and after IVM. No relationship was observed in the relative expression of *Has2*, *Gdf9*, *Bmp15* or *Mct1*, 2 and 4 transcripts between BCB- and BCB+ COCs. Transcripts analysis showed that *Gdf9* and *Bmp15* in BCB+, BCB- and holding groups were up-regulated ( $p < 0.05$ ) before IVM, while *Has2* was up-regulated ( $p < 0.01$ ) after IVM in the control group. Others genes remained stable during maturation (*Mct1*, 2 and 4). The increase in relative abundance of some transcripts during IVM may be attributed to incubation conditions during the BCB test. Our results showed, for the first time, *Mct1*, 2 and 4 expression in bovine COCs. *Mct1* and *Mct4* transcripts were present in denuded oocytes and cumulus cell, while *Mct2* was detected only in *cumulus* cells. These differences between the three isoforms in localization suggest unique roles for each in monocarboxylate transport during maturation.



## **Introduction**

It has been shown that oocytes screened based on BCB staining differ in their developmental potential to reach blastocyst stage (Torner et al. 2008; Silva et al. 2011). Moreover, oocytes screened with BCB staining were reported to differ in nuclear and cytoplasmic maturation markers like polar body identification and organization of cortical granule and mitochondria (Silva et al. 2011). BCB is a vital blue dye, which is used to determine the intracellular activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), an enzyme synthesized in growing oocytes whose activity nevertheless decreases in fully developed oocytes. The cytoplasm of these oocytes is blue (BCB+), while growing oocytes exhibit a colorless cytoplasm (BCB-). However, little is known about the molecular differences between BCB + and BCB- oocytes (Torner et al. 2008).

Early research demonstrated that energy metabolism in cumulus-oocyte complexes (COCs) is closely related to oocyte developmental competence and subsequent embryonic development (Khurana et al. 2000). During preimplantation development, pyruvate (but not glucose) can support the first cleavage division of the embryo as the major energy substrate (Biggers et al. 1967; Geshi et al. 2000). However, there is an absolute requirement for exposure to glucose prior to the eight-cell stage for blastocyst formation to occur (Chatot et al. 1994). This glucose exposure facilitates the expression of monocarboxylate-proton cotransporters (Mct or Slc16) in mouse embryos (Jansen et al. 2006).

Transport of monocarboxylates across the plasma membrane is catalyzed by MCTs, a family of proteins that mediate the diffusion of the monocarboxylate ion with a proton. Although 14 Mct isoforms have so far been identified in mammals

(Meredith and Christian, 2008), only *Mct1* (Slc16a1), *Mct2* (Slc16a7), *Mct3* (Slc16a8) and *Mct4* (Slc16a3) have been analyzed in detail concerning substrate affinities and inhibitors (Hérubel et al. 2002). The presence of *Mct1*, *Mct2* and *Mct4* isoforms was detected in oocytes at the germinal vesicle (GV) and metaphase II (MII) stages and throughout preimplantation development in mice (Harding et al. 1999; Hérubel et al. 2002). In human oocytes and embryos *MCT1* and *MCT2* transcripts were shown to be present, but *MCT4* was not detectable (Hérubel et al. 2002). Subsequently, kinetic changes in monocarboxylate transport activity in mouse embryos cultured with or without glucose were demonstrated (Jansen et al. 2006). While mRNA expression for *Mct3* was reported during preimplantation development in mice (Harding et al. 1999), other results confirm that *MCT3* is absent during this period of development in human and mouse (Hérubel et al. 2002; Jansen et al. 2006). *Mct3* has been detected only in the basal membrane of the retinal pigment epithelium (RPE), consistent with a role in regulating intracellular lactate levels and pH (Philp et al. 2001).

A long-established tenet of COC energy metabolism is that the oocyte itself has a poor capacity to utilize glucose (Biggers et al. 1967), and that the *cumulus* cells (CCs) metabolize the bulk of the glucose consumed by COCs to supply metabolic intermediates to the oocyte (Cetica et al. 2003). Hence, it has become clear that the oocyte is reliant on CCs to metabolize glucose to intermediates such as pyruvate, the preferred substrate of the oocyte. Also, there is an important bi-directional communication axis between the oocyte and somatic cells. Paracrine factors secreted by oocytes (OSF), in particular growth differentiation factor 9 (Gdf9) and bone morphogenetic protein 15 (Bmp15) are the object of

considerable research interest. Gdf9 and Bmp15 regulates many fundamental processes that contribute to oocyte developmental competence during *in vitro* maturation such as CCs proliferation, mucification and expansion (Elvin et al. 1999). Importantly, it has been demonstrated that glycolysis and amino acid uptake in CCs and transfer of these substrates to the oocyte are regulated by OSFs (Eppig et al. 2005).

*In vitro* studies demonstrate that recombinant Gdf9 is the oocyte-derived factor that induces *Has2* synthesis in mouse CCs (Elvin et al. 1999). *Has2* was considered an important prerequisite for the triggering of HA-mediated effects during maturation and as sperm-egg interactions (Schoenfelder and Einspanier 2003). In light of these observations, and the fact that *HAS2* is differentially expressed in the CCs of competent human COCs (McKenzie et al. 2004), it was suggested that *Has2* would likely be associated with molecular process of acquisition of competence, becoming useful as a potential marker of oocyte competence (Assidi et al. 2008).

Thus, the aim of this study was to determine the relative expression of *Bmp15*, *Gdf9*, *Has2*, *Mct1*, 2, 3 and 4 genes in immature or mature bovine oocytes with different classification after BCB staining.

## **Materials and methods**

### **Culture Media and Solutions**

Unless otherwise stated, all plasticware and culture dishes used were obtained from Nunc, Roskild, Denmark, and all chemicals and medium were

purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. Ltd, which will be identified according to their catalog numbers.

### **Oocyte recovery and BCB staining test**

COCs were obtained by aspiration of follicles 3-8 mm in diameter of slaughterhouse ovaries collected from a local abattoir. Only oocytes with a compact cumulus and homogeneous cytoplasm were used. After selection, the COCs were exposed to 26  $\mu$ M of BCB (B-5388), diluted in mDPBS supplemented with 0.4% BSA (A-7888) and incubated for 90 min at 38.5°C in humidified air. Following BCB exposure, the COCs were then transferred to mPBS with 0.4% BSA and classified into two groups: the oocytes with colored (blue) cytoplasm (BCB+ group) and oocytes with colorless cytoplasm (BCB- group). A group of the COCs exposed to the same conditions as stained COCs, but without BCB, was used as holding group. Control COCs were washed in maturation medium and placed in culture immediately after morphological selection.

### ***In vitro* maturation**

All groups (BCB+, BCB-, control and holding group) were matured in 100  $\mu$ L drops containing TCM199 (M-2520) supplemented with 2.2 mg/mL of sodium bicarbonate, 0.022 mg/mL of sodium pyruvate, 0.05 mg/mL of gentamicin sulfate, 0.03 IU/mL of luteinizing hormone (Chorulon®, Intervet Schering-Plough, SP, Brazil), 0.5  $\mu$ g/mL follicle-stimulating hormone (Folltropin®, Vetrepharm Inc., Ontario, Canada), 10 ng/mL of epidermal growth factor (EGF, E4127) and 10% fetal bovine serum (Nutricell, Nutrientes Celulares, SP, Brazil). Groups with 10

COCs were matured for 24 h in a humidified atmosphere at 38.5°C and 5% CO<sub>2</sub> in air. Before and after IVM, COCs from each group were washed three times in 0.1% PVA in mPBS and immediately frozen in liquid nitrogen for subsequent RNA extraction.

### **Oocyte denudation**

Despite the results for the COC as a whole unit, expression levels for *Mct1*, *Mct2* and *Mct4* in denuded oocytes (DOs) or CCs were observed. The surrounding CCs were physically separated by gentle pipetting from the oocytes. Separation of CCs was carefully checked under a stereomicroscope. Cumulus-free oocytes and the corresponding CCs were washed ten times in mPBS to ensure no CCs would be frozen with the oocytes.

### **Eye dissection**

For control of *Mct1* and *Mct3* mRNA expression in COCs, a positive control was performed with mRNA from RPE. Eyes cups were obtained postmortem from an abattoir and separated into anterior and posterior segments with a razor blade. The posterior eye cup was placed in PBS and the RPE was peeled off the choroid with fine forceps. RPE was stored in liquid nitrogen until use.

### **RNA extraction**

mRNA isolation of immature COCs, matured COCs, DOs and CCs was performed at four different points during the whole experiment. (1) A total of eight pools, each containing 10-20 immature COCs from each group, (2) eight

pools, each containing 8-20 matured COCs from each group, (3) three pools of ten DO collected before and three pools of ten DO after IVM and (4) three pools of ten CCs collected before and three pools of ten CCs after IVM were used for mRNA isolation using Dynabeads mRNA DIRECT kit (Dyna, Oslo, Norway) as described elsewhere (Oliveira et al. 2006) with modifications. Briefly, total RNA from COCs or CCs was isolated using the TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Prior to RNA isolation, 0.1 µg of rabbit globin RNA (BRL, Gaithersburg, MD, USA) per sample was added as an internal standard. RNA from bovine RPE was prepared using TRIzol<sup>®</sup> reagent and Dynabeads oligo (dT)<sub>26</sub> following the manufacturer's instructions.

### **RT-PCR**

Each sample was reverse transcribed in a total volume of 20 µL containing 4 µL 5X First Strand Buffer (375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM Tris-HCl pH 8.3, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 mM dithiothreitol (DTT, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.5 µg Oligo (dT)<sub>12-18</sub> primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1.25 mM of each dNTP (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 20 IU RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 100 IU M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The thermal cycling conditions included initial sample incubation at 37°C for 60 min, followed by heating at 95°C for 10 min.

The PCR assay was performed with 0.1- 0.2 COCs or 0.1 CCs or 0.25 DO equivalents (percentage of the volume from the RT reaction employing the number of COCs in a defined volume) in a final volume of 20 µL of 1 x PCR

buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, Invitrogen, São Paulo, Brazil), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 1.25 mM of each dNTP (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 1 IU Platinum®Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 200 pmol of each primer using a thermocycler (PTC-100 MJ Research, Watertown, MA, USA). The primers to *Mct1*, *Mct2*, *Mct3*, *Mct4*, *Gdf9*, *Bmp15* and *Has2* are listed in Table 1. Primers were modified according to the GenBank database, and their specificity was tested using a BLAST analysis against the genomic NCBI database. All primers were commercially synthesized (Life Technologies, Rockville, MD, USA). After an initial denaturation at 94 °C for 1 min, 35 cycles of amplification with a thermocycler (PTC-100 MJ Research, Watertown, MA, USA) were performed under the following conditions: 94 °C for 30 sec, 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min followed by a final extension at 72 °C for 2 min (an optimization was previously carried out for each distinct gene product). The PCR products were separated by electrophoresis and the final semiquantitative analysis was done as described elsewhere (Oliveira et al. 2006).

### **Statistical analysis**

Data of mRNAs relative abundance of *Mcts* (1-4), *Gdf9*, *Bmp15* and *Has2* in the COCs, oocytes and cumulus cells were analyzed using the SPSS software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). After testing for normality and equal variance using the Levene median test, a multi-factor ANOVA analysis followed by multiple comparisons (Tukey's test) was performed. To analyze gene

expression in each group of COCs, the factors were gene and maturation stage.

Differences with a probability of 0.05 or less were considered significant.

Table 1. Details of primers used in RT-PCR analysis.

Gene	Sequence (5' - 3') and position in sequence	Annealing temperature (°C) and embryo equivalent	Product size (bp)	Reference and Genbank accession no.
<i>Mct1</i> ( <i>Slc2a1</i> )	F: TGGCATCTTGTTCAGGCAGTGG 472-492 R:CCAGCCACACAGCAGTTTAATAG 771-749	55 x 0.2	300	Kirat et al, 2007 NM_001037319
<i>Mct2</i> ( <i>Slc16a7</i> )	F:CTCATGGACCTTGTTGGTGC 1373-1392 R:CACTGGGACTTTGAGATGTCTTC 1664-1642	55 x 0.2	292	Graham et al. 2007 NM_001076336.2
<i>Mct3</i> ( <i>Slc16a8</i> )	F:TGGACGCGCTCAAGAACTACGAGAT 1196-1220 R:GGGCTTGGCACCTCCACG 1439-1422	60	244	Kirat et al. 2009 XM_002687932.1
<i>Mct4</i> ( <i>Slc16a3</i> )	F:GACTACGGTG GGCTGGTGG TC 1149-1168 R:GCCTTCAG GAA CTG CTC CAC CTC 1522-1502	55 x 0.1	374	Meredith et al. 2002 NM_001109980.1
<i>Has2</i>	GCTTGACCCAGC ATCATCTGTGG 1192-1214 CTGGTTTAACCATCTGAGATATT 1594-1572	55 x 0.1	403	Usui et al. 1999 NM_174079
<i>Gdf9</i>	F:AGAAGCTGCTGAGGGTGTAAGATT3 949-972 R:AAGCAATTGAGCCATCAGGC 1349-1330	55 x 0.1	401	Hosoe et al. 2011 NM_174681.2
<i>Bmp15</i>	F:CAAGCAGGCAGTATTGCATCTGAA 808-831 R:TCACCTGCATGTGCAGGACTGGGC 1185-1162	55 x 0.1	378	Hosoe et al. 2011 NM_001031752.1
<i>Hba</i>	F:GCAGCCACGGTGGCGAGTAT 92-111 R:GTGGGACAGGAGCTTGAAAT 348-329	55 x 0.1	257	Cheng et al. 1986 NM_001082389



## Results

### Activity of G6PDH in immature bovine COCs

A total number of 716 immature COCs were subjected to the BCB test. The mean rates of the oocytes with low (BCB+) and high (BCB-) activity of G6PDH were  $76.4\% \pm 3.30$  and  $23.6\% \pm 3.30$ , respectively.

### *Mct1-4* expression in immature and matured COCs

Transcripts encoding for *Mct1*, *Mct2* and *Mct4* were detected in immature (Fig. 1a) and matured COCs (Fig. 1b) of all groups, while *Mct3* mRNA was not detected in COCs using RT-PCR. No difference ( $p > 0.05$ ) was verified in relative expression of *Mct1*, *Mct2* and *Mct4* among groups (control, BCB-, BCB+ and holding) before or after IVM. Similarly, no significant difference was found on gene expression when comparing matured with immature groups. Figure 2 shows the amplicons of *Mct1*, *Mct2* and *Mct4* with 300 bp, 292 bp and 374 bp, respectively.

### Expression of *Mct1* and *Mct3* mRNA in bovine RPE

mRNA from microdissected bovine RPE was subjected to RT-PCR using primers for *Mct1* and *Mct3*. The 300 bp and 244 bp PCR products for *Mct1* and *Mct3* were detected in RPE, respectively (data not shown).

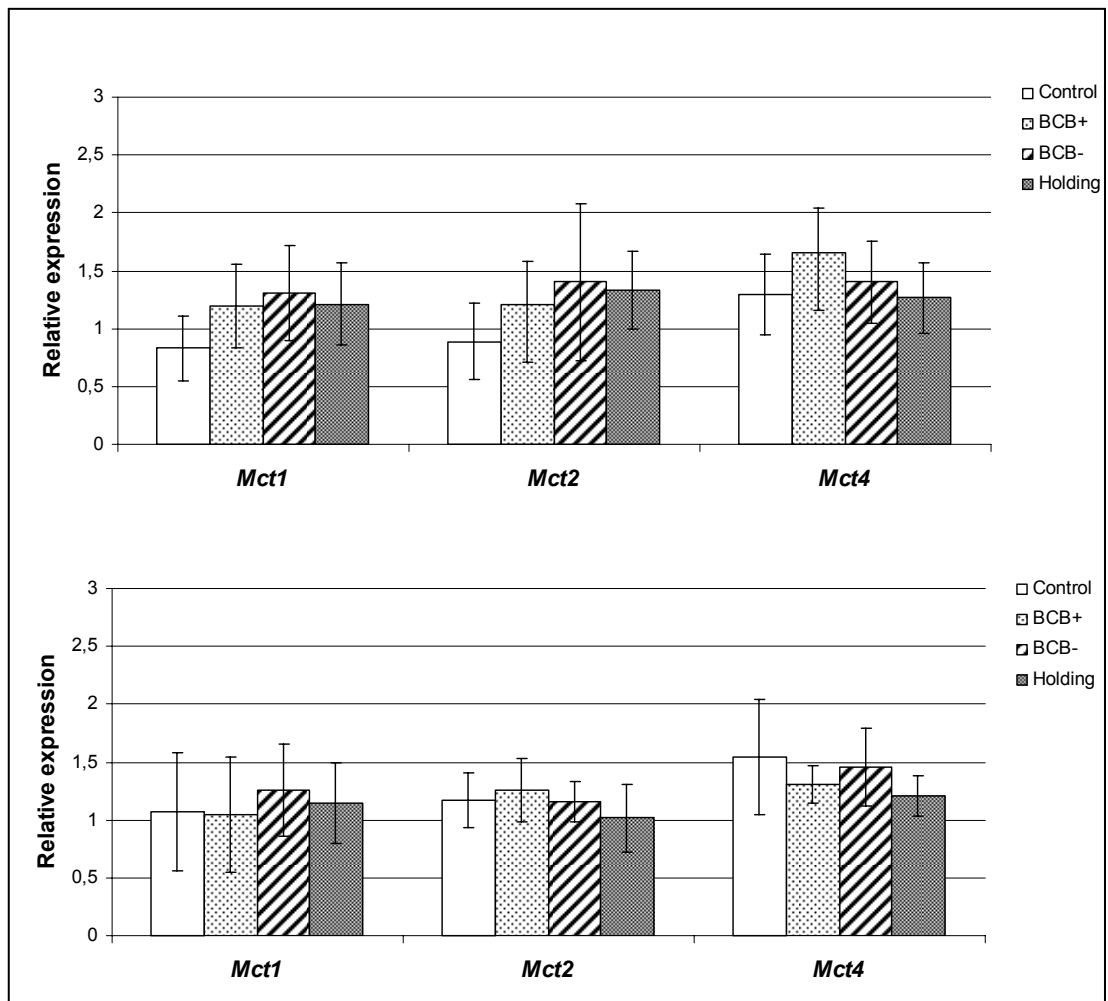


Fig. 1. Relative abundance of *Mct1*, *Mct2* and *Mct4* mRNA (mean  $\pm$  SD) in bovine COCs. (A) Immature COCs and (B) after 24 h of IVM. No significant difference ( $p > 0.05$ ) was verified in relative expression for each gene among groups.

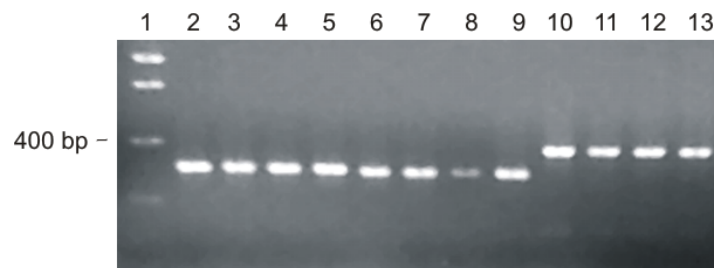


Fig. 2. Representative agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplicons for the monocarboxylate transporter mRNA expression in bovine COCs. The bovine *Mct1*, *Mct2* and *Mct4* products were 300 bp, 292 bp and 374 bp respectively. Lane 1, low DNA mass ladder; lane 2, 3, 4 and 5, *Mct1*; lane 6, 7, 8 and 9, *Mct2*; lane 10, 11, 12 and 13, *Mct4*.

### **Relative quantification of *Gdf9*, *Bmp15* and *Has2* in immature and matured COCs**

A significant difference ( $p < 0.05$ ) was observed for the *Gdf9* transcript between control and BCB+ groups of COCs and between control and BCB- groups (Fig. 3a). The statistical difference was also observed in *Bmp15* relative expression between holding and control ( $p < 0.05$ ). However, this rise may have been short-lived, since after the 24 h incubation period *Gdf9* and *Bmp15* transcript expression in BCB-, BCB+ and holding groups did not differ significantly from that in the control group (Fig. 3b).

Interestingly, RT-PCR analysis of *Has2* revealed a different behavior when compared to *Gdf9* and *Bmp15*. There was no difference in the relative expression of *Has2* among groups of the immature COCs (Fig. 3a), but mRNA expression of *Has2* in matured COCs showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between holding and control groups of COCs (Fig. 3b).

*Gdf9*, *Bmp15* and *Has2* transcript levels in immature COCs were compared with COCs collected after IVM, for each analyzed group. *Gdf9* and *Bmp15* were up-regulated in immature COC when compared with matured COC from holding and BCB+ groups (Fig. 4a, b). Between immature and matured COCs from the BCB- group, only *Gdf9* was up-regulated before IVM (Fig. 4b). There were no differences in relative expression of *Bmp15* and *Gdf9* between immature and mature COCs from the control group (Fig. 4a, b). A different behavior in the relative expression of *Has2* was observed (Fig. 4c). *Has2* was up-regulated after IVM ( $p < 0.01$ ) in the control group, but these differences were not statistically

significant between immature and matured COCs from BCB-, BCB+ and holding groups (Fig. 4c).

#### **The expression patterns in denuded oocyte and cumulus cells**

In both DO and CC masses collected before and after IVM, *Mct1* and *Mct4* were detected. In contrast, *Mct2* mRNA was detected only in the CC masses (data not shown).

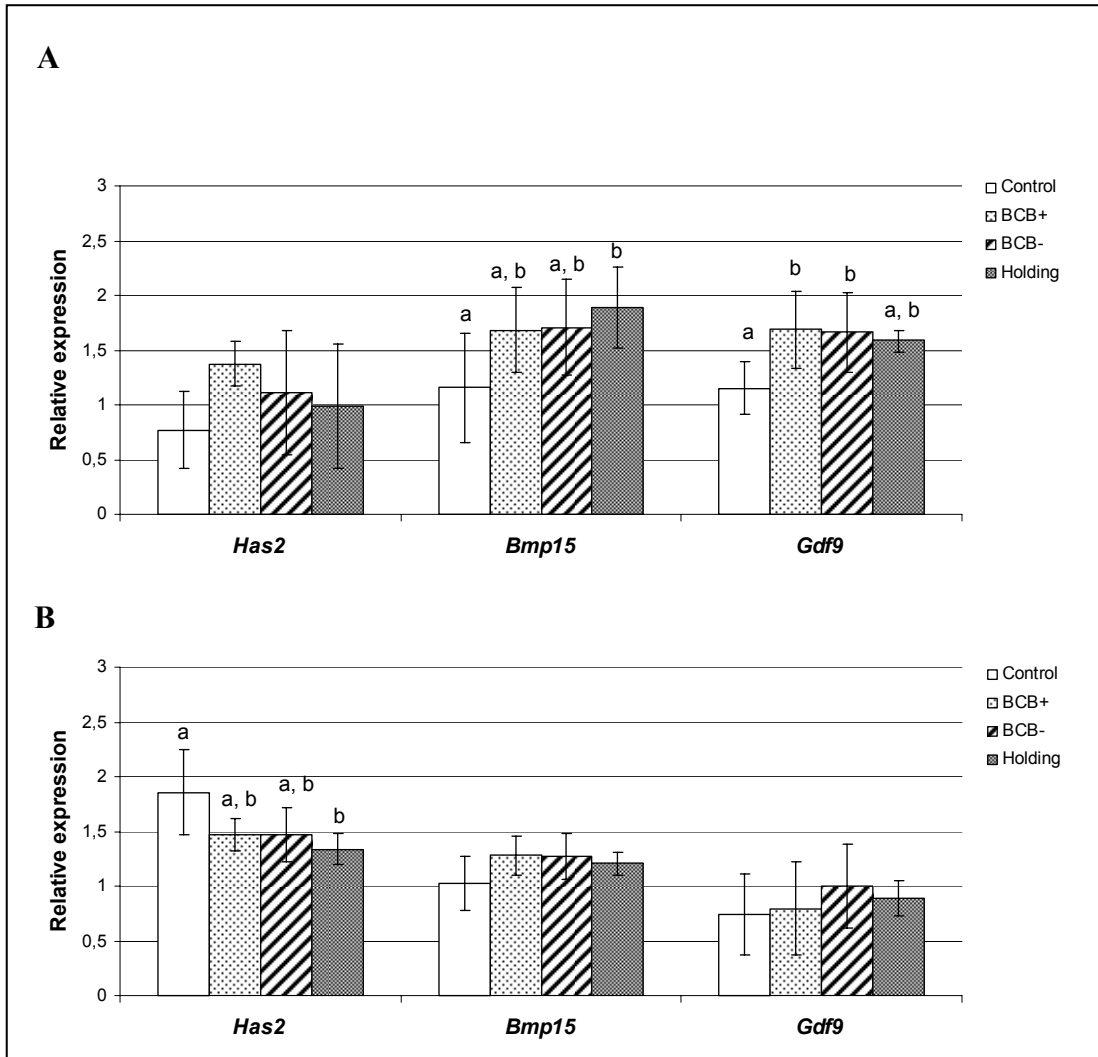


Fig. 3. Relative abundance of *Has2*, *Bmp15* and *Gdf9* mRNA in bovine COCs after selection by BCB (mean  $\pm$  SD). (A) Immature COCs and (B) after 24 h of IVM. Columns with different superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ) via multi-factor ANOVA analysis followed by Tukey's test.

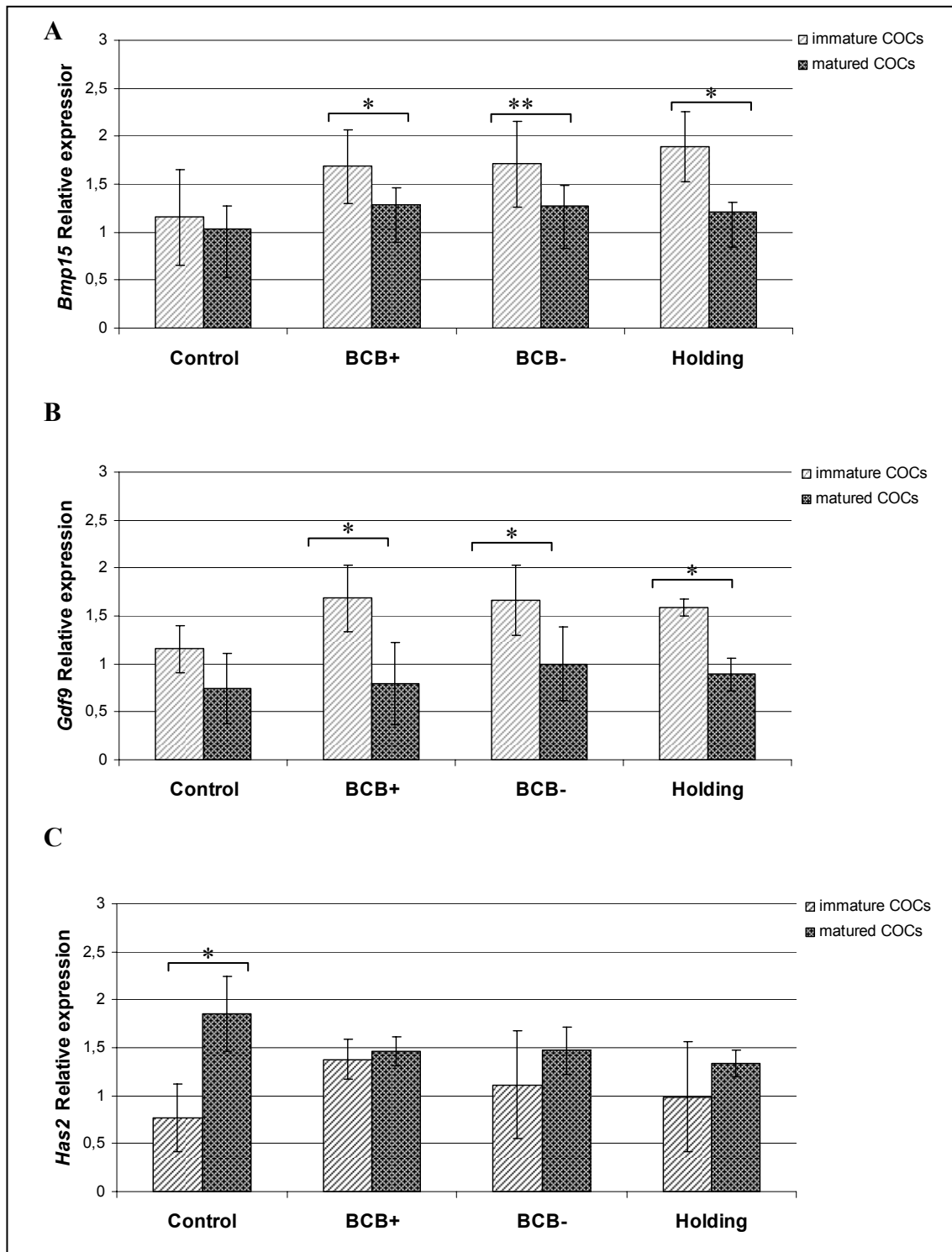


Fig. 4. Relative *Bmp15*, *Gdf9* and *Has2* mRNA abundance (mean  $\pm$  SD) among immature and mature COCs. (A) Relative expression of *Bmp15*, (B) *Gdf9* and (C) *Has2* transcripts. The error bars represent standard deviations. \* =  $p < 0.05$  via multi-factor ANOVA analysis followed by Tukey's test. \*\* =  $p = 0.076$ .

## Discussion

Transcript profiling of oocytes of different development competence levels is a rich source of information on how competence is reached at molecular level. Here, *Mct1*, *Mct2* and *Mct4* expression in bovine COCs is described, for the first time, before and after a 24 h IVM period.

The careful sorting of CCs of oocytes afforded to identify *Mct1* and *Mct4* mRNA expression, both in cumulus cells and denuded oocytes. However, *Mct2* transcript expression was only detected in CCs before and after IVM, not in DO, which indicates that this mRNA may not be present in oocytes or that it may be underexpressed, when compared to CCs. Oppositely to the present results, Harding et al. (1999) and Hérubel et al. (2002) showed that *Mct2* was expressed in mouse and human unfertilized oocytes collected after insemination. Therefore, these oocytes probably presented a potential problem that may have caused this failure in fertilization. Additionally, these authors used different primers, and Hérubel et al. (2002) used the nested PCR technique to increase reaction sensitivity, highlighting the discrepancy against the results reported herein. Given that we did not observe *Mct2* expression, we increased oocyte equivalent in RT-PCR from 0.25 to 0.5 oocyte, but the result was not change. Hérubel et al. (2002) used 0.5 oocyte per reaction, but Harding et al. (1999) did not reveal the amount of material used in RT-PCR. Although *Mct2* mRNA has been detected during early mouse embryo development, *Mct1* and *Mct2* activity in lactate transport indicates that *Mct2* was not produced before the blastocyst stage, and that lactate transport was mediated by *Mct1* (Harding et al. 1999). Additionally, in organs like the liver, kidneys, testis and brain, *Mct1* and *Mct2* are distinctly localized in

tissues, indicating that they play one single role (Halestrap and Price 1999).

The dependence of efficient maturation on the presence of CCs or on the presence of pyruvate and the role of CCs in nutrient and metabolite transfer have been clearly established (Biggers et al. 1967; Geshi et al. 2000; Eppig et al. 2005). The affinity for monocarboxylates is 10 times as high as in Mct2 that in Mct1, and Mct2 is detected in cells in low-concentration media, where fast lactate and pyruvate absorption may be required (Harding et al. 1999). Mct2 may also be more expressed under metabolic stress, as in the absence of glucose, during IMV (Jansen et al. 2006). In this sense, this transporter may be involved in the fast pyruvate and lactate absorption by CCs, which ultimately would be more easily transported to the oocyte through these cells.

The expression of *Mct1* in bovine oocytes reported here has also been observed for humans and mice (Harding et al. 1999; Hérubel et al. 2002; Jansen et al. 2006), suggesting a similar role for this transporter in these species. The *Mct1* transcript was also expressed in CCs.

Differently from Mct1 and Mct2, Mct4 is a transporter with high affinity and preference for lactate. Hérubel et al. (2002) detected the *Mct4* transcripts expression in mouse oocytes and embryos, suggesting that this transporter is responsible for acidose regulation during early mouse embryo development. Although we detected the expression of *Mct4* in bovine oocytes and CCs, we believe that this finding alone does not allow as to suggest that it plays identical roles in mouse and bovine species. Comparisons between mouse and bovine oocytes have shown that they differ significantly in pH regulation mechanisms, as in the H<sup>+</sup>/cation antiporter system in *in vitro* matured bovine oocytes, which is



absent in mouse oocytes (Lane and Bavister 1999).

Conflicting results were observed for *Mct3* mRNA expression in oocytes and embryos. While Harding et al. (1999) observed *Mct3* expression using RT-PCR in mouse oocytes and embryos, our results are similar to those obtained by Hérubel et al. (2002) and Jansen et al. (2006), in studies that did not detect the expression of this gene or of its protein in human and mouse oocytes and embryos. *Mct3* has been detected only in the RPE (Philp et al. 2001). The specificity of our primers was confirmed by mRNA extracted from RPE, validating the RT-PCR method used in the present study.

Although these are the first results for *Mct1*, *Mct2* and *Mct4* expression in bovine COCs, no association between these genes and COCs selected based on G6PDH was observed, which disallows these genes as potential candidates to validate the test.

The present study also assessed *Bmp15*, *Gdf9* and *Has2* expression in bovine COCs selected using the BCB test. The proteins coded by these transcripts are intimately linked with oocyte quality and subsequent embryo development. No difference in expression of these transcripts was observed between BCB+ and BCB- COCs. This indicates that low competence of BCB- COCs reported in a previous study (Silva et al. 2011) may not be actually linked with any change in *Bmp15*, *Gdf9* and *Has2* expression in oocytes. Yet, the incubation COCs of experimental groups (BCB-, BCB+ and holding) were submitted to prior to maturation influenced expression of some transcripts (*Bmp15*, *Gdf9* and *Has2*), while others remained stable during IVM (*Mct1*, *Mct2* and *Mct3*). The stability in comparative abundance of *Bmp15* and *Gdf9* in the control group is consistent with

the findings by Payton et al. (2011). Nevertheless, little is known about degraded transcripts or about those that remain stable during maturation, and about the selective or random character of the degradation and stabilization of certain transcripts (Su et al. 2007). In this sense, it seems that previous incubation influenced the maturation process, even though these oocytes exhibited the same transcript profile as the control group, after IVM.

The relative increase in *Has2* expression after IVM only occurred in the control group. *Has2* plays a role in the synthesis of hyaluronic acid by CCs, a compound that is essential in the cumulus matrix expansion process; also, its mRNA was proved to have a predictive value in oocyte maturation (McKenzie et al. 2004). Therefore, it is possible to associate the increase in *Has2* with COCs competence in controls, showing once again the influence of the incubation carried out prior to IVM.

*Mcts* transcripts remained more stable after maturation, though a trend ( $p = 0.067$ ) in *Mct4* mRNA decrease was observed after IVM in BCB+ (data not shown). Oocytes under maturation take up more pyruvate and, as a result, utilize more energy than MII oocytes, which consume pyruvate efficiently during ATP production (Biggers et al. 1967; Downs et al. 2002). Therefore, it is possible that the expression of transcripts involved in energy production during maturation were lower in MII oocytes, due to the low energy requirements at this stage. Su et al. (2007) reported that 57% of transcripts whose expression decreases in mouse MII oocytes were associated with ATP production pathway. Since energy production and consumption are linked with the meiotic status of the oocyte, this trend towards decreased *Mct4* transcripts, observed only in BCB+ oocytes, may

be associated with the end of the first meiotic division.

In conclusion, the results of the present experiments demonstrate, for the first time, *Mct1*, *Mct2* and *Mct4* expression in bovine oocytes, before and after maturation. Still, none of the transcripts observed exhibited any relationship with the BCB test, though incubation time and/or medium prior to maturation influenced *Bmp15* and *Gdf9* mRNAs.

### **Acknowledgements**

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The authors thank Rost and Sim Sul abattoirs for supplying the bovine ovaries and tissues.

### **Conflict of interest**

None of the authors have any conflict of interest to declare.

### **Author contributions**

EFL performed the data collection, development of experiments and carried out the manuscript writing. RGD and LSM participated in development of experiments. ATDO performed the statistical analysis and interpretation of data. RFFL contributed with acquisition, analysis and interpretation of RT-PCR data. JLR conceived the experimental design and contributed with conception of the experiments. All authors critically reviewed the manuscript.

## References

- Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S, Sirard, M-A, 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**, 209-222.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP, 1967: The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Zoology* **58**, 560-567.
- Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M, 2003: Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction* **126**, 753-763,
- Chatot CL, Lewis-Williams J, Torres I, Ziomek CA, 1994: One-minute exposure of 4-cell mouse embryos to glucose overcomes morula block in CZB medium. *Mol Reprod Dev* **37**, 407-412.
- Cheng JF, Raid L, Hardison RS, 1986: Isolation and nucleotide sequences of rabbit globin genecluster absence of a pair of  $\alpha$ -globin genes evolving in concert. *J Biol Chem* **261**, 839-848.
- Downs SM, Humpherson PG, Leese HJ, 2002: Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. *Mol Reprod Dev* **62**, 113-123.
- Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM, 1999: Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* **13**, 1035-1048.

- Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K, Pendola JK, 2005: Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol Reprod* **73**, 351-357.
- Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T, 2000: Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod* **63**, 1730-1734.
- Graham C, Gatherar I, Haslam I, Glanville M, Simmons NL, 2007: Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, 997-1007.
- Halestrap AP, Price NT, 1999: The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* **343**, 281-299.
- Harding EA, Day ML, Gibb CA, Johnson MH, Cook DI, 1999: The activity of the H<sup>+</sup>-monocarboxylate cotransporter during pre-implantation development in the mouse. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **438**, p.397-404.
- Hérubel F, EL Mouatassim S, Guérin P, Frydman R, Ménézo Y, 2002: Genetic expression of monocarboxylate transporters during human and murine oocyte maturation and early embryonic development. *Zygote* **10**,175-181.
- Hosoe M, Kaneyama K, Ushizawa K, Hayashi K, Takahashi T, 2011: Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* **9**, 1-8.

- Jansen S, Esmaeilpour T, Pantaleon M, Kaye PL, 2006: Glucose affects monocarboxylate cotransporter (MCT) 1 expression during mouse preimplantation development. *Reproduction* **131**, 469-479.
- Kirat D, Inoue H, Iwano H, Yokota H, Taniyama H, Kato S, 2007: Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in the liver of pre-ruminant and adult bovines. *Veterinary Journal* **173**, 124-130.
- Kirat D, Sallam K, Hayashi H, Miyasho T, Kato S, 2009: Presence of ten isoforms of monocarboxylate transporter (MCT) family in the bovine adrenal gland. *Mol Cell Endocrinol* **298**, 89-100.
- Khurana N, Niemann H, 2000: Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod* **62**, 847-856.
- Lane M, Bavister BD, 1999: Regulation of intracellular pH in bovine oocytes and cleavage stage embryos. *Mol Reprod Dev* **54**, 396-401.
- McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM, 2004: Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* **19**, 2869-2874.
- Meredith D, Bell P, McClure B, Wilkins R, 2002: Functional and molecular characterisation of lactic acid transport in bovine articular chondrocytes. *Cell Physiol Biochem* **12**, 227-234.
- Meredith D, Christian HC, 2008: The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica* **38**, 1072-1106.

- Oliveira ATD, Lopes RFF, Rodrigues JL, 2006: Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* with different serum concentrations. *Reprod Dom Anim* **41**, 129-136.
- Payton RR, Rispoli LA, Saxton AM, Edwards JL, 2011: Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. *J Reprod Dev* **57**, 481-491.
- Philp NJ, Yoon H, Lombardi L, 2001: Mouse MCT3 gene is expressed preferentially in retinal pigment and choroid plexus epithelia. *Am J Physiol, Cell Physiol* **280**, 1319-1326.
- Schoenfelder M, Einspanier R, 2003: Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol Reprod* **69**, 269-277.
- Silva DS, Rodriguez P, Galuppo A, Arruda NS, Rodrigues JL, 2011: Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*, DOI: 10.1017/S0967199411000487.
- Su Y-Q, Sugiura K, Woo Y, Wigglesworth K, Kamdar S, Affourtit J, Eppig JJ, 2007: Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* **302**, 104-117.
- Torner H, Ghanem N, Ambros C, Holker M, Tomek W, Phatsara C, Alm H, Sirard M-A, Kanitz W, Schellander K, Tesfaye D, 2008: Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction* **135**, 197-212.

Usui T, Suzuki K, Kaji Y, Amano S, Miyata K, Heldin P, Yamashita H, 1999:  
Hyaluronan synthase expression in bovine eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**,  
563-567.



#### 4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados podemos concluir que a exposição de CCOs ao teste BCB, causou modificação na expressão dos genes *Bmp15* e *Gdf9*, não estando essas modificações correlacionadas com a atividade da enzima G6PDH, tornando clara a necessidade de avaliar outros meios a serem utilizados para essa seleção. Além disso, nosso resultado pioneiro de expressão de Mcts em oócitos e células do *cumulus* abre um novo campo para o estudo dos mecanismos envolvidos no transporte de piruvato e lactato durante a maturação e também no desenvolvimento de embriões bovinos no estágio de pré-implantação.

## 5 PERSPECTIVAS

- ✓ Determinar o nível de expressão dos genes *Mct1*, *Mct2* e *Mct4* durante o desenvolvimento embrionário inicial de bovinos.
  
- ✓ Avaliar outros meios a ser utilizado na técnica de coloração com BCB e observar a expressão dos transcritos de *Bmp15* e *Gdf9* em oócitos e durante o desenvolvimento embrionário posterior.

## REFERÊNCIAS

- ALBUZ, F.K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**. v. 25, n. 12, p. 2999-3011, 2010.
- ALI, A.; SIRARD, M.A. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction**. v.130, p. 303-310, 2005.
- AREND, L.S.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L.; LOPES, R.F.F. Expressão de GLUT-1 e MCT-1 em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. In: XXI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2009, Porto Alegre. **Anais**, Porto Alegre: UFRGS, 2009. p.131.
- ASSIDI, M.; DUFORT, I.; ALI, A.; HAMEL, M.; ALGRIANY, O.; DIELEMANN, S.; SIRARD, M.A. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine *cumulus* cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v.79, p. 209-222, 2008.
- ASSOU, S.; ANAHORY, T.; PANTESCO, V.; LE CARROUR, T.; PELLESTOR, F.; KLEIN, B.; REYFTMANN, L.; DECHAUD, H.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S. The human *cumulus*-oocyte complex gene-expression profile. **Human Reproduction**. v. 21, p. 1705-1719, 2006.
- ASSOU, S.; HAOUZI, D.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S. Human *cumulus* cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. **Molecular Human Reproduction**. v.16, n.8, p. 531-538, 2010.
- AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally regulated in *in vitro* derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 60, p. 370-376, 2001.
- AVERY, B.; STROBECH, L.; JACOBSEN, T.; BOGH, I.B.; GREVE, T. *In vitro* maturation of bovine *cumulus*-oocyte complexes in undiluted FF: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. **Theriogenology**. v.59, p. 987-999, 2003.
- BETTEGOWDA, A.; PATEL, O.V.; LEE, K.; PARK, K.; SALEM, M.; YAO, J.; IRELAND, J.J.; SMITH, G.W. Identification of novel bovine *cumulus* cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. **Biology of Reproduction**. v. 79, 301-309, 2008.

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

BIGGERS, J.D.; WHITTINGHAM, D.G.; DONAHUE, R.P. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. **Zoology**. v. 58, p. 560-567, 1967.

BORINI, A.; LAGALLA, C.; CATTOLI, M.; SERENI, E.; SCIAJNO, R.; FLAMIGNI C.; COTICCHIO, G. Predictive factors for embryo implantation potential. **Reproductive BioMedicine Online**. v.10, p.653-668, 2005.

BRACKETT, R.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.

BREVINI-GANDOLFI, T.Z.A; FAVETTA, L.A; MAURI, L.; LUCIANO, A.M.; CILLO, F.; GANDOLFI, F. Changes in poly(a) tail length of maternal transcripts during *in vitro* maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**. v. 52, 427-433, 1999.

BRUIJNE, A.W.; VREEBURG, H.; VAN STEVENINCK, J. Kinetic analysis of L-lactate transport in human erythrocytes via the monocarboxylate-specific carrier system. **Biochim Biophys Acta**, v. 10, p. 562-568, 1983.

BUTCHER, L.; COATES, A.; MARTIN, K.L.; RUTHERFORD, A.J.; LEESE, H.J. Metabolism of pyruvate by the early human embryo. **Biology of Reproduction**. v. 58, 1054-1056, 1998.

CETICA, P.; PINTOS, L.; DALVIT, G.; BECONI, M. Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction**. v. 126, 753-763, 2003.

CHANSON, A.; NOCERA, D.; SENN, A.; DE GRANDI, P.; GERMOND, M. Development of a well-defined medium for the *in vitro* maturation of immature bovine *cumulus*-oocyte complexes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. v.18, n. 2, 97-105, 2001.

CHATOT, C.L.; LEWIS-WILLIAMS, J.; TORRES, I.; ZIOMEK, C.A. One-minute exposure of 4-cell mouse embryos to glucose overcomes morula block in CZB medium. **Molecular Reproduction and Development**. v. 37, p. 407-412, 1994.

CHATOT, C.L.; ZIOMEK, C.A.; BAVISTER, B.D.; LEWIS, J.L.; TORRES I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. **Journal of Reproduction Fertility**. v. 86, p. 679-688, 1989.

CHENG, J.F.; RAID, L.; HARDISON R.S. Isolation and nucleotide sequences of rabbit globin genecluster absence of a pair of  $\alpha$ -globin genes evolving in concert. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 261, p. 839-848, 1986.

CRAWFORD, J.L., HEATH, D.A., READER, K.L., QUIRKE, L.D., HUDSON, N.L., JUENGEL, J.L.; MCNATTY, K.P. Oocytes in sheep homozygous for a mutation in bone morphogenetic protein receptor 1B express lower mRNA levels of bone morphogenetic protein 15 but not growth differentiation factor 9. **Reproduction.** v. 142, 53-61, 2011.

CRAWFORD, J.L.; MCNATTY, K. P. The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. **Molecular and Cellular Endocrinology.** v. 348, p. 339-343, 2012.

DEAN, J. Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. **Journal of Reproductive Immunology.** v. 53, p.171-180, 2002.

DONAHUE, R.P.; STERN, S. Follicular cell support of oocyte maturation: production of pyruvate *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility.** v. 17, p. 395-398, 1968.

DOWNS, S.M., HUMPHERSON, P.G.; LEESE, H.J. Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the *cumulus* oophorus. **Molecular Reproduction and Development.** v. 62, p.113-123, 2002.

ELVIN, J.A.; CLARK, A.T.; WANG, P.; Wolfman, N.M.; MATZUK, M.M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology.** v.13, n.6, p. 1035-1048, 1999.

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

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science.** v. 25, p. 800-805, 1966.

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

FERREIRA, E.M; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology.** v. 71 p. 836-848. 2009.

FOX, J.E.M.; MEREDITH, D.; HALESTRAP, A.P. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. **Journal of Physiology**. v.529, n. 2, p. 285-293, 2000.

FUKUDA, Y.; ICHIKAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with *cumulus* cells *in vitro* up to the blastocyst stage. **Biology of Reproduction**. v. 42, p. 114-119, 1990.

FULKA, J.J.; FIRST, N.L.; MOOR, R.M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Molecular Human Reproduction**. v. 4, n.1, p. 41-49, 1998.

FULOP, C.; SALUSTRI, A.; HASCALL, V.C. Coding sequence of a hyaluronan synthase homologue expressed during expansion of the mouse *cumulus* oocyte complex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.337, p.261-266, 1997.

GÁL, A.B.; CARNWATH, J.W.; DINNYES, A.; HERMANN, D.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Comparison of real-time polymerase chain reaction and end-point polymerase chain reaction for the analysis of gene expression in preimplantation embryos. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 18, 365-371, 2006.

GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIDGE, L.M.; LAITINEN, M.P.E.; JUENGEL, J.L.; JOKIRANTA, 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.

GARDNER, D.K.; LEESE, H.J. The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. **Development**. v.104, 423-429, 1988.

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

GIBB, C.A.; PORONNIK, P.; DAY, M.L.; COOK, D.I. Control of cytosolic pH in two cell mouse embryos: roles of H(+)-lactate cotransport and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. **American Journal of Physiology**. v. 273, n.2, p. 404-419, 1997.

GILBERT, I.; ROBERT, C.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M-A. Impact of the LH surge on granulosa cell transcript levels as markers of oocyte developmental competence in cattle. **Reproduction**. v. 143, p. 735-747, 2012.

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

GILULA, N.B.; EPSTEIN, M.L.; BEERS, W.H. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the *cumulus*-oocyte complex. **The Journal of Cell Biology**. v. 78, p.58-75, 1978.

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

GRAHAM, C.; GATHERAR, I.; HASLAM, I.; GLANVILLE, M.; SIMMONS, N. L. Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 292, p. 997-1007, 2007.

HALESTRAP, A.P.; PRICE, N.T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. **Biochemical Journal**. v. 343, p.281-299, 1999.

HAMILTON, W.J.; LAING, J. A. Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation. **Ministry of Agriculture Veterinary Laboratory, Weybridge**. p. 194-204, 1946.

HANADA, A.; ENYA, Y.; SUZUKI, T. Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. **Japanese Journal of Animal Reproduction**. v.32, p. 208, 1986.

HARDING, E.A.; DAY, M.L.; GIBB, C.A.; JOHNSON, M.H.; COOK, D.I. The activity of the H<sup>+</sup>-monocarboxylate cotransporter during pre-implantation development in the mouse. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**. v.438, p.397-404, 1999.

HAZELEGER, N.L.; HILL, D.J.; STUBBING, R.B; WALTON, J.S. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**. v. 43, n. 2, p. 509-522, 1995.

HÉRUBEL, F.; EL MOUATASSIM, S.; GUÉRIN, P.; FRYDMAN, R.; MÉNÉZO, Y. Genetic expression of monocarboxylate transporters during human and murine oocyte maturation and early embryonic development. **Zygote**. v.10, p.175-181, 2002.

HOSOE, M.; KANEYAM, K.; USHIZAWA, K.; HAYASHI, K.; TAKAHASHI, T. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 9, p. 1-8, 2011.

- HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by *cumulus* complex. **Zygote**. v.5, p.371-376, 1997.
- HUSSEIN, T.S.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**. v. 296, p. 514-521, 2006.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**. v. 47, p. 23-32, 1997.
- IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.50, p.119-121, 1977.
- JANSEN, S.; ESMAEILPOUR, T.; PANTALEON, M.; KAYE, P.L. Glucose affects monocarboxylate cotransporter (MCT) 1 expression during mouse preimplantation development. **Reproduction**. v.131, p. 469-479, 2006.
- JANSEN, S.; PANTALEON, M.; KAYE, P.L. Characterization and regulation of monocarboxylate cotransporters Slc16a7 and Slc16a3 in preimplantation mouse embryos. **Biology of Reproduction**. v. 79, p. 84-92, 2008.
- KIRAT, D.; INOUE, H.; IWANO, H.; YOKOTA, H.; TANIYAMA, H.; KATO, S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in the liver of pre-ruminant and adult bovines. **Veterinary Journal**. v.173, n.1, p.124-130, 2007.
- KIRAT, D.; SALLAM, K.; HAYASHI, H.; MIYASHO, T.; KATO, S. Presence of ten isoforms of monocarboxylate transporter (MCT) family in the bovine adrenal gland. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 298, p. 89-100, 2009.
- KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**. v.82, p.14-23, 2004.
- KRISCHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**. v. 49, p.103-114, 1998.
- KHURANA, N.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**. v. 62, p. 847-856, 2000.
- LAM, W.K.; FELMLEE, M.A.; MORRIS, M.E. Monocarboxylate transporter-mediated transport of hydroxybutyric acid in human intestinal caco-2 cells. **Drug Metabolism and Disposition**. v.38, p. 441-447, 2010.
- LANE, M.; BAVISTER, B.D. Regulation of intracellular pH in bovine oocytes and cleavage stage embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 54, p. 396-401, 1999.



LANE, M.; GARDNER, D.K. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. **Biology of Reproduction**. v. 62, p.16-22, 2000.

LEESE, H. J.; BARTON, A.M. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. **Journal Reproduction and Fertility**. v. 72, p. 9-13, 1984.

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.

LINO N.F.; BRAGA, B.L.R.; COSTA, B.G.; AREND, F.L.; LOPES, R.F.F.; OLIVEIRA, A.T.D. Expressão gênica de transportador de monocarboxilados 1 em embriões bovinos produzidos *in vitro*. In: I SEMANA CIENTÍFICA DA UFCSPA, 2008, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: UFCSPA, 2008. p. CD

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

LOOS, F.; VAN VLIET C.; VAN MAURIK P.; KRUIP, T.A.M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**. v. 24, p.197-204, 1989.

MANGIA, F.; EPSTEIN, J.C. Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. **Developmental Biology**. v. 45, n. 2, p. 211-220, 1975.

MHAWI, A.J.; KANKA, J.; MOTLÍK, J. Follicle and oocyte growth in early postnatal calves: cytochemical, autoradiographical and electron microscopical studies. **Reproduction Nutr Developmente**, v.21, p. 115-126, 1991.

MCKENZIE, L.J; PANGAS, S.A.; CARSON, S.A.; KOVANCI, E.; CISNEROS, P.; BUSTER, J.E.; AMATO P.; MATZUK M.M. Human *cumulus* granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. **Human Reproduction**. v.19, n.12, p. 2869-2874, 2004.

MCNATTY, K.P; JUENGEL, J.L.; READER, K.L; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S.B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M.F.; MOTTERSHEAD, D.G.; GROOME, N.P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M.P.E. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**. v.129, p. 481-487, 2005.

MEREDITH, D.; BELL, P.; MCCLURE, B.; WILKINS, R. Functional and molecular characterisation of lactic acid transport in bovine articular chondrocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v.12, p. 227-234, 2002.

MEREDITH, D.; CHRISTIAN, H.C. The SLC16 monocarboxylate transporter family. **Xenobiotica**. v. 38, n. 7-8, p. 1072-1106, 2008.

MERMILLOD, P.; DALBIE`S-TRAN, R.; UZBEKOVA, S.; THÉLIE, A.; TRAVERSO, J.M.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MONGET, P. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? **Reproduction in Domestic Animals**. v. 43, p. 393-400, 2008.

MIYANO, T. JSAR outstanding research award. *In vitro* growth of mammalian oocytes. **Journal of Reproduction Development**. v. 51, n. 2, p. 169-176, 2005.

MOTA, G.B.; BATISTA, R.I.T.P.; SERAPIÃO, R.V.; BOITÉ, M.C.; VIANA, J.H.M.; TORRES, C.A.A.; CAMARGO, L.S.A. Developmental competence and expression of the Mater and Zar 1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. **Zygote**. v. 18, p. 209-216, 2009.

NAGAI, A.; TAKEBE, K.; NIO-KOBAYASHI, J.; TAKAHASHI-IWANAGA, H.; IWANAGA, T. Cellular expression of the monocarboxylate transporter (MCT) family in the placenta of mice. **Placenta**. v. 31, p.126-133, 2010.

NANDI, S.; KUMAR, V.G.; MANJUNATHA, B.M; RAMESH, H.S.; GUPTA, P.S.P. Follicular fluid concentrations of glucose, lactate and pyruvate in buffalo and sheep, and their effects on cultured oocytes, granulosa and *cumulus* cells. **Theriogenology**. v. 69, p.186-196, 2008.

NOTTOLA, S.A.; MACCHIARELLI, G.; FAMILIARI, G.; STALLONE, T.; SATHANANTHAN, A.H.; MOTTA, P.M. Egg-sperm interactions in humans: ultrastructural aspects. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**. v.103, n. 4, p. 85-101, 1998.

OLIVEIRA, A.T.D; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* with different serum concentrations. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 41, 129-136, 2006.

OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SŁOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYNSKA, B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. **Theriogenology**. v. 69, p. 546-555, 2008.

OPIELA, J.; LIPIN`SKI, D.; SŁOMSKI, R.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. **Animal Reproduction Science**. v. 118, p.188-193, 2010.

OTSUKA, F.; MCTAVISH, K.J.; SHIMASAKI, S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. **Molecular Reproduction and Development**. v. 78, p. 9-21, 2011.

PANTALEON, M.; SCOTT, J.; KAYE, P.L. Nutrient sensing by the early mouse embryo: hexosamine biosynthesis and glucose signaling during preimplantation development. **Biology of Reproduction**. v. 78, p. 595-600, 2008.

PAULINE, F.; MELO, E.O. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 46, n.2, p.1-8, 2010.

PAYTON, R.R.; RISPOLI, L.A.; SAXTON, A.M.; EDWARDS, J.L. Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding *cumulus* cell, and embryo RNA populations. **Journal of Reproduction and Development**. v. 57, n. 4, p. 481-491, 2011.

PHILP, N.J.; YOON, H.; GROLLMAN, E.F. Monocarboxylate transporter MCT1 is located in the apical membrane and MCT3 in the basal membrane of rat RPE. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Physiology**. v.274, p.1824-1828, 1998.

PHILP, N.J.; YOON, H.; LOMBARDI, L. Mouse MCT3 gene is expressed preferentially in retinal pigment and choroid plexus epithelia. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. v. 280, p.1319-1326, 2001.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**. v.55, p.1193-1210, 2001.

POOLE, R.C.; HALESTRAP, A.P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. **American Journal of Physiology**, v. 264, p. 761-782, 1993.

PURCELL, S. H.; MOLEY, K.H. Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 20, n.10, p. 483-489, 2009.

RODGERS, R. J., AND IRVING-RODGERS, H. F.. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. **Biology of Reproduction**. v. 82, p.1021-1029, 2010.

ROSE, R.D.; GILCHRIST, R.B.; KELLY, J.M.; THOMPSON, J.G.; SUTTON-MCDOWALL, M.L. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. **Theriogenology**. v. 79, 142-148, 2013.

SAITO, H.; KANEKO, T.; TAKAHASHI, T.; KAWACHIYA, S.; SAITO, T.; HIROI, M. Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. **Fertility and Sterility**. v. 74, n. 6, p.1148-1152, 2000.

SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**. v.69, p. 269-277, 2003.

SILVA, D.S; RODRIGUEZ, P.; GALUPPO, A.; ARRUDA, N.S; RODRIGUES, J.L. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. **Zygote**. 6pp, 2011. [in press]

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

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

STEEVES, T.E.; GARDNER, D.K. Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. **Molecular Reproduction and Development**. v. 54, p. 92-101, 1999.

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

SUGIURA, K.; PENDOLA, F.L.; EPPIG, J.J. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Developmental Biology**. v. 279, p. 20-30, 2005.

SUN, Q-Y.; LIU, K.; KIKUCHI, K. Oocyte-Specific Knockout: A novel *in vivo* approach for studying gene functions during folliculogenesis, oocyte maturation, fertilization, and embryogenesis. **Biology of Reproduction**. v. 79, p.1014-1020, 2008.

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

SUTTON, M.L.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T.; KIND, K.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine *cumulus* cell complexes. **Reproduction**. v. 126, p.27-34, 2003.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction Development**. v. 26, p. 90-100, 1990.

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). **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 4787-4794, 1997.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**. v.37, p. 86-91, 2002.

TORNER, H.; GHANEM, N.; AMBROS, C.; HOLKER, M.; TOMEK, W.; PHATSARA, C.; ALM, H.; SIRARD, M-A.; KANITZ, W.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Reproduction**. v. 135, p. 197-212, 2008.

USUI, T.; SUZUKI, K.; KAJI, Y.; AMANO, S.; MIYATA, K.; HELDIN, P.; YAMASHITA, H. Hyaluronan synthase expression in bovine eyes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 40, n.3, p. 563-567, 1999.

VELHO, F.A.B. **Avaliação da expressão gênica e da maturação nuclear *in vitro* em complexos *cumulus*-ooócito bovino**. 2011. 41 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WINTERS, L.M.; GREEN, W.W.; COMSTOCK, R.E. Prenatal development of the bovine. **Minnesota Agricultural Experimental Technical Bulletin**. v.151, p.1-50, 1942.

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.