

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

KARLLIELY DE CASTRO ALMEIDA

**RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DO
RECEPTOR DE EGF EM COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO
COLHIDOS POR LAPAROSCOPIA EM CABRAS CANINDÉ
SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO HORMONAL OVARIANA**

FORTALEZA

2009

KARLLIELY DE CASTRO ALMEIDA

RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DO
RECEPTOR DE EGF EM COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO COLHIDOS
POR LAPAROSCOPIA EM CABRAS CANINDÉ SUBMETIDAS À
ESTIMULAÇÃO HORMONAL OVARIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de
Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de
pequenos ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas

FORTALEZA

2009

KARLLIELY DE CASTRO ALMEIDA

RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DO RECEPTOR DE EGF EM COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO COLHIDOS POR LAPAROSCOPIA EM CABRAS CANINDÉ SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO HORMONAL OVARIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas
Universidade Estadual do Ceará
Orientador

Prof. Dr. José Luiz Rodrigues
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Examinador

Prof. Dra. Luciana Relly Bertolini
Universidade de Fortaleza
Examinadora

Dra. Luciana Magalhães Melo
Universidade Estadual do Ceará
Co-orientadora

À Deus pelo dom da vida.
À família pelo mais puro e incondicional amor.
À vida por toda sua plenitude.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) através da Faculdade de Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela oportunidade de realizar um mestrado de nível reconhecido e de qualidade e seriedade inquestionáveis.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de mestrado, sem a qual este trabalho não poderia ser realizado.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro indispensável na realização de todas as etapas desse projeto de pesquisa.

Ao Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) pela acolhida e pelos grandes ensinamentos gerados. Obrigada por me proporcionar conhecer a pesquisa e me ensinar a ser aluna de iniciação científica, seguir o caminho e hoje me tornar mestre.

À Deus, ser indescritível que conhece o mais íntimo do nosso ser. Aquele que nos protege, ampara e principalmente guia pelos caminhos mais corretos simplesmente pelo grande amor que nos dedica em todos os momentos de nossas vidas.

Minha eterna gratidão aos meus amados pais Adalgisa de Castro de Almeida e José Almeida da Silva por tudo de bom que me ensinaram, por cada momento de dedicação na educação e principalmente por reafirmarem em meu ser a que caráter e educação é a maior das heranças que se pode deixar para um filho. Por vocês o mais sublime e indescritível amor!

Aos meus queridos irmãos William, Nathaly, Davison, Michelly, Jerusa e Emanuelle pela amorosa convivência, pela troca de experiências, pelo grande crescimento adquirido de vocês durante todos os anos de caminhada. Sem vocês eu jamais seria tão completa!

Agradeço imensamente aos meus queridos avós Terezinha Ferreira, Gerson Rabelo (*in memorian*), Maria Batista (*in memorian*) e Otávio Barbosa (*in memorian*) por tanto amor e carinho, pelas doces recordações da infância e pelos grandes ensinamentos eternizados.

Aos meus queridos familiares Dennis, Enya Mellize, Azenete, Paulo, Rayanne, Rarisson, Jonny, Eucilene, Danielle, Gerson, Gefferson, Geremias, Gerciana, Ivna, Cláudia, Rafaele, Mayra, Diana, Iara, César, César Filho, Layra, Pedro, Aurélio, Graça, David, Dalisson. Davi, Eder e os demais que aqui não foram citados, obrigada pela alegre e indispensável convivência e pelo apoio nos momentos difíceis provando que família é a base de tudo.

Agradeço imensamente ao Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas por todos os ensinamentos, pela orientação e confiança em mim depositada. Obrigada pela convivência agradável e por me mostrar que um homem e um grande pesquisador se constrói a cada dia, com trabalho, dedicação e diplomacia. Sempre levarei comigo grandes conhecimentos adquiridos, suas lições de ética e seu grande caráter.

À Dra. Luciana Magalhães Melo, dedico um agradecimento especial. Uma mulher que se dedica à pesquisa. Uma pesquisadora na essência da palavra, pessoa que dedicou suas idéias, seu tempo, seu trabalho e sua sabedoria na orientação e execução desse trabalho. Muito obrigada pelos grandes ensinamentos e sincera dedicação!

Aos Professores Marcelo Bertolini e Luciana Bertolini, pela amizade, respeito, colaboração e contribuições científicas importantes e necessárias durante o período de agradável convivência junto ao LFCR. Obrigada pelo grande empenho na tradução do artigo.

À grande e fiel amiga Alexsandra Fernandes Pereira pessoa que sempre me apoiou, cuidou, respeitou e colaborou em todas as fases dessa caminhada. Obrigada por todos os ensinamentos profissionais e principalmente pela amizade dedicada todos esses anos. Amiga-irmã podes contar comigo, estarei sempre ao seu dispor. Somos eternamente responsáveis pelo que cativamos!

Minha eterna gratidão aos amigos Suely Avelar, Emanuel Maia, Dárcio Ítalo e Elizabeth Saraiva por mostrarem que a amizade surge e perdura para sempre quando nos dedicamos a cuidar dela com carinho e respeito. Obrigada pelo amor, carinho e grande companheirismo.

Agradeço em especial aos membros da banca examinadora Dra. Luciana Magalhães Melo, Dr. José Luiz Rodrigues, Dra. Luciana Relly Bertolini, pela disposição em contribuir no engrandecimento desse trabalho.

Aos amigos Pós-Graduandos do LFCR Victor Hugo, Francisco Carlos, Raylene e João Batista pela colaboração, coleguismo e profissionalismo e por me mostrarem a cada dia que sempre é necessário estender a mão e que sempre temos algo a ensinar e aprender na convivência diária. Obrigada pelos inesquecíveis momentos e grandes ensinamentos.

Aos queridos alunos de iniciação científica do LFCR Agostinho, Érica, Cláudia, Carlos Henrique, Antônio Carlos, Talles, Jefferson, Hayanne, Eudislane, Maiara, Igor os outros amigos que passaram pelo LFCR durante a realização do mestrado. Obrigada pela alegre convivência, pelo carinho, amizade, respeito e dedicação. Sem a grande colaboração de todos a execução desse trabalho teria sido muito mais difícil.

Aos funcionários César, Selmar, e Cícero pelos momentos agradáveis vividos no laboratório. Agradeço o coleguismo, a dedicação e a colaboração em cuidar do nosso ambiente de trabalho e dos animais. Obrigada pelas lições de vida ensinadas a cada dia.

Agradeço aos amigos Hermes, Eliene, Iran, Leonel, Conceição, Larissa, Valesca, Érika, Davyson, Sabrina, Suyanne, Camilla, Greta, Lucilene (*in memoriam*), Isabelle e Genário Jr. pelo carinho e consideração dedicados. Por me ensinarem que amizade é jamais deixar cair!

A todos os amigos da turma de mestrado, em especial Almir, Antônio Filho, Michelle, Natalie, Petrônio, Luduina, Gleidson e Liliane pelas alegrias, aprendizado e pelos grandes momentos compartilhados durante o curso.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias por toda a dedicação e preocupação em formar novos mestres com dignidade e respeito.

Agradeço a todos os amigos e colegas que de maneira direta ou indireta estiveram torcendo por mim e que colaboraram na conquista dessa etapa da minha caminhada.

À vontade de sempre querer ir além, de desistir jamais!

RESUMO

A estimulação ovariana com hormônio folículo estimulante (FSH) exógeno tem sido utilizada para aumentar o número de oócitos viáveis para a colheita de oócitos por laparoscopia (COL) em cabras. O objetivo desse estudo foi determinar o efeito de dois protocolos de estimulação ovariana sobre a expressão do receptor de EGF (EGFR) em complexos cumulus-oócito (CCOs), recuperados por COL em caprinos. Após análise por qRT-PCR em tempo real, o perfil de expressão de CCOs classificados morfológicamente foi comparado antes e após a maturação *in vitro* (MIV), nos distintos protocolos de FSH. A utilização do protocolo com maior número de injeções de FSH a um curto intervalo de tempo resultou em CCOs GI/GII com um maior nível de expressão de EGFR nas células do cumulus, mas não no oócito, que foi correlacionado com a maior competência meiótica após a MIV. Com base no perfil de maturação e padrão de expressão do EGFR observado entre os grupos, a seleção morfológica dos CCOs antes da MIV não foi um bom parâmetro para prever a competência meiótica do oócito. Portanto, o EGFR pode ser um bom candidato a marcador por mostrar indiretamente a qualidade oocitária em caprinos. O processo de MIV de CCOs caprinos aumentou a expressão de EGFR em oócitos e células do cumulus, o que pareceu estar associado com a retomada da meiose. Em resumo, a expressão diferencial de EGFR em células do cumulus de caprinos foi associada com o processo de pré-maturação *in vivo*, e por sua vez, o aumento da regulação no CCO foi associado com a maturação. A relação de causa e efeito entre os níveis de expressão aumentados, particularmente no oócito, e a competência do mesmo necessitam ainda ser investigados.

Palavras-chave: Receptor de EGF. qRT-PCR em tempo real. Caprino. Oócito. Células do cumulus.

ABSTRACT

Ovarian stimulation with exogenous Follicle Stimulating Hormone (FSH) has been used to increase the number of viable oocytes for laparoscopic oocyte recovery (LOR) in goats. The aim of this study was to evaluate the effect of two FSH protocols for ovarian stimulation in goats on the expression pattern of EGF receptor (EGFR) in cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered by LOR. After real-time qRT-PCR analysis, expression profiles of morphologically graded COCs were compared prior to and after *in vitro* maturation (IVM) in the different FSH protocols. The use of a protocol with higher number of FSH injections at a shorter interval resulted in GI/GII COCs with a higher level of EGFR expression in cumulus cells, but not in the oocyte, which was correlated with an elevated meiotic competence following IVM. Based on the maturation profile and EGFR expression patterns observed between groups, the morphological selection of COCs prior to IVM was not a good predictor of oocyte meiotic competence. Therefore, EGFR may be a good candidate marker for indirect prediction of goat oocyte quality. The IVM process of goat COCs increased the EGFR expression in oocytes and cumulus cells, which seemed to be strongly associated with the resumption of meiosis. In summary, differential EGFR expression in goat cumulus cells was associated with the *in vivo* prematuration process, the up regulation in the entire COC was associated with IVM. Cause-and-effect relationships between such increased expression levels, particularly in the oocyte, and oocyte competence itself still need to be further investigated.

Keywords: EGF receptor. Real-time qRT-PCR. Goat. Oocyte. *Cumulus* cells.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Desenho esquemático da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação e formação do zigoto.....	22
Figura 2 - Dinâmica dos filamentos no citoesqueleto durante a maturação citoplasmática e nuclear.....	23
Figura 3 - Desenvolvimento oocitário durante a oogênese.....	24
Figura 4 - Mecanismo molecular de maturação através da interação oócito-células do <i>cumulus</i> após o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas. Células do <i>cumulus</i> (azul).....	28
Figura 5 - Perfil oscilatório do fator promotor de maturação (MPF) durante a retomada da meiose e alcance da metáfase II.....	29

CAPÍTULO 1

Figure 1- Specificity, linearity and efficacy of EGFR and GAPDH qRT-PCR amplifications in oocytes and cumulus cells. Derivative melting curves of EGFR and GAPDH amplicons in oocytes (A) and cumulus cells (B). Negative controls (arrows) were constituted of mRNA templates without reverse transcriptase. The inserts in panels A and B show the eletroforetic analysis of the products. M: 100 bp DNA ladder. Standard curves for EGFR (upper line) and GAPDH (lower line) amplifications in COCs (C). The curve slopes, efficiency values (E) and square of Pearson correlation coefficients (R^2) were plotted.....	63
--	----

Figure 2 - Real-time qRT-PCR analysis of EGFR expression in goat (A) oocytes and (B) cumulus cells from graded COCsobteined from the five-dose or three-dose FSH treatment groups for ovarian stimulation. Shown are the fold differences in mRNA expression after normalization to the internal standard (GAPDH). The mRNA levels in GI/GII oocytes and cumulus cells, both for the five-dose FSH treatment, were arbitrarily set to one-fold for oocyte and cumulus cells groups, respectively. Lower panels in A and B show the eletroforetic analysis of the EGFR and GAPDH amplicons. Histograms with columns with distinct superscripts differ, for $p < 0.05$ in A and $p < 0.01$ in B.....	64
--	----

Figure 3 - Real-time qRT-PCR analysis of EGFR expression in goat (A) oocytes and (B) cumulus cells from pre- and post-IVM COCs obtained from the five-dose or three-dose FSH treatment groups for ovarian stimulation. Shown are the fold differences in mRNA expression in the immature (OI), mature (MII) and non-competent (NC) oocytes, and in cumulus cells from pre- and post-IVM COCs, after normalization to the internal standard (GAPDH). The mRNA levels in OI and pre-IVM cumulus cells, both for the five-dose treatment, were arbitrarily set to one-fold for oocyte and cumulus cells groups, respectively. Lower panels in A and B show the eletroforetic analysis of the EGFR and GAPDH amplicons. Histograms with columns with distinct superscripts differ, for $p < 0.001$ in A and $p < 0.05$ in B.....

65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 - Oligonucleotides used for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in goat oocytes and cumulus cells.....	61
Table 2 - Cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered from goats after five-dose or three-dose hormonal treatments for ovarian stimulation.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC - AMP cíclico
CIV - Cultivo *in vitro*
CCOs - Complexos cumulus-oócito
COCs - cumulus-oocyte complexes
COL - Colheita de oócitos por laparoscopia
Ct - Threshold cycle
Cx-43 – Conexina 43
DNA- Ácido desoxirribonucléico
EGF - Fator de Crescimento Epidermal
EGFR - Receptor para Fator de Crescimento Epidermal
eCG - Gonadotrofina Coriônica eqüina
FIV - Fecundação *in vitro*
FSH - Hormônio Folículo Estimulante
GVBD - Vesícula Germinativa Rompida
LH - Hormônio Luteinizante
LOR - Laparoscopic Oocyte Recovery
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos
MIV - Maturação *in vitro*
MPF - Fator Promotor de Maturação
M I - Metáfase I
M II - Metáfase II
mg - Miligrama
mL - Mililitro
mm - Milímetro
µg - Micrograma
µM - Micromolar
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PDE3 – Fosfodiesterase 3
PIV - Produção *in vitro*
PIK3 – Fosfatidil-inositol 3 kinase
PKA - Proteína kinase A
PKB – Proteína kinase B
PKC – Proteína kinase C

qPCR - PCR quantitativo

RNA - Ácido ribonucléico

RNA_m - RNA mensageiro

TCM - Meio de cultivo de tecido

VG - Vesicular Germinativa

UI - Unidades Internacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> (PIV) DE EMBRIÕES CAPRINOS.....	18
2.1.1 FONTE DE OÓCITOS.....	18
2.1.2 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	20
2.1.2.1 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA.....	21
2.1.2.2 MATURAÇÃO NUCLEAR.....	23
2.1.2.3 ASPECTOS MOLECULARES E INTERAÇÃO OÓCITO- CÉLULAS DO <i>CUMULUS</i>	25
2.1.3 EGF E MATURAÇÃO OOCITÁRIA.....	30
2.2. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	32
2.2.1 PRINCÍPIOS.....	32
2.2.2 APLICAÇÃO EM EXPRESSÃO GÊNICA.....	34
3 JUSTIFICATIVA.....	36
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	37
5 OBJETIVOS.....	38
5.1 GERAL.....	38
5.2. ESPECÍFICOS.....	38
6 CAPÍTULO 1.....	39
7 CONCLUSÕES.....	66
8 PERSPECTIVAS.....	67
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
APÊNDICE.....	85
APÊNDICE A.....	85
APÊNDICE B.....	87

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) em pequenos ruminantes é uma ferramenta para a obtenção de embriões a um baixo custo para pesquisas visando compreender os processos fisiológicos bem como para aplicações em biotecnologias emergentes como a transferência nuclear e a transgênese (BALDASSARE et al., 2002). Além disso, a aplicação da PIV e da transferência de embriões inter-espécie têm sido propostas como uma estratégia para salvar espécies ameaçadas de extinção (PTAK et al., 2002).

A técnica de PIV envolve as etapas de colheita de oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Tais etapas ainda não se encontram totalmente elucidadas em caprinos. Investigações são necessárias para se conhecer mais profundamente quais os melhores meios e as condições ideais para o sucesso das diferentes etapas, a fim de se obter resultados satisfatórios com a referida técnica. Assim, diversos fatores podem influenciar de forma direta ou indireta durante esse processo e interferir no sucesso desta biotecnologia tornando-a pouco eficiente.

Desde o nascimento de cabritos a partir de embriões produzidos *in vitro*, avanços foram obtidos no que concerne a maturação final dos gametas (MERMILLOD et al., 1999), pesquisas sobre as condições de cultivo adequadas para a maturação do oócito (COGNÍÉ et al., 2003) e o desenvolvimento embrionário (THOMPSON, 2000) mostraram saldo positivo na PIV de embriões em caprinos.

Para obter melhorias na produção de embriões *in vitro*, torna-se necessário compreender uma das etapas mais importantes do processo, a qual é denominada maturação do oócito. Assim, elucidar os mecanismos que regem e influenciam esse processo é um desafio para a reprodução animal.

A maturação oocitária é um longo processo durante o qual o oócito adquire a habilidade para a fecundação e suportar os estágios de desenvolvimento culminando com a ativação do genoma embrionário. Diferentes fatores podem influenciar o sucesso da maturação, dentre eles destacam-se o processo de estimulação ovariana, a qualidade dos oócitos bem como a composição do meio utilizado nessa etapa. Assim, estudar os métodos de estimulação ovariana e verificar a influência destes sobre a competência oocitária à maturação *in vitro* bem como as alterações moleculares envolvidas nesse processo funciona como uma ferramenta para desvendar como esse processo ocorre.

Os caprinos da raça Canindé estão dentre as principais raças naturalizadas do Nordeste do Brasil. Acredita-se sua origem tenha sido no vale do Canindé, no Estado do Piauí e que em sua formação tenha a participação da raça Grisone Negra da Suíça

(MARIANTE et al., 2003). A raça Canindé destaca-se dentre outras raças pela sua superior produção leiteira, chegando a produzir aproximadamente 1,5 litros de leite por dia (SANTANA et al., 2000). Em virtude do cruzamento com raças exóticas visando à obtenção de animais com maior potencial leiteiro, houve uma redução do número de animais dessa raça. Nesse sentido, a utilização de tecnologias e programas visando à recuperação dos recursos genéticos naturais bem como o correto manejo do germoplasma a ser conservado é considerada como uma medida necessária para evitar possíveis perdas genéticas ou mesmo extinção de raças (EGITO et al., 2002). Desta forma, a utilização de oócitos obtidos de cabras Canindé após estimulação ovariana pode funcionar como uma ferramenta para desvendar os processos fisiológicos nesses animais tão pouco estudados quanto aos aspectos reprodutivos.

No que se refere aos estudos de biologia molecular, diversos trabalhos tem utilizado a avaliação de expressão gênica correlacionando com os processos fisiológicos e patológicos visando compreender como estes ocorrem. Nesse sentido, é conhecido que o fator de crescimento epidermal (EGF) pode estar envolvido na regulação do crescimento folicular e na maturação de oócitos caprinos (GALL et al., 2004). Estudos anteriores mostraram que o estudo do receptor de EGF (EGFR) permitiu correlacionar como o EGF influencia no desenvolvimento final do oócito (GALL et al., 2004; PROCHAZKA et al., 2003).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PRODUÇÃO *IN VITRO* (PIV) DE EMBRIÕES CAPRINOS

A PIV de embriões é uma biotécnica bastante utilizada atualmente em aplicações comerciais na propagação de animais de alto valor genético bem como para a realização de estudos em biotecnologias emergentes como a transferência nuclear (SCHURMANN et al., 2006) e a transgênese (FREITAS et al., 2007).

Essa biotecnologia envolve as etapas de colheita de oócitos, maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Contudo, para a realização destas faz-se necessário compreender e dominá-las a fim de se obter resultados satisfatórios. Diversos fatores podem influenciar no sucesso da PIV, tais como a fonte e a qualidade do oócito, o momento da realização da FIV bem como as condições de cultivo utilizadas (COGNIE et al., 2003). Estas variáveis apresentam um papel importante para a obtenção de embriões com qualidade e viabilidade desejáveis.

2.1.1 FONTE DE OÓCITOS

A colheita de oócitos de boa qualidade é o primeiro passo para o sucesso da PIV. Em mamíferos, o gameta feminino encontra-se no folículo ovariano, a unidade básica funcional e estrutural do ovário, podendo a colheita oocitária ser realizada por diferentes métodos.

Em pequenos ruminantes, os métodos mais utilizados são: aspiração de folículos a partir de ovários colhidos *post mortem* ou por ovariectomia (BORMANN et al., 2003) ou aspiração de folículos após exposição de ovários por laparotomia ou por laparoscopia (BALDASSARRE et al., 2002; GIBBONS et al., 2007).

Ovários de abatedouro são uma fonte barata e abundante de oócitos que permite a aspiração e obtenção de um número considerável de folículos por animal (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2007). O procedimento de aspiração é simples e rápido, e embora o número de oócitos obtidos após aspiração *in vivo* seja reduzido, este método passou a ser o de eleição para a obtenção de oócitos de fêmeas após o abate.

O método de colheita oocitária por laparoscopia (COL) permite recuperar um maior número de estruturas para a PIV de embriões a partir de doadoras estimuladas com um tratamento gonadotrófico para desenvolvimento folicular (BALDASSARRE et al., 2007). Desta maneira, em programas de PIV, faz-se necessário desenvolver protocolos eficientes de estimulação ovariana que possibilitem obter um maior número de oócitos viáveis para a maturação *in vitro*.

A COL é considerada uma ferramenta menos invasiva que permite utilizar uma fêmea como doadora por um período mais prolongado. A colheita laparoscópica permite utilizar fêmeas com estado sanitário controlado, o que torna viável sua utilização na PIV de embriões. A utilização de técnicas e equipamentos apropriados para a aspiração folicular pode minimizar traumas no trato reprodutivo das fêmeas evitando a formação de aderências (BALDASSARE et al., 2003b).

Na tentativa de otimizar a COL, as fêmeas têm o ciclo estral sincronizado através de esponjas vaginais, impregnadas com progestágeno, além de receberem uma injeção luteolítica e o tratamento subsequente de estimulação ovariana (BALDASSARRE et al., 2004; BALDASSARRE, 2007; KOEMAN et al., 2003).

Estudos anteriores verificaram que as gonadotrofinas são criticamente importantes para o crescimento folicular, sendo o hormônio folículo-estimulante (FSH) considerado um hormônio chave nesse processo. A estimulação ovariana com FSH resultou no crescimento e diferenciação de folículos a partir de 2,5 mm de diâmetro (EVANS, 2003). Desta forma, investigações são necessárias para relacionar os mecanismos pelos quais os hormônios controlam o desenvolvimento nos estádios finais de desenvolvimento oocitário *in vivo*. Tais estudos podem fornecer informações importantes que podem levar a melhorias nos tratamentos hormonais e assim obtenção de oócitos de melhor competência e conseqüentemente melhorar a maturação *in vitro* de oócitos caprinos.

O FSH é geralmente administrado em doses fracionadas, duas vezes ao dia, durante os últimos três ou quatro dias do tratamento progestágeno de 9 a 11 dias. Isto é necessário em virtude da meia-vida curta desta gonadotrofina. Alguns protocolos de superestimulação ovariana combinam FSH e gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), administradas num mesmo momento, produzindo desenvolvimento folicular e quantidade de oócitos colhidos similar àqueles obtidos em resposta a múltiplas injeções de FSH isoladamente (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2004). A alta dose de FSH é capaz de recrutar, mas não de sustentar o desenvolvimento de um grupo de folículos FSH-responsivos (BALDASSARRE et al., 2003b). Assim a associação de FSH e eCG parece afetar positivamente a estimulação ovariana, uma vez que o eCG apresenta uma meia-vida longa (HAFEZ, & HAFEZ, 2004) e possibilita a continuação do crescimento folicular iniciado pelo FSH. A superestimulação em dose única é preferível ao tratamento de doses múltiplas pela praticidade e promove um resultado final semelhante.

Estudos realizados por Baldassare et al., (2003b), verificaram que a estimulação ovariana com FSH em cabras submetidas a diferentes sessões de COL resultou na disponibilidade de $15,7 \pm 9$ folículos por doadora e uma recuperação média de $13,4 \pm 8$

oócitos por animal. Em cabras tratadas com 180 mg de pFSH a intervalos de 12 horas foram obtidos $24,5 \pm 8,6$ oócitos disponíveis por doadora (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2004). Segundo Baldassarre et al., (2002), a estimulação ovariana associando eCG e FSH 36 horas antes da COL mostrou resultados semelhantes aos obtidos pela aplicação de FSH em múltiplas doses. Os resultados obtidos por Baldassarre et al., (2003b) mostraram que a COL permite a melhor utilização das fêmeas doadoras de oócitos a partir da realização de várias sessões em um mesmo animal, mantendo um número de folículos e oócitos semelhante ao passar sessões de colheita.

2.1.2. MATURAÇÃO *IN VITRO*

A MIV é considerada uma das etapas mais importantes da produção *in vitro* de embriões. Durante essa fase, diversas alterações são observadas no oócito. Essa etapa consiste em proporcionar, sob condições artificiais, o desenvolvimento dos oócitos para a fecundação e o subsequente desenvolvimento embrionário. Contudo, mesmo apresentando elevada heterogeneidade, os oócitos imaturos destinados à PIV sofrem influência das condições de cultivo durante a MIV (COGNIÉ & POULIN, 2006). Assim, torna-se necessário realizar a MIV em condições favoráveis ao oócito uma vez que o desenvolvimento embrionário é influenciado por eventos que ocorrem durante o processo de maturação oocitária.

A MIV é um conjunto de alterações sofridas pelo oócito que o torna apto à fecundação. Dois eventos definem o sucesso do processo, a maturação nuclear e citoplasmática (TIBARY et al., 2005). Somente uma pequena proporção de oócitos maturados *in vitro* pode completar a maturação citoplasmática, conferindo a habilidade para suportar o desenvolvimento embrionário inicial (CROZET et al., 1995). Nesse sentido, a qualidade oocitária é considerada o fator chave que influencia a PIV de embriões (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2007).

A competência ao desenvolvimento durante a MIV é determinada por fatores como protocolos de estimulação ovariana, o folículo de origem e das condições de maturação utilizadas nesse processo.

No que se refere aos meios utilizados para a MIV, muitos protocolos já foram desenvolvidos com elevadas taxas de maturação ao final do processo (COGNIÉ & POULIN, 2006; KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2007).

Os protocolos de MIV desenvolvidos utilizam soro no meio de maturação, pois este é considerado uma fonte de hormônios e fatores de crescimento. A proporção desses fatores na

composição no soro é desconhecida, o que dificulta a mimetização completa do processo de MIV (TAJIK & ESFANDABADI, 2003).

Rodríguez-Dorta et al. (2007) utilizaram para a espécie caprina o meio TCM 199 suplementado com 10 ng/mL de EGF, acrescido de 100 μ M de cisteamina, obtendo sucesso na PIV de embriões desta espécie. Além da composição do meio de maturação utilizado fatores tais como, temperatura, atmosfera gasosa e período de incubação apresentam importância fundamental nos resultados finais do processo (COGNIÉ & POULIN, 2006). Contudo, há muito ainda a se elucidar sobre as condições ideais para a realização da MIV na espécie caprina, necessitando-se verificar o sistema de cultivo mais adequado para suportar a maturação oocitária.

O processo de maturação oocitária envolve além da maturação nuclear, a maturação citoplasmática e molecular, nas quais ocorre rearranjo nas organelas (FAIR et al., 1995) e síntese de RNA mensageiro (WU et al., 1996) pontos considerados igualmente importantes para a posterior fecundação e o subsequente desenvolvimento embrionário.

2.1.2.1. MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA

A maturação citoplasmática é um processo pelo qual diversas mudanças ultra-estruturais ocorrem em termos de morfologia e redistribuição de organelas no citoplasma do oócito (FERREIRA et al., 2009). A primeira evidência da competência a maturação citoplasmática encontra-se nas alterações ultra-estruturais, onde se observa o fim da fase de preparação (síntese de RNA e proteínas), por modificações nos processos de transcrição e tradução (FAIR et al., 1995). Tais modificações ocorrem inicialmente durante a oogênese e encontram-se altamente correlacionadas a competência oocitária (HYTELL et al., 1997). O processo de maturação citoplasmática inclui ainda o acúmulo de moléculas específicas importantes que preparam o oócito para fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário (HUMBLLOT et al., 2005).

Durante essa fase de desenvolvimento, o oócito aumenta de tamanho, acompanhado do acúmulo de RNAm, proteínas, substratos e nutrientes, os quais são pré-requisitos para o oócito tornar-se competente (SIRARD et al., 2006). Dentre as outras mudanças, durante a fase de maturação citoplasmática, observa-se a redistribuição das organelas celulares (FERREIRA et al., 2009).

Segundo Hytell et al. (1997), inicialmente as mitocôndrias ocupam regiões mais periféricas do citoplasma e a medida que a maturação acontece e alcança a metáfase II, estas organelas ocupam a posição central do oócito. Dentre as alterações dos grânulos corticais,

estes, anteriormente dispersos no citoplasma passam a ocupar a periferia do oócito (FERREIRA et al., 2009), sendo esta a mudança mais aparente da maturação citoplasmática (HYTELL et al., 1997). Após o pico de LH ocorre o rompimento da vesícula germinativa, o oócito se desenvolve até MII e apresenta os grânulos corticais alinhados com a membrana plasmática, as gotas de lipídios e as mitocôndrias adquirem uma posição mais central do oócito deixando uma zona periférica sem organelas. O espaço perivitelínico se desenvolve para evitar a poliespermia e o complexo de Golgi praticamente desaparece (HYTELL et al., 1997) (Figura 1).

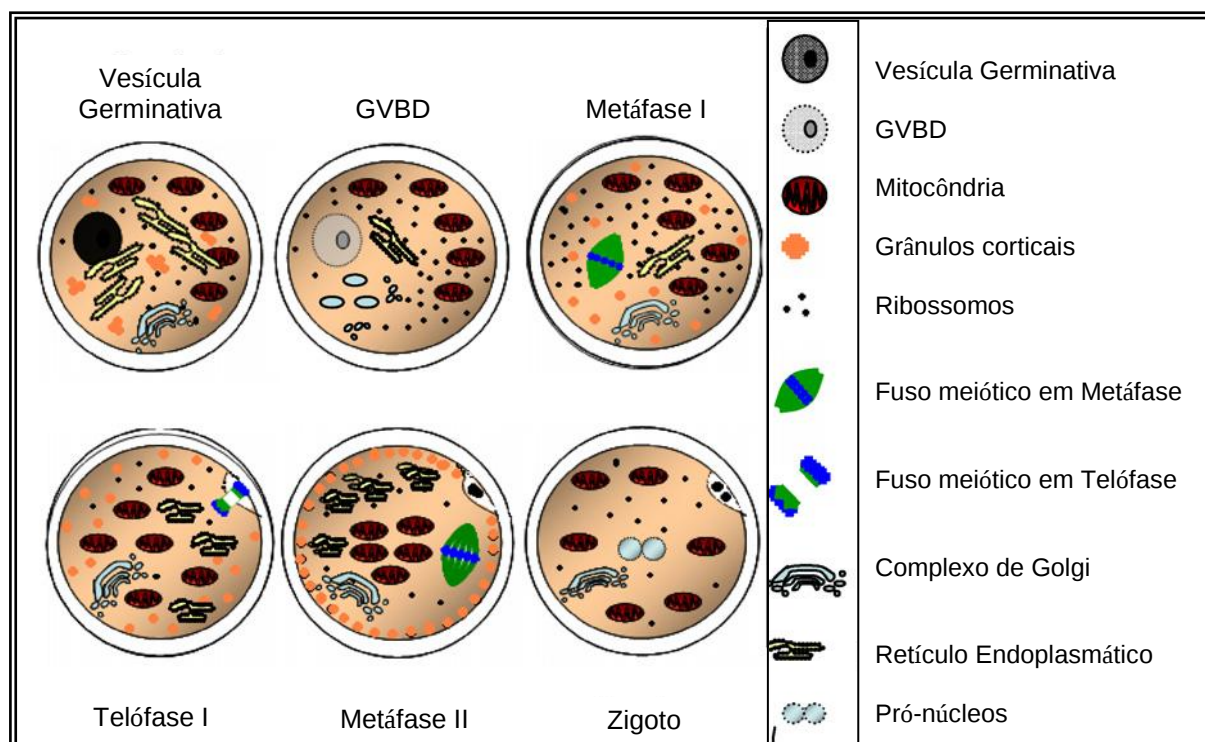


Figura 1 - Desenho esquemático da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação e formação do zigoto. (GVBD) vesícula germinativa rompida. Adaptado de Ferreira et al., 2009.

Além das organelas citoplasmáticas, os microfilamentos do citoesqueleto apresentam-se dinâmicos e as mudanças ocorrem de acordo com a necessidade da célula (FERREIRA et al., 2009). As alterações na conformação desses filamentos são responsáveis pela segregação dos cromossomos durante a mitose e meiose, pela divisão celular durante a citocinese e pelo tráfego de moléculas e organelas no interior da célula. Durante a fase de transição de vesícula germinativa a anáfase I, os filamentos de actina encontram-se abundantes e distribuídos na região cortical do oócito, Durante a metáfase I os microtúbulos se associam as tubulinas formando o fuso meiótico e a placa metafásica é formada. O oócito em metáfase II mostra

uma abundância em filamentos de actina que se encontram na região cortical do oócito (FERREIRA et al., 2009) (Figura 2).

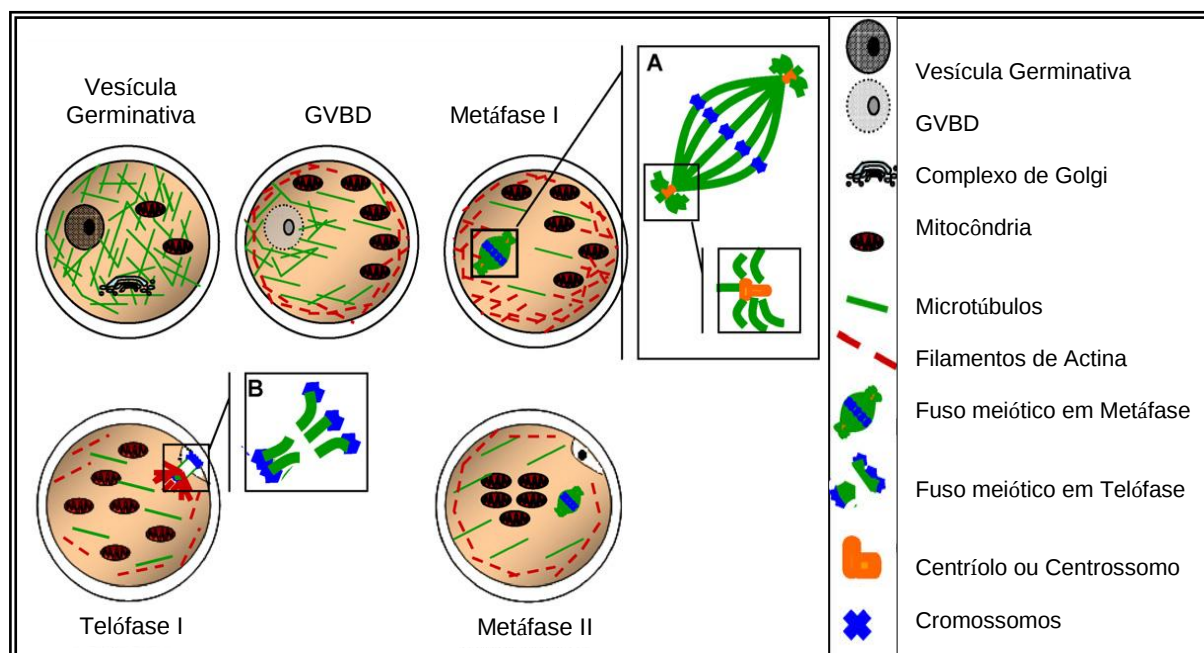


Figura 2 - Dinâmica dos filamentos no citoesqueleto durante a maturação citoplasmática e nuclear. (A) Detalhe do fuso meiótico em metáfase I e centríolos/estrutura do centrossomo. (B) Detalhe do fuso meiótico em telófase I mostrando os microtúbulos. (GVBD) vesícula germinativa rompida. Adaptado de Ferreira et al., 2009.

Outro parâmetro morfológico que avalia a maturação citoplasmática é a expansão das células do *cumulus* (KRUIP et al., 1983). A análise microscópica de oócitos maturados *in vitro* mostrou que as células do *cumulus* se expandem, o citoplasma é morfológicamente normal e uma grande de complexo de Golgi é observada (DIEZ et al., 2005). Assim, a ausência ou reduzido número de células do *cumulus* mostrou um efeito negativo sobre a produção de embriões (BLONDIN & SIRARD, 1995) e estas células contribuem de forma efetiva na aquisição da competência do oócito. Por outro lado, Zhang et al., (1995) verificaram que oócitos desnudos são capazes de alcançar MII, no entanto são incompetentes para a fecundação e desenvolvimento embrionário normais.

2.1.2.2. MATURAÇÃO NUCLEAR

Durante desenvolvimento folicular o oócito deve ser capaz de adquirir a competência meiótica de forma progressiva. Assim, na enquanto a oogênese ocorre a ovogônia passa por uma fase de crescimento e então ocorre a parada do desenvolvimento em prófase I da meiose.

A retomada do desenvolvimento do oócito ocorre durante a foliculogênese onde inicialmente ocorre o rompimento da vesícula germinativa (GVBD), seguido pela progressão do oócito até metáfase I e finalmente alcançando a metáfase II onde se observa a extrusão do primeiro corpúsculo polar (FARIN et al., 2007), onde ocorre a segunda parada da meiose. A retomada da meiose ocorrerá apenas após a fecundação onde este finalizará a meiose II, ocorrendo assim a extrusão do segundo corpúsculo polar (Figura 3).

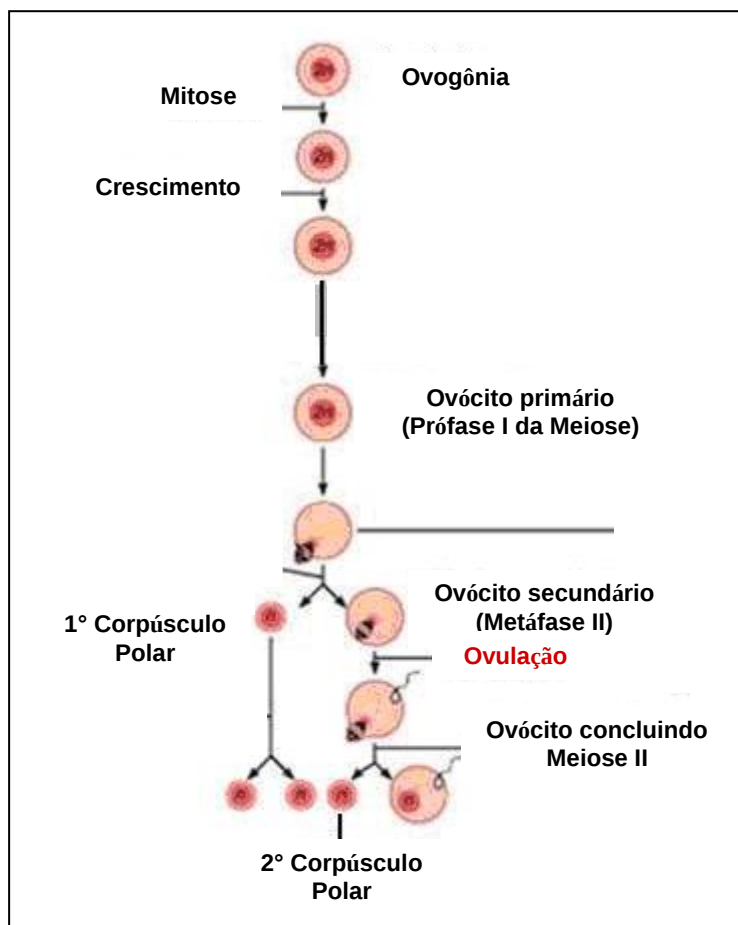


Figura 3 – Desenvolvimento oocitário durante a oogênese.

A influência da qualidade do oócito no desenvolvimento potencial do embrião tem sido reconhecida em diversas espécies. Assim, conceitos como competência oocitária, maturação do oócito, diferenciação folicular tem sido vistos como fatores que atuam conjuntamente na qualidade do embrião (SIRARD et al., 2006).

A competência meiótica é conhecida como uma cascata de eventos que é induzida pelo pico do LH e pela remoção do oócito do ambiente folicular. Tais eventos são programados para ocorrer mediante a formação do Fator Promotor da Maturação (MPF), o qual é uma proteína composta pela ciclina B1 e P32cdc2, esta é sintetizada e/ou ativada atuando sobre o oócito que evolui e termina a metáfase I e conseqüentemente a extrusão do primeiro

corpúsculo polar completando a primeira divisão meiótica (SIRARD et al., 2006). No entanto, apenas o oócito em metáfase II encontra-se apto ao subsequente processo de fecundação.

Na retomada da maturação e ativação do MPF, *c-mos* kinases e MAP kinases dirigem e controlam o ciclo celular bem como a condensação dos cromossomos e quebra da vesícula germinativa. Esse processo requer a reorganização do citoesqueleto e a expressão de fatores-chaves que dirigem o desenvolvimento (EICHENLAUB-RITTER & PESCHKE, 2002).

Tem sido descrito que a condensação da cromatina requer uma ativação parcial do fator promotor de maturação, sendo este processo considerado um pré-requisito para o rompimento da vesícula germinativa. Assim, para que esse processo ocorra, inicialmente verifica-se um aumento nos níveis de LH e FSH. No entanto, contrariamente da maturação nuclear, a maturação citoplasmática não parece ser afetada durante a superovulação com gonadotrofinas (KUMAR et al., 1992).

2.1.2.3. ASPECTOS MOLECULARES E INTERAÇÃO OÓCITO-CÉLULAS DO CUMULUS

Durante o desenvolvimento folicular, ocorre proliferação, diferenciação e alterações nas secreções das células foliculares. Estes eventos são regulados por ações autócrinas, parácrinas e endócrinas. Os mecanismos endócrinos relacionados ao processo já se encontram bem estabelecidos, no entanto, as ações que regulam a ação intraovariana ainda necessitam muitos estudos. Tais estudos são realizados principalmente por meio de cultivo celular *in vitro* (SIRARD et al., 2006).

A cada avanço obtido com estudos dos processos relacionados à maturação do oócito, verifica-se que as alterações nesta célula são de grande importância para a obtenção da competência oocitária. Assim, torna-se necessário compreender como a sincronia da maturação nuclear e citoplasmática contribui para a aquisição dessa competência e quais processos moleculares encontram-se envolvidos. A maturação molecular é ainda muito indefinida, no entanto acredita-se que envolva a síntese e estoque de proteínas e RNAs (ácidos ribonucléicos) mensageiro dias antes da ovulação (SIRARD et al., 2006). A diferença entre um oócito competente ao desenvolvimento e um incompetente pode estar relacionado com o estado de diferenciação no folículo de origem. Acredita-se que a maturação molecular envolva a associação de fatores intrínsecos de capacidade do oócito refletindo no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

Assim, através do crescimento e maturação do oócito, a associação deste com as células do *cumulus* é essencial para manter a funcionalidade do folículo e do CCO em desenvolvimento (KRISHER, 2004).

A esteroidogênese refere-se ao processo pelo qual células especializadas sintetizam hormônios esteróides (STOCCO, 2001) a partir de um precursor comum, o colesterol, sendo a disponibilidade deste determinante para a produção hormonal. O folículo ovariano produz através das células da teca e granulosa, hormônios esteróides cuja concentração e atividade biológica variam de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular. O conceito clássico de regulação ovariana, no entanto tem sido expandido incluindo um sistema complexo que envolve regulação parácrina e autócrina de fatores de crescimento. Dentre esses, encontra-se o fator de crescimento epidermal (EGF).

Do ponto de vista funcional, a interação entre os fatores de crescimento e os CCOs pode resultar em mudanças na produção de esteróides pelas células foliculares, e assim indiretamente afetar a maturação *in vitro* (LORENZO et al., 1997).

Na transcrição, a formação do estoque de RNA e proteínas ocorre durante o crescimento folicular e cessa quando ocorre o rompimento da vesícula germinativa e retomada da meiose, onde os cromossomos encontram-se condensados e “inativos” (GANDOLFI & GANDOLFI, 2001). Segundo esses autores, a atividade transcricional leva a formação de um estoque citoplasmático de moléculas mensageiras que poderão ser traduzidas posteriormente. O armazenamento dessas moléculas é essencial para promover cascatas para a ativação do genoma embrionário e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário inicial. Assim, o oócito desenvolveu uma série de estratégias para estoque moléculas na forma quiescente e seu uso no momento da maturação ou desenvolvimento embrionário.

Segundo Eichenlaub-Ritter & Peschke (2002), a fase mais ativa da expressão gênica está na oogênese quando ocorre a proliferação das células foliculares e crescimento do oócito preparando-o para ovulação em metáfase II. Fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos são essenciais para a foliculogênese normal e formação de um oócito com elevada competência ao desenvolvimento. A fase de crescimento relativo do oócito, aumento no tamanho do folículo e proliferação de células foliculares difere entre as espécies.

No que se refere ao início do processo de maturação esta ocorre pela remoção do oócito do folículo ovariano, o que leva a luteinização das células da granulosa e retomada da meiose. Assim, a retirada do CCO do folículo ovariano leva a perda do contato com as células murais da granulosa, antes estabelecido pelas junções tipo gap.

As junções gap são canais compostos por 6 subunidades chamadas conexinas (NEMCOVA et al., 2006), as quais são arranjadas de maneira a formar um poro central que permita a transferência de metabólitos tais como nucleotídeos, aminoácidos, açúcares e sinais que regulam a maturação meiótica (EPPIG, 2001). Assim, o rompimento dessa barreira leva a condensação da cromatina e quebra da vesícula germinativa, fazendo com que o oócito que encontrava-se em prófase I progrida até metáfase II. Nemcova et al. (2006) verificaram que a abundância relativa das conexinas contribuiu para produção *in vitro* de embriões bovinos e ainda que estas podem servir como um marcador da competência do oócito.

Estudos realizados por Richard & Sirard (1996a), mostraram que esse bloqueio do oócito em vesícula germinativa é realizado pelas células da teca atuando sobre as células do *cumulus*. Nesse processo o AMP cíclico (AMPC) foi identificado como bloqueador da meiose. Existe a hipótese de que o AMPC gerado pelas células somáticas do folículo seja transmitido ao oócito via junções gap (Figura 4). Após produzido, o AMPC liga-se a subunidade I ou II reguladora da proteína quinase (PKA). A subunidade I encontra-se localizada no oócito e a subunidade II nas células do *cumulus*. O aumento do AMPC nas células do *cumulus* induz a retomada da meiose pela quebra de vesícula germinativa e o aumento deste no oócito leva a ativação da PKA que fosforila proteínas específicas do oócito, mantendo-o imaturo (BILODEAU et al., 1993).

Durante a fase de reativação do oócito que se encontrava bloqueado em metáfase I, as gonadotrofinas ligam-se aos receptores presentes nas células do *cumulus* resultando no aumento da produção do AMPC. Durante a fase gonadotrófica, observa-se uma maior disponibilidade de AMPC nas células do *cumulus* levando a ativação de proteínas tais como a proteína kinase A II (PKA II), proteína kinase C (PKC) e proteínas kinases ativadoras de mitógenos (MAPK). Assim, a ativação da MAPK e Fosfatidil-inositol 3 kinase (PI3K)/PKB (via sistema EGF) reduz o nível de AMPC dentro do oócito pela fosforilação da conexina 43 (cx-43) e fosfodiesterase 3 (PDE3). O processo de fosforilação obtido leva a ativação do MPF e conseqüentemente ao rompimento da vesícula germinativa e assim o oócito pode retomar a meiose (ZHANG et al., 2009) (Figura 4).

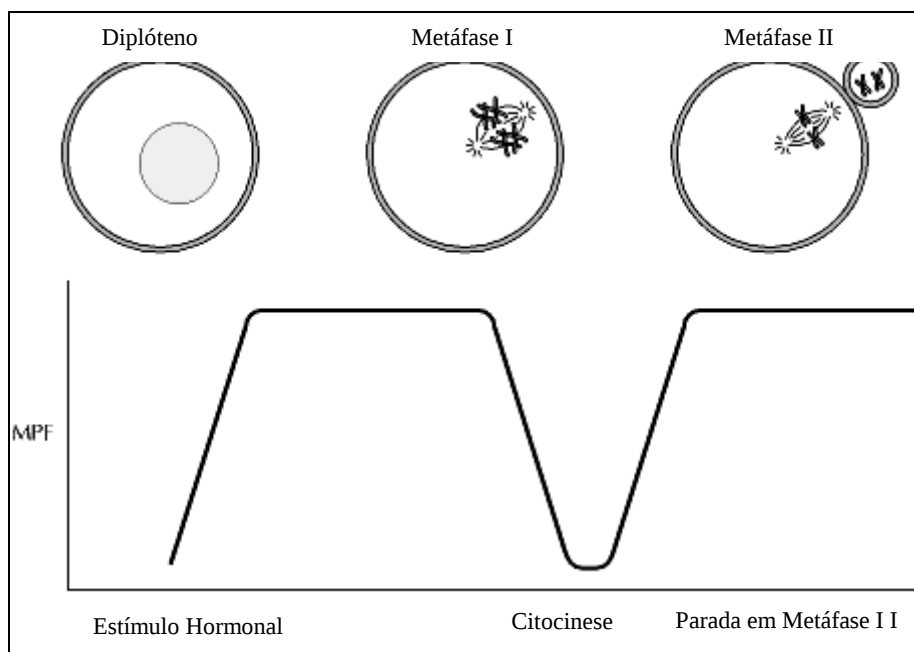


Figura 5 - Perfil oscilatório do fator promotor de maturação (MPF) durante a retomada da meiose e alcance da metáfase II.

Outra quinase envolvida na maturação oocitária é pertencente à família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Estas respondem a estímulos extracelulares regulando várias atividades tais como a expressão gênica, divisão, diferenciação e sobrevivência celular (PEARSON et al., 2001). A ativação das MAPKs em bovinos ocorre juntamente com o MPF, pouco tempo antes da quebra da vesícula germinativa, sendo a atividade das MAPKs progressivamente aumentada durante as 24 h de maturação *in vitro* (GORDO et al., 2001). Esse estudo revelou ainda que a MAPK promove a estabilidade do MPF e que esta também é responsável pela organização microtubular que irá fazer a configuração cromossômica correta no estágio de metáfase II.

A competência ao desenvolvimento está também associada ao acúmulo de p34 no fim do desenvolvimento oocitário e quantidade suficiente de ciclina B para haver matéria-prima necessária para o pré-MPF (ANGUITA et al., 2007). Além disso, os efeitos da deficiência/atividade de MAPK na competência meiótica não são conhecidos, porém níveis inadequados desta proteína podem afetar alguns eventos de ativação oocitária (GORDO et al., 2001).

Apesar dos conhecimentos gerados com o passar dos anos sobre os mecanismos de desenvolvimento do oócito, fatores que determinam a qualidade do oócito ainda não foram desvendados. Assim, para a PIV de embriões, fatores como a qualidade oocitária são de fundamental importância e esta é indicada como um fator chave que pode atuar

negativamente no sucesso desta biotécnica (MACHALKOVA et al., 2004). Esse fato gera indícios que os oócitos oriundos de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento leva a formação de uma população diferentemente competente ao desenvolvimento *in vitro*. De acordo com Assey et al., (1994), as alterações pré-maturacionais ocorrem em virtude da responsividade do folículo a pulsatilidade do LH antes do pico ovulatório, sendo estas modificações pré-requisitos para o oócito alcançar a competência ao desenvolvimento.

2.1.3. EGF E MATURAÇÃO OOCITÁRIA

A maturação é o processo pelo qual o oócito sofre alterações importantes que conferem competência ao subsequente desenvolvimento embrionário. Diversos estudos sugerem que a expansão das células do *cumulus* é regulada por fatores de crescimento produzidos pelo ovário. O papel crucial da regulação da maturação e expansão das células do *cumulus* tem sido atribuído ao EGF. Este fator de crescimento é um polipeptídeo constituído por 53 aminoácidos e apresenta seu papel comprovadamente positivo sobre o processo de maturação *in vitro* (FARIN et al., 2007; GRAZUL-BILSKA et al., 2003)

O EGF e seu receptor (EGFR) foram encontrados no ovário e segundo Prochazka et al., (2003) estes parecem ser espécie-específicos. Ambos EGF e EGFR foram identificados em células da granulosa e células do *cumulus* (GALL et al., 2004). A expressão e função do receptor de EGF nas células do *cumulus* indicam seu papel significativo no processo de maturação via células do *cumulus* (GALL et al., 2005).

Estudos anteriores verificaram a presença do EGFR em oócitos e nas células do *cumulus* (GALL et al., 2004; PROCHAZKA et al., 2003). No entanto, foi visto que os fatores de crescimento semelhantes ao EGF exercem efeito sobre a maturação de CCOs, mas não em oócitos desnudos (PARK et al., 2004). Estudos realizados por HILL et al., (1999) levaram a hipótese de que as células do *cumulus* são o maior sítio de ação do EGF e que este fator de crescimento geram sinais para o oócito via junções gap.

A qualidade do oócito exerce influência significativa sobre o desenvolvimento e sobrevivência do embrião. Assim, sabe-se que a atividade ovariana é regulada não apenas por hormônios de forma endócrina como também por fatores autócrinos e parácrinos de fatores de crescimento locais (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). A respeito destes fatores, o EGF parece ser o mais importante regulador da fisiologia ovariana (SILVA et al., 2004).

O EGF influencia a maturação oocitária e a produção de blastocistos em diversas espécies de mamíferos (GRAZUL-BILSKA et al., 2003). Alguns estudos realizados

mostraram que o EGF pode estar envolvido na regulação do crescimento folicular e na maturação de oócitos caprinos (GALL et al., 2004).

Assim, com o objetivo de melhorar esses processos *in vitro*, diversos protocolos estão sendo desenvolvidos visando mimetizar as condições *in vivo* de maturação oocitária. Nesse contexto, os fatores de crescimento identificados no ovário têm sido vistos como reguladores da função ovariana. Desta forma, meios de cultivo suplementados com fatores de crescimento tais como o EGF tem sido utilizado para estudar seu papel potencial na maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro*. Para mimetizar esse processo *in vitro* é necessário compreender os fatores que estão envolvidos na maturação. Segundo Hatoya et al., (2009), é aceito que as células do *cumulus* em mamíferos suportam a diferenciação meiótica e oocitária, no entanto essa afirmativa ainda encontra-se sob investigação.

A presença de RNAm para o EGFR tem sido identificado no fluido folicular e em oócitos em espécies como em caprinos (SILVA et al., 2006), suínos (SINGH et al., 1995) e humanos (QU et al., 2000). O EGF regula o crescimento do oócito e pode ser responsável por estimular a maturação nuclear e citoplasmática. Estudos recentes verificaram que os fatores de crescimento ligantes de EGF são mediadores parácrinos de sinalização do LH durante a ovulação (HSIEH et al., 2007; PARK et al., 2004). Adicionalmente, efeito positivo da adição de EGF em meio de maturação foi verificado em espécies incluindo a canina (HATOYA et al., 2009) e suína (AKAKI et al., 2009).

Em felinos foi demonstrado que o EGF apenas como suplemento no meio de MIV levou ao desenvolvimento do oócito até metáfase II e que o EGF é requerido pelo FSH para a progressão meiótica do oócito (FARIN et al., 2007).

A adição de FSH e EGF em meio de MIV induziu a maturação do oócito e expansão das células do *cumulus* bem como melhorou a competência ao desenvolvimento em bovinos (LONERGAN et al., 1996) e em cães ((HATOYA et al., 2009). Similarmente, os fatores de crescimento semelhantes ao EGF amfiregulina, epiregulina e betacelulina também induzem a maturação *in vitro* de CCOs murinos (PARK et al., 2004).

Em ovinos meio de MIV suplementado com EGF alterou a morfologia dos CCOs e levou a uma maior expansão das células do *cumulus* se comparado ao grupo controle sem EGF (GRAZUL-BILSKA et al., 2003). O EGF causa a expansão das células do *cumulus* pela síntese de ácido hialurônico, um glicosaminoglicano que interage especificamente com componentes da matriz extracelular (TIRONE et al., 1997). O EGF provavelmente exerce efeito direto sobre as células do *cumulus* através de receptores de EGF nestas células detectado em diversas espécies incluindo a suína (YOSHIDA et al., 1998) e humana (QU et al., 2000).

Diversos trabalhos têm demonstrado o processo pelo qual o EGF atua sobre a maturação de CCOs. Assim, Akaki et al., (2009) mostraram que ambos EGF e o AMPc são necessários para a retomada da meiose em suínos e verificaram ainda que a atividade do EGF sobre a maturação *in vitro* é provavelmente mediada pela proteína kinase.

Estudos realizados em camundongo revelaram que o FSH induziu a produção de estrógeno estimulando o desenvolvimento folicular para o estágio pré-ovulatório e o surgimento do LH induzindo a atuação de fatores secundários como a progesterona, PGE₂ e ligantes do EGF que mediam a expansão do *cumulus* e maturação do oócito. De acordo com Park et al., (2004), o LH induz em folículos pré-ovulatórios a produção de crescimento semelhantes ao EGF que atuam sobre a expansão do COC e retomada da meiose.

Eichenlaub-Ritter & Peschke (2002) verificaram que após GVBD a expressão gênica está sob controle pós-transcricional, que envolve degradação, estabilização e estoque de transcritos para posterior utilização nos processos celulares traducionais. Sob aspecto molecular, foi verificado em bovinos que o EGF pode acelerar o tempo de extrusão do primeiro corpúsculo polar através do aumento da atividade do fator promotor de maturação (MPF) e MAP kinase (SAKAGUCHI et al., 2000). Estudos realizados por Gall et al., (2004) demonstraram que o receptor de EGF aumentou a expressão durante o crescimento do oócito e que seguiu padrões semelhantes ao observado pelo P34^{cdc2} (HUE et al., 1997), ciclina B (DEDIEU et al., 1998) e Cdc25 (GALL et al., 2002), sugerindo que a competência meiótica pode estar correlacionada com a expressão do EGFR. Apesar dos diversos estudos envolvendo este fator de crescimento, ainda não foi estabelecido se o EGF atua diretamente sobre o oócito ou via células do *cumulus* ou por ambos. Alguns estudos realizados em bovinos (LONERGAN et al., 1996) e em camundongos (DAS et al., 1991) mostraram que a atuação do EGF ocorre diretamente sobre oócitos desnudos como em COCs. Esses dados sugerem que o efeito do EGF pode estar em parte independente das células do *cumulus* e que o EGF pode ainda atuar diretamente sobre o oócito via EGFR.

2.2. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO-REAL

2.2.1. PRINCÍPIOS

O PCR quantitativo (qPCR) em tempo real é uma técnica desenvolvida através do refinamento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, originalmente desenvolvida por Kary Mullis e seu grupo (SAIKI et al., 1985) na metade da década de 80. Através do PCR, essencialmente qualquer sequência de ácido nucléico presente em uma amostra complexa pode ser amplificada em um processo cíclico para gerar um grande

número de cópias idênticas as quais podem ser prontamente analisadas. Isso torna possível, por exemplo, manipular o DNA para propósitos de clonagem, engenharia genética e sequenciamento. No entanto, o método de PCR original (*end-point* PCR) apresenta forte restrição como técnica analítica quantitativa. Isso ocorre porque a quantidade de produto de amplificação gerado é essencialmente o mesmo, independente da quantidade original de moléculas-molde de DNA presente na amostra. Assim, o PCR convencional permite apenas a distinção entre amostras positivas e negativas para determinado molde de DNA (KUBISTA et al., 2006).

Diferentemente do PCR original a técnica de PCR em tempo real apresenta como principal importância determinar de forma rápida e exata as mudanças de expressão gênica resultantes de fenômenos patológicos ou fisiológicos. Assim, o uso do PCR em tempo real possibilita correlacionar a fisiopatologia com os eventos moleculares e assim compreender melhor os processos biológicos (LEJONA et al., 2006).

A limitação da técnica original foi resolvida pelo desenvolvimento do PCR em tempo real por Higuchi et al. (1992), o qual acrescentou brometo de etídio à reação de amplificação. No PCR em tempo real, a quantidade de produto formado é monitorado no decorrer da reação através da fluorescência de moléculas intercalantes de dupla-fita de DNA (ZIPPER et al., 2004; BENGTSSON et al., 2003) ou oligonucleotídeos marcados (HOLLAND et al., 1991). O sinal de fluorescência é proporcional à quantidade de produto e o número de ciclos térmicos necessários para a obtenção de uma quantidade particular de moléculas de DNA é registrado. Assumindo uma certa eficiência de amplificação, a qual é tipicamente relacionada à duplicação do número de moléculas por ciclo, é possível calcular o número original de moléculas da sequência amplificada presente na amostra (RUTLEDGE & COTE, 2003)

O qPCR é uma técnica amplamente utilizada para a quantificação de expressão gênica (PABINGER et al., 2009). Com o passar dos anos, maior disponibilidade de aparelhos, acessibilidade de preços e reagentes a técnica de PCR em tempo real passou a ser mais utilizada e difundida (GINZINGER, 2002).

Tendo em vista a detecção altamente eficiente imposta pelos modernos reagentes químicos e pela sensível instrumentação, além dos ensaios otimizados que estão disponíveis atualmente, o número de moléculas de DNA de uma sequência específica em uma amostra complexa pode ser determinado com uma exatidão sem precedentes e com sensibilidade suficiente para a detecção de uma única molécula (KUBISTA et al., 2006).

Várias plataformas têm sido propostas para aumentar a acurácia do qPCR em tempo real para essa aplicação, sendo baseadas no método de curva padrão externa (quantificação absoluta ou relativa) ou no Ct comparativo (INGHAM et al., 2001; BALLESTER et al.,

2004). A realização da construção de uma curva padrão baseada em diluição em série é recomendado para o PCR quantitativo, pois representa um controle adicional da eficiência da amplificação (RAEYMAEKERS et al., 2000).

Pela técnica de PCR em tempo real é possível ver a dinâmica das curvas de amplificação devido à presença dos fluorocromos unidos as sondas de hibridização que são detectadas e analisados mediante um programa de informática (WONG & MEDRANO, 2005).

É possível estabelecer com exatidão que o sinal de fluorescência de uma determinada amostra ultrapassa um nível mínimo basal, sendo denominado ponto de cruz da curva (*Ct-crossing point* o *threshold cycle*). Este princípio estabelece a base de quantificação do PCR em tempo real. A detecção da fluorescência para um determinado gene é proporcional a quantidade desse gene na amostra, assim quanto maior a quantidade de gene mais precocemente será detectada a fluorescência (VELASCO et al., 2006).

Existem dois métodos fundamentais para a quantificação do PCR em tempo real. Na quantificação absoluta emprega-se o uso da curva-padrão onde se leva em consideração o valor de Ct do gene de estudo. Já a quantificação relativa emprega-se uma amostra que recebe um valor de 100% e sobre este valor quantifica-se de forma relativa a amostra de estudo (KLEIN, 2002). No entanto, independentemente da quantificação utilizada o estudo deve considerar simultaneamente o gene de interesse e um gene de referência que deve se expressar de maneira constante nas células (AROCHO et al., 2006).

2.2.2. APLICAÇÃO EM EXPRESSÃO GÊNICA

PCR em tempo real tem sido um método padrão para mensurar e verificar mudanças na expressão gênica através da avaliação da quantidade de mRNA (ONG & IRVINE, 2002). Assim, esse método de avaliação tem sido cada vez mais difundido na comunidade científica em virtude da praticidade e por levar a uma avaliação mais precisa do perfil de mudança na expressão no momento em que está sendo executado.

Dentre as utilizações típicas do PCR em tempo real incluem detecção de patógenos (MACKYA, 2004), análise de expressão gênica (LEVSKY et al., 2002), de SNPs (*single nucleotide polymorphism*) (MHLANGA & MALMBERG, 2001), de aberrações cromossômicas (MATTARUCCHI et al., 2005), de organismos transgênicos (SONG et al., 2002; SAKURAI et al., 2008), expressão gênica na determinação de polimorfismos causadores de enfermidades genéticas (LUALDI et al., 2006; TRAN et al., 2006),

mensuração do número de cópias no genoma (GINZINGER et al., 2000) e detecção pré-natal de trissomia cromossômica (GINZINGER, 2002).

A técnica de PCR quantitativo em tempo real mostra elevada sensibilidade e especificidade, sendo esta utilizada com eficiência no diagnóstico de doenças em medicina veterinária (GARCÍA et al., 2007) e aplicações em estudos sobre reprodução animal (CHEN et al., 2009; NEMCOVA et al., 2006).

No que se refere a aplicabilidade dessa técnica em reprodução, cada vez mais tem-se estudado as mudanças na expressão correlacionadas com processos fisiológicos. Com relação ao estudo dos processos *in vitro* tem-se estudado as alterações de expressão gênica em oócitos e células do *cumulus* durante o desenvolvimento final (KAWASHIMA et al., 2008) e folicular (CHEN et al., 2009), MIV e desenvolvimento embrionário inicial (BEBBERE et al., 2008; NEMCOVA et al., 2006), bem como viabilidade embrionária após criopreservação (LEONI et al., 2009). Realizar estudos de expressão gênica é de fundamental importância para compreender os processos fisiológicos e através destes realizar melhorias nas diferentes etapas de produção *in vitro* de embriões e assim alcançar resultados mais eficientes na referida técnica.

3 JUSTIFICATIVA

A produção *in vitro* (PIV) de embriões envolve as etapas de colheita de oócitos, maturação, fecundação e cultivo *in vitro* dos embriões. Em caprinos, assim como em outras espécies, a etapa de MIV é considerada uma das mais importantes e críticas para o sucesso da PIV de embriões. Compreender os mecanismos que regem esse processo é considerado de extrema importância uma vez que dele depende o sucesso da fecundação bem como o desenvolvimento embrionário inicial. Os processos moleculares que envolvem a maturação *in vitro* de oócitos são pouco elucidados. A complexidade desse processo envolve desde o desenvolvimento do oócito dentro do folículo ovariano até os meios utilizados na etapa de maturação. Além disso, estudar os mecanismos moleculares que influenciam a diferenciação do oócito dentro do folículo é um caminho para compreender a complexidade desse processo e alcançar melhorias significantes nos programas de reprodução assistida em animais.

Assim, estudar a maturação de oócitos caprinos em nível molecular pode fornecer novas informações sobre esse mecanismo. Em adição, avaliar os efeitos que diferentes tratamentos de estimulação ovariana possam ter sobre a qualidade oocitária e a posterior competência meiótica torna-se importante para alcançar melhorias no sistema de maturação *in vitro* conseqüentemente na produção *in vitro* de embriões caprinos.

Aliado a isso, a utilização da raça naturalizada Canindé permitirá elucidar respostas inerentes aos processos fisiológicos relacionados a essa raça no que diz respeito à maturação oocitária. Além disso, estudar especificamente o receptor de EGF em oócitos e células do *cumulus* permitirá compreender o mecanismo pelo qual o EGF atua sobre a foliculogênese terminal após estimulação hormonal ovariana com FSH.

Finalmente, o uso uma ferramenta moderna e precisa como a técnica de PCR quantitativo em tempo real adicionará informações inexistentes até o momento para a espécie caprina, em geral, e as raças naturalizadas, em particular.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

A administração de FSH em três ou cinco doses aumenta a expressão de EGFR em oócitos e células do *cumulus* colhidos por laparoscopia em cabras da raça Canindé.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de dois tratamentos hormonais de estimulação ovariana distintos na expressão de EGFR em oócitos e células do *cumulus* obtidos de cabras Canindé, utilizando o método de RT-PCR quantitativo em tempo real.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o nível de expressão do EGFR em oócitos e células do *cumulus* de cabras Canindé previamente tratadas para estimulação ovariana em três ou cinco doses;
- Avaliar a influência da qualidade do oócito (GI/GII e GIII) sobre a expressão do EGFR em oócitos e células do *cumulus*;
- Verificar se existe diferença na expressão do EGFR em oócitos e células do *cumulus* após o processo de maturação *in vitro*.

6 CAPÍTULO 1

Análise por qRT-PCR em tempo real do receptor de EGR em complexos *cumulus*-oócito colhidos por laparoscopia em caprinos tratados hormonalmente

(Real-time qRT-PCR analysis of EGF receptor in cumulus-oocyte complexes recovered by laparoscopy in hormonally treated goats)

Periódico: Zygote (Submetido em Outubro de 2009)

Fator de impacto: 1,067

Resumo:

A estimulação ovariana com hormônio folículo estimulante (FSH) exógeno tem sido utilizada para aumentar o número de oócitos viáveis para a colheita de oócitos por laparoscopia (COL) em cabras. O objetivo desse estudo foi determinar o efeito de dois protocolos de estimulação ovariana sobre a expressão do receptor de EGF (EGFR) em complexos cumulus-oócito (CCOs), recuperados por COL em caprinos. Após análise por qRT-PCR em tempo real, o perfil de expressão de CCOs classificados morfologicamente foi comparado antes e após a maturação *in vitro* (MIV), nos distintos protocolos de FSH. A utilização do protocolo com maior número de injeções de FSH a um curto intervalo de tempo resultou em CCOs GI/GII com um maior nível de expressão de EGFR nas células do cumulus, mas não no oócito, que foi correlacionado com a maior competência meiótica após a MIV. Com base no perfil de maturação e padrão de expressão do EGFR observado entre os grupos, a seleção morfológica dos CCOs antes da MIV não foi um bom parâmetro para prever a competência meiótica do oócito. Portanto, o EGFR pode ser um bom candidato a marcador por mostrar indiretamente a qualidade oocitária em caprinos. O processo de MIV de CCOs caprinos aumentou a expressão de EGFR em oócitos e células do cumulus, o que pareceu estar associado com a retomada da meiose. Em resumo, a expressão diferencial de EGFR em células do cumulus de caprinos foi associada com o processo de pré-maturação *in vivo*, e por sua vez, o aumento da regulação no CCO foi associado com a maturação. A relação de causa e efeito entre os níveis de expressão aumentados, particularmente no oócito, e a competência do mesmo necessitam ainda ser investigados.

Real-time qRT-PCR analysis of EGF receptor in cumulus-oocyte complexes recovered by laparoscopy in hormonally treated goats

K.C. Almeida¹, A.F. Pereira¹, A.S. Alcântara Neto¹, S.R.G. Avelar¹, L.R. Bertolini², M. Bertolini², V.J.F. Freitas¹, L.M. Melo¹

¹ Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Av. Dedé Brasil 1700, Fortaleza-CE, Brazil.

² Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Fortaleza, Av. Washington Soares 1321, Fortaleza-CE, Brazil.

Running headline: Real-time qRT-PCR of EGFR in goat COCs

All correspondence to: Luciana Magalhães Melo
Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução
Universidade Estadual do Ceará/Faculdade de Veterinária
Av. Dedé Brasil 1700, Fortaleza-CE, Brazil
Tel: +55 85 31019861
Fax: +55 85 31019840
e-mail: lucianamelo@uece.br

Summary

Ovarian stimulation with exogenous FSH has been used to increase the number of viable oocytes for laparoscopic oocyte recovery (LOR) in goats. The aim of this study was to evaluate the effect of two FSH protocols for ovarian stimulation in goats on the expression pattern of EGF receptor (EGFR) in cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered by LOR. After real-time qRT-PCR analysis, expression profiles of morphologically graded COCs were compared prior to and after *in vitro* maturation (IVM) on a different FSH protocols. The use of a protocol with higher number of FSH injections at a shorter interval resulted in GI/GII COCs with a higher level of EGFR expression in cumulus cells, but not in the oocyte, which was correlated with an elevated meiotic competence following IVM. Based on the maturation profile and EGFR expression patterns observed between groups, the morphological selection of COCs prior to IVM was not a good predictor of oocyte meiotic competence. Therefore, EGFR may be a good candidate marker for indirect prediction of goat oocyte quality. The IVM process of goat COCs increased the EGFR expression in oocytes and cumulus cells, which seemed to be strongly associated with the resumption of meiosis. In summary, differential EGFR expression in goat cumulus cells was associated with the *in vivo* prematuration process, and in turn, the up regulation in the entire COC was associated with IVM. Cause-and-effect relationships between such increased expression levels, particularly in the oocyte, and oocyte competence itself still need to be further investigated.

Keywords: EGF receptor, Real-time qRT-PCR, Goat, Oocyte, Cumulus cells

Introduction

Goats are among the most fertile of the domestic species, which makes their use very attractive for scientific, commercial and industrial purposes. Thus, assisted reproductive technologies have become increasingly important tools to boost the efficiency in highly

organized breeding programs or to make use of goats as bioreactors, in the context of gene pharming (Baldassarre *et al.*, 2003b). Among such technologies, the *in vitro* production of embryos distinguishes itself as it offers an alternative to superovulation as a source of embryos for transfer and manipulation purposes (Cognié & Baril, 2002).

Laparoscopic oocyte recovery (LOR) has become a method of choice for oocyte retrieval in the past few years. Due to LOR's less invasive nature and repeatability on the same donor, allowing the collection even from prepuberal, pregnant, puerperal or aged animals (Baldassarre & Karatzas, 2004), we highlight the potential beneficial use of LOR for endangered breeds. The conservation of breeds that are considered at risk of extinction, such as Canindé goats (Mariante & Egito, 2002), a breed unique to the Northeast Brazil, and used in the present work, is important for biodiversity.

To increase the number of oocytes available for recovery and, hence, the number of embryos available for transferring following *in vitro* fertilization, ovarian stimulation is usually carried out using exogenous gonadotrophins (Baldassarre *et al.*, 2003a). Years of research in goat ovarian stimulation have shown that exogenous FSH (Follicle Stimulating Hormone) can be used to increase the number of viable oocytes on a per cycle/collection basis (Baldassarre & Karatzas, 2004).

It is known that in both mono- and poly-ovulatory species follicular growth is a continuum process, controlled by the interaction between extra-ovarian factors, such as gonadotrophins, and locally produced growth factors (Van Den Hurk & Zhao, 2005; Webb *et al.*, 2007). In general, growth factors as EGF, are considered the finely modulator of follicular growth, orchestrated by FSH and LH through the surrounding somatic cells, being essential for the completion of oocyte growth and maturation (Gilchrist *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2007).

Therefore, it is not surprising that several studies have reported the FSH-induced expression of EGF and EGF-like factors in COCs or cultured follicular cells (Sekiguchi *et al.*, 2002; Shimada *et al.*, 2006; Downs & Chen, 2008). The presence of EGF in the follicular fluid of

developing follicles has been reported in mammalian species such as pigs (Hsu *et al.*, 1987) and humans (Westergaard & Andersen, 1989). EGF has also been shown to influence meiotic maturation and development competence of oocytes in various species (rat, Dekel & Sherizly, 1985; mouse and human, Das *et al.*, 1991; sheep, Guler *et al.*, 2000; cattle, Lonergan *et al.*, 1996; pig, Prochazka *et al.*, 2000), including goats (Gall *et al.*, 2005). The EGF receptor (EGFR) is the receptor for EGFs (Assidi *et al.*, 2008), and its activation may be a common pathway mediating the meiosis-inducing influence of gonadotrophins (Zhang *et al.*, 2009). The mRNA for EGFR has been identified not only in follicular cells, but also in oocytes of a number of species (dog, Hatoya *et al.*, 2009; goat, Gall *et al.*, 2004; pig, Singh *et al.*, 1995; cattle, Lonergan *et al.*, 1996; human, Qu *et al.*, 2000). Notwithstanding, cumulus cells are thought to be the major receptor-expressing site for EGFs actions, generating a positive signal transferred to the oocyte via gap junctions (Atef *et al.*, 2005).

Since the oocyte developmental competence has been associated with *in vivo* transcript accumulation, which is important for embryo development up to the genome activation (Dieleman *et al.*, 2002), it is not surprising that the competence of *in vitro* matured oocytes is determined by factors such as hormonal stimulation and the origin of the oocyte (Webb *et al.*, 2007). In this light, the aim of this study was to determine the effect of two FSH protocols for ovarian stimulation in goats on the expression pattern of EGFR in goat cumulus-oocyte complexes (COCs). After morphologically grading COCs, oocytes were stripped from cumulus cells, with both cell types analyzed by quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR). Comparisons of expression profiles were performed prior to and after *in vitro* maturation (IVM) on a distinct FSH administration protocols.

Materials and methods

Animals and bioethics

Cyclic Canindé goats (mean body weight $\pm$ SEM, 32.9 ± 0.5 kg) were selected as oocyte donors. Animals were maintained in a semi-intensive system, receiving Tifton hay (*Cynodon dactylon*) in pens and having daily access to Tifton pasture. In addition, goats were supplemented with concentrate (20% crude protein), having free access to water and mineral salt. All procedures were performed in accordance with the guidelines of animal care, according to Van Zutphen & Balls (1997).

Estrus synchronization and ovarian superstimulation

The estrous cycle of goats was synchronized using intravaginal sponges impregnated with 60 mg medroxyprogesterone acetate (Progespon, Syntex, Argentina) inserted for 11 days, along with a luteolytic injection of 50 μ g cloprostenol (Ciosin, Coopers, Brazil) in the 8th day of treatment. The ovarian stimulation was carried out using a total dose of 120 mg NIH-FSH-P1 (pFSH, Folltropin-V, Vetrepfarm, Canada), in either one of the following protocols: a) five-dose treatment, by the i.m. administration of five pFSH doses (30/30; 20/20; 20 mg) at 12 h intervals (n=18 animals), or b) three-dose treatment, by the i.m. administration of three pFSH doses (60; 40; 20 mg) at 24 h intervals (n=17 animals). In both groups, the pFSH injections started in 8th day of the progestin treatment. Both FSH stimulation protocols were performed in three sessions, with the use of five to six different animals per session per protocol.

Laparoscopic oocyte recovery (LOR)

Ovarian follicles were punctured just after the sponge removal using LOR procedures, as previously described by Baldassarre *et al.* (2003a). Briefly, goats were deprived of food for 36 h and of water 24 h prior to laparoscopy. Anesthesia was induced with intramuscular administration of 0.5 mg/10 kg body weight of 2% xilazin (Coopazine, Coopers, Brazil) and 25 mg/10 kg body weight of 10% ketamine (Ketamine, União Química, Brazil). Oocytes were aspirated from all follicles >2 mm in diameter, visible on the surface of the ovaries,

using a 22-gauge needle and a vacuum pump (Biosystem, Biocom, Brazil) set to -30 mmHg pressure. The aspiration medium consisted of TCM199 with Earle's salt, sodium bicarbonate and L-glutamine (Nutricell, Campinas, Brazil) supplemented with 10 mM HEPES, 20 iu/mL heparin and 40 µg/mL gentamicin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Oocyte grading and sampling

COCs from each stimulation protocol were isolated from the follicular contents and graded in GI to GIV based on cellular vestments and cytoplasmic uniformity, as follows:

GI: multilayered compact cumulus cells and finely granulated oocyte cytoplasm.

GII: one to three layers of cumulus cells and finely granulated oocyte cytoplasm.

GIII: incomplete or no cellular vestment or heterogeneous oocyte cytoplasm.

GIV: oocyte with abnormal shape and heterogeneous oocyte cytoplasm or apoptotic oocytes in jelly-like cumulus-corona cells vestment.

Samples of pooled immature GI and GII COCs, and most immature GIII COCs were collected for further qRT-PCR analyses. In brief, COCs from each stimulation protocol session (three sessions per protocol) were washed four times in TCM 199 with gentamicin sulfate, cumulus cells were carefully removed by repeated pipetting, and groups of 10 resulting denuded oocytes or cumulus cells from 10 denuded COCs were pooled in individual tubes, which were quickly spun and snap-frozen to be stored at -80°C until RNA extraction. Denuded GIII and all GIV COCs were discarded.

IVM and assessment of oocyte maturation

Only GI and GII COCs were selected for IVM. Groups of pooled GI/GII COCs, per stimulation protocol, were washed four times and *in vitro*-matured for 24 h, at 38.5°C and 5% CO₂ in humidified air, in IVM medium consisted of TCM199 with Earle's salt, sodium bicarbonate, and L-glutamine (Nutricell, Campinas, Brazil) as a base medium, supplemented

with 10 ng/mL EGF, 100 μ M cysteamine and 40 μ g/mL gentamicin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Following IVM, COCs were visualized under an inverted microscope (TE2000, Nikon, Japan) and cumulus cells were carefully removed by repeated pipetting. Denuded oocytes were assessed for nuclear maturation by polar body screening, with oocytes with a clear first polar body considered matured (MII), whereas oocytes with no visible polar bodies were classified as non-competent (NC). Then, for each FSH protocol and stimulation session, and similar to sampling of immature oocytes, groups of 10 resulting denuded MII or NC oocytes or cumulus cells from 10 denuded COCs (from both MII and NC COCs, as cumulus cell removal was prior to oocyte screening) were pooled in individual tubes, quickly spun and stored at -80°C until RNA extraction (Post-IVM sampling groups). Immature GI/GII COCs were used as maturation controls (Pre-IVM).

Total RNA extraction

Total RNA was prepared from pooled oocytes or cumulus cells obtained from Pre-IVM (GI/GII and GIII immature COCs) and Post-IVM (GI and GII MII or NC COCs) sampling groups using the RNeasy micro kit (Qiagen Inc., Valencia, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 75 μ L lysis buffer was added to each frozen sample and the lysate was diluted 1:1 with 70% ethanol and transferred to a spin column. Genomic DNA was degraded using RNase-free DNase for 15 min at room temperature. After three washes, the RNA was eluted with 12 μ L RNase-free water.

Reverse transcription

Prior to reverse transcription, RNA samples from each cell type replicate and 20 μ M oligo-dT primer (Promega, Madison, USA) were heated to 70°C for 5 min, to disrupt possible secondary structures, and then snap-cooled on ice. Thereafter, 1 μ L of Improm II (Promega, Madison, USA) in reverse transcription buffer, were combined with 0.5 mM of each dNTP

(Promega, Madison, USA), 2 U/ μ L of RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, USA), and RNase-free water to make a final reaction volume of 20 μ L. Reverse transcription was performed at 42°C for 60 min, followed by 70°C for 15 min. The first strand cDNA products were then stored at -20°C for later use as template for qRT-PCR. Negative controls or RT blanks were prepared under the same conditions, but without inclusion of reverse transcriptase.

Quantitative real-time polymerase chain reaction

The PCR amplifications were performed in a MasterCycler ep Realplex (Eppendorf Realplex 4s, Hamburg, Germany). The three cDNA replicates from each cell type (oocytes or cumulus cells) were pooled prior to the PCR experiments, which were run in triplicates for EGFR and GAPDH genes, for each cell type. Each reaction consisted of 20 μ L total volume containing 10 μ L 2 $\times$ FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, Mannheim, Germany), 0.2 μ M of each primer (Table 1) and 1 μ L cDNA. The PCR protocol comprehended an initial incubation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of an amplification program of 95°C for 15 s, 55°C for 15 s and 60°C for 30 s. Fluorescence data was acquired during the 72°C extension steps. To determine the linearity (R^2) and the efficiency (E) of the PCR amplifications, standard curves were generated for each gene using serial dilutions of a cDNA preparation from ten immature COCs, with all other conditions being identical. Specificity of each reaction was ascertained after completion of the amplification protocol. This was achieved by performing the melting procedure (55-95°C, starting fluorescence acquisition at 55°C and taking measurements at 10 s intervals until the temperature reached 95°C). As negative controls, samples with RNA but without reverse transcriptase were used. The sizes of the PCR products were further confirmed by gel electrophoresis on a standard ethidium bromide-stained 2% agarose gel and visualized by exposure to UV light.

Data and statistical analysis

The effect of hormonal treatment on mean number of COCs recovered per animal was determined using the *t* test for non-paired samples, at a significance level of 5%. The percentage of graded COCs and maturation rates were analyzed using the Fisher's exact test. Analyses were carried out with GraphPad InStat 3.06 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) for Windows. The relative quantification of the expression of gene was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). Target gene expression was normalized against GAPDH transcript levels (Goossens *et al.*, 2005). Threshold and *C_t* (threshold cycle) values were automatically determined by Realplex 2.2 software (Eppendorf, Hamburg, Germany), using default parameters. The *C_t* and *T_m* (melting temperature) data were expressed as mean $\pm$ SD of three or more measurements and were compared using one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test, and were determined to be significant when $p < 0.05$ or $p < 0.01$. The corresponding real-time PCR efficiencies were calculated from the given slopes (*S*) of the standard curves, according to the equation: $E = 10^{(-1/S)} - 1$. Linearity was expressed as the square of the Pearson correlation coefficient (R^2).

Results

Validation of qRT-PCR analyses

To validate our PCR conditions, standard curves prepared with serial dilutions of COC cDNAs were plotted for EGFR and GAPDH (Figure 1). These experiments give valuable information about the range of template concentrations that yields similar amplification efficiency. In our analyses, the amplification reactions for EGFR and for GAPDH presented high linearity ($R^2 \geq 0.98$) and efficiency (*E*) close to 1 (Figure 1C). These results indicate that differentially expressed mRNA species can be analyzed within the same PCR run, as long as the template concentrations fall within the linear range (Dussault & Pouliot, 2006).

The expression of EGFR was quantitatively analyzed in COCs cells. Transcripts for EGFR were detected in both, *cumulus* cells (B) and in oocytes (A) (Figure 1). The amplicons produced by qRT-PCR presented melting temperature (mean $\pm$ SD) of $77.8^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ (EGFR) and $82.5^{\circ}\text{C} \pm 0.3$ (GAPDH) in oocytes (Figure 1A), and $77.7^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ (EGFR) and $82.4^{\circ}\text{C} \pm 0.4$ (GAPDH) in cumulus cells (Figure 1B). The electrophoresis in agarose gel from the products obtained showed an amplicon of approximately 130 bp for both genes and cells analyzed. No amplification was observed for the samples with no reverse transcriptase enzyme (negative controls).

***In vivo* FSH treatment and IVM**

In this work, quantitative and qualitative aspects of goats COCs produced by two distinct hormonal treatments for ovarian stimulation were compared (Table 2). Therefore, the number of COC structures retrieved from each animal, and the percentage of GI, GII and GIII structures did not differ statistically between the five-dose and the three-dose FSH treatment groups. On the other hand, the maturation rate for the three-dose treatment group was significantly lower ($p < 0.05$) than the five-dose ovarian stimulation treatment.

***In vivo* FSH treatment and expression pattern in graded COCs**

The quantification of EGFR mRNA abundance in structures that were not submitted to IVM (immature COCs), previously classified as GI/GII and GIII (Figure 2), demonstrated that the five-dose hormonal treatment produced GI and II COCs with high number of transcripts for EGFR in cumulus cells ($p < 0.001$) than in GIII structures (Figure 2B). However, such difference was not seen between oocytes (Figure 2A). On the other hand, the three-dose treatment produced GI/GII and GIII COCs with similar expression levels for EGFR in oocytes (Figure 2A) or in cumulus cells (Figure 2B).

***In vivo* FSH treatment and expression pattern in pre- and post-IVM COCs**

We also observed that the five-dose FSH treatment produced COCs, either prior to or after IVM, with higher levels of EGFR transcripts in cumulus cells (Figure 2B, $p < 0.01$ and Figure 3B, $p < 0.05$) when compared with the three-dose FSH treatment. However, similar to what was seen for immature graded oocytes, no differences were observed in oocytes (Figure 2A and Figure 3A).

Expression patterns in pre- and post-IVM COCs

The expression levels of EGFR in GI/GII COCs prior to and following IVM were also quantified, irrespective of the hormonal treatment. Thus, transcription levels for EGFR were significantly higher in MII oocytes ($p < 0.001$, Figure 3A) and in post-IVM cumulus cells ($p < 0.05$, Figure 3B) than in pre-IVM oocytes (IO) and in cumulus cells, respectively. Conversely, for both treatments, EGFR expression levels in NC oocytes were statistically lower ($p < 0.001$) than MII oocytes, but not from immature oocytes (IO).

Discussion

The *in vitro* production of embryos involves three main steps: maturation of primary oocytes collected from antral follicles, fertilization of matured secondary oocytes and culture of presumable embryos to the blastocyst stage, which can be transferred to recipients or frozen for future use (Cognié *et al.*, 2003). In this process, obtaining high-quality oocytes is of key importance. To obtain high-quality oocytes, LOR has been widely used in goats (Baldassarre *et al.*, 2003a; Gibbons *et al.*, 2007). Hormonal treatments for ovarian stimulation have been used prior to laparoscopic recovery to increase the number of puncturable follicles (Pierson *et al.*, 2004).

Previous studies showed that gonadotrophins are critical for follicular growth, and FSH being the key hormone, results in growth and development of follicles with 2.5 mm or bigger in

diameter (Evans, 2003). In the present work, we evaluated COCs recovered by laparoscopy in goats treated for ovarian stimulation with 120 mg pFSH administered in five or in three doses. Even though the two distinct hormonal treatments provided equivalent numbers of COCs per animal and the same proportion of GI/GII structures, oocyte maturation rate was significantly higher in the five-dose group. Such findings indicated a lower meiotic competence for GI/GII COCs when obtained from the three-dose FSH treatment.

Interestingly, the assessment of the COC morphology prior to IVM was not a good predictor of oocyte meiotic competence. This suggests that improvements in the grading system to predict oocyte competence, using morphological criteria, are still a need.

Several pieces of evidence have suggested that the investigation of molecular markers using highly sensitive techniques, such as microarray and real-time PCR, is a promising approach for studies in COC gene expression for a better inference of oocyte competence to development (Wrenzycki *et al.*, 2007; Assidi *et al.*, 2008). Here, we applied real-time qPCR to investigate possible correlations between EGFR expression levels in cumulus cells and in oocytes with the quality of recovered COCs structures obtained from two FSH protocols for ovarian stimulation in goats. Based on the expression profiles, our results indicated the occurrence of significant differences in EGFR mRNA relative abundance in cumulus cells, but not in oocytes, depending on the FSH treatment protocol (three- vs. five-dose groups), COC morphological grading (GI/GII vs. GIII COCs), and maturation status (pre- vs. post-IVM COCs).

Regarding the comparisons between hormonal protocols, the treatment with five injections of FSH produced GI/GII COCs (used for IVM) with higher levels of EGFR expression in cumulus cells when compared with the three-dose FSH treatment. Moreover, the latter treatment generated GI/GII structures with EGFR levels as low as in GIII structures (not selected for IVM) from both hormonal treatments. These results were associated with a higher maturation rate for structures in the five-dose treatment relative to the three-dose

group, also indicating that EGFR expression in cumulus cells may be positively correlated with oocyte meiotic competence in goat COCs. Even if the final total dose of FSH was the same between groups, the number and/or intervals of injected doses affected the levels of EGFR expression in cumulus cells.

It is known that successful FSH treatments for ovarian stimulation usually require multiple doses, which is primarily due to the shorter *in vivo* FSH half-life (Monniaux *et al.*, 1983).

Studies have reported the important effect of gonadotrophins on the EGF network mediating the follicular growth (Zhang *et al.*, 2009; Van Den Hurk & Zhao, 2005). In fact, studies demonstrated that the EGFR expression increases with progression of folliculogenesis due to gonadotrophin stimulation, reaching its maximum at the preovulatory stage (Choi *et al.*, 2005). Consequently, it is possible that the three-dose injection protocol used in this study failed to supply adequate levels of FSH during follicular development, resulting in GI/GII COCs with lower oocyte meiotic competence (expressed in terms of lower maturation rate) and with reduced EGFR expression levels in its surrounding cumulus cells.

Oocyte competence was suggested to occur mainly due to the molecular memory acquired during maturation by the oocyte and the supportive somatic cells (Sirard *et al.*, 2003). In addition, the presence of cumulus cells (Hashimoto *et al.*, 1998) and the maintenance of functional coupling between the oocyte and its surrounding cumulus by gap junctions are both necessary to the oocyte competence acquisition process (Atef *et al.*, 2005). Therefore, competent oocytes also appear to influence the pattern of expression of a set of biochemical markers in the cumulus that might be crucial to achieve maturation (Assidi *et al.*, 2008).

Despite the apparent sufficient supply of FSH used in the five-dose treatment, a lower EGFR expression in the cumulus cells of GIII COCs would be expected when compared with GI/GII COCs. Given the key role of the cumulus-oocyte communications in the follicular growth (Van Den Hurk & Zhao, 2005), we hypothesized that the very low or even null

number of cumulus cells surrounding the oocyte of GIII COCs significantly reduced the *in vivo* up regulation of EGFR in cumulus cells mediated by FSH.

Differences in the levels of EGFR expression in GI/GII goat COCs between the FSH treatments were restricted to the cumulus cells, with no differences being detected in the oocytes. Despite several investigations of potential marker genes for oocyte developmental competence has been performed in the own oocyte (Wrenzycki *et al.*, 2007), studies with cumulus cells are emergent. In effect, the potential of analyzing cumulus cell gene expression as a marker for oocyte quality, more than the oocyte itself, is being increasingly recognized (Feuerstein *et al.*, 2007). Thus, Assidi *et al.* (2008) proposed, that EGFR, among others genes, is a potential candidate to predict bovine oocyte competence. Furthermore, given the absence of FSH receptor on the oocyte, the EGFR expression in cumulus cells may provide more relevant biological information than transcripts from the oocyte *per se*, particularly concerning *in vivo* hormonal treatments. In fact, Assidi *et al.* (2008) also used bovine cumulus cells for gene expression analysis to access *in vivo* responses to FSH stimulation. In the same way, we propose that EGFR may indeed be a good candidate marker for indirect prediction of goat oocyte quality.

In the present investigation, we also demonstrated the presence of EGFR transcripts in oocytes and in cumulus cells both prior and after IVM. This is in agreement with data obtained in goats in which EGFR transcripts, assessed by RT-PCR, and EGFR protein, detected using immunochemistry and western blot analyses, have been reported in follicular cells (granulosa and cumulus) and in oocytes (Gall *et al.*, 2004). Additionally, reports have already shown the presence of EGFR in follicular cells (mouse, Hill *et al.*, 1999; cattle, Lonergan *et al.*, 1996; human, Qu *et al.*, 2000; pig, Singh *et al.*, 1995; rat, Chabot *et al.*, 1986; hamster: Garnett *et al.*, 2002) and in oocytes (mouse, Willey *et al.*, 1992; human, Chia *et al.*, 1995; pig, Singh *et al.*, 1995; hamster, Garnett *et al.*, 2002) of several mammalian species.

It is clear that EGFs can influence maturation, having positive effects during the IVM process in a variety of species, including cattle (Lonergan *et al.*, 1996), humans (Das *et al.*, 1991), and rodents (Das *et al.*, 1991). Even though the mechanism whereby EGFs exert their effects on COC maturation has not been completely elucidated yet, cumulus cells are considered the major site of action for these factors, indirectly modulating oocyte maturation. Here, we have shown that IVM was associated with a significant increase in EGFR expression in goat oocytes and cumulus cells in both *in vivo* FSH protocols used for ovarian stimulation. Following IVM, MII oocytes had nearly a four-fold increase in EGFR mRNA relative abundance in comparison with immature oocytes, with cumulus cells doubling the EGFR expression after IVM. This suggests that, in goats, EGFs could exert their targeting effects independently, at least in part, directly on cumulus cells and on the oocyte itself through EGFR intrinsically expressed in each cell type. This possibility is supported by findings in cattle (Lonergan *et al.*, 1996) and in the mouse (Das *et al.*, 1991), in which EGF was shown to act directly on denuded oocytes and on COCs. Interestingly, EGFR expression was previously detected in the goat oocyte, but the receptor protein was likely immature, as it was proven unable to be phosphorylated (Gall *et al.*, 2005). Our data indicated a possible up regulation in EGFR expression in cumulus cells and also in the oocytes during IVM, suggesting a potential physiological role during development. Moreover, NC oocytes, i.e., oocytes that failed to complete meiotic nuclear maturation, displayed similar EGFR expression pattern to immature oocytes. Then, we speculate that EGFR up regulation in oocytes is associated with the *in vitro* ability to resume meiosis, as also suggested by results from Gall *et al.* (2004), which demonstrated an association between the increase in EGFR relative abundance and oocyte ability to resume and complete meiosis during goat follicular growth.

Altogether, data from the present study corroborate the importance of EGFR expression in cumulus cells and point to a putative direct action of EGFR in goat oocytes during IVM.

Even though some biochemical mechanisms of EGF actions in goat cumulus cells (Gall *et al.*, 2005) and oocytes (Dedieu *et al.*, 1996) during the IVM process have already been described, the EGFR signaling in oocytes still remains poorly understood. Further studies are still necessary to address several issues in signal transduction events taking place in COCs during the IVM process in goat cumulus cells and oocytes.

In summary, the use of a protocol for ovarian stimulation in goats with higher number of pFSH injections at a shorter interval resulted in COCs with a higher level of EGFR expression in cumulus cells, but not in the oocyte, which appeared to be correlated with an elevated oocyte meiotic competence following *in vitro* maturation. The morphological grading of COCs prior to IVM was not a good predictor of oocyte meiotic competence, since it could not assess the intrinsic quality of COCs. Therefore, EGFR may be a good indirect candidate marker for goat oocyte quality. Additionally, the investigation of gene expression in cumulus cells instead of in the oocyte, represent a valid alternative in the selection of competent oocytes for IVM. Finally, the IVM process of goat COCs increased the EGFR expression in oocytes and cumulus cells, which seemed to be strongly correlated with the resumption of meiosis. Cause-and-effect relationships between such increased expression levels in the oocyte and oocyte competence itself still need to be further investigated.

Acknowledgments

The authors are thankful for the financial support received from FINEP, CNPq, and PNPd/CAPES (Brazil). V.J.F. Freitas is senior investigator of CNPq.

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.
- Atef, A., François, P., Christian, V. & Marc-Andre, S. (2005). The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol. Reprod. Dev.* **71**, 358–67.
- Baldassarre, H., Keefer, C., Wang, B., Lazaris, A. & Karatzas, C.N. (2003a). Nuclear transfer in goats using *in vitro* matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. *Cloning Stem Cells* **5**, 279–85.
- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Guathier, M., Neveu, N., Lapoint, J., Sneek, L., Leduc, M., Duguay, F., Zhou, J.F., Lazaris, A. & Karatzas, C.N. (2003b). Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* **59**, 831–9.
- Baldassarre, H. & Karatzas, C.N. (2004). Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim. Reprod. Sci.* **82-83**, 255–66.
- Chabot, J.G., St-Arnaud, R., Walker, P. & Pelletier, G. (1986). Distribution of epidermal growth factor receptors in the rat ovary. *Mol. Cell Endocrinol.* **44**, 99–108.
- Chia, C.M., Winston, R.M.L. & Handyside, A.H. (1995). EGF, TGF- α and EGF-R expression in human preimplantation embryos. *Development* **121**, 299–307.
- Choi, J.H., Choi, K.C., Auersperg, N. & Leung, P.C. (2005). Gonadotropins upregulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogenactivated protein kinases and phosphatidyl-inositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. *Endocr. Relat. Cancer* **12**, 407–21.
- Cognié, Y. & Baril, G. (2002). Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* e *in vitro* chez bebris e la chèvre. *INRA Prod. Anim.* **15**, 199–207.
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N. & Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* **9**, 171–188.

- Das, K., Stout, L.E., Hensleigh, H.C., Tagatz, G.E., Phipps, W.R. & Leung, B.S. (1991). Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil. Steril.* **55**, 1000–04.
- Dedieu, T., Gall, L., Crozet, N., Sevellec, C. & Ruffini, S. (1996). Mitogen activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 351–8.
- Dekel, N. & Sherizly, I. (1985). Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* **116**, 406–9.
- Dieleman, S.J., Hendriksen, P.J., Viuff, D., Thomsen, P.D., Hyttel, P., Knijn, H.M., Wrenzycki, C., Kruip, T.A., Niemann, H., Gadella, B.M., Bevers, M.M. & Vos, P.L. (2002). Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* **57**, 5–20.
- Downs, S.M. & Chen, J. (2008). EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 105–14.
- Dussault, A.A. & Pouliot, M. (2006). Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol. Proced. Online* **8**, 1–10.
- Evans, A.C.O. (2003). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* **78**, 289–306.
- Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., Bidault, R. & Royere, D. (2007). Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum. Reprod.* **22**, 3069–77.
- Gall, L., Chene, N., Dahirel, M., Ruffini, S. & Boulesteix, C. (2004). Expression of epidermal growth factor receptor in the goat *cumulus*–oocyte complex. *Mol. Reprod. Dev.* **67**, 439–45.

- Gall, L., Boulesteix, C., Ruffini, S. & Germain, G. (2005). EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat cumulus cells during *in vitro* maturation. *Mol. Reprod. Dev.* **71**, 489–94.
- Garnett, K., Wang, J. & Roy, S.K. (2002). Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: Follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormones, luteinizing hormone, estradiol and progesterone. *Biol. Reprod.* **67**, 1593–604.
- Gibbons, A., Bonnet, F.P., Cueto, M.I., Catala, M., Salamone, D.F. & Gonzalez-Bulnes, A. (2007). Procedure for maximizing oocyte harvest for *in vitro* embryo production in small ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* **42**, 423–6.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J. & Armstrong, D.T. (2004). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* **82-83**, 431–46.
- Goossens, K., Van Poucke, M., Van Soom, A., Vandesompele, J., Van Zeveren, A. & Peelman, L.J. (2005). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Dev. Biol.* **5**, 27.
- Guler, A., Poulin, N., Mermillod, P., Terqui, M. & Cognie, Y. (2000). Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* **54**, 209–18.
- Hashimoto, S., Saeki, K., Nagao, Y., Minami, N., Yamada, M. & Utsumi K. (1998). Effects of cumulus cell density during *in vitro* maturation of the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* **49**:1451–63.
- Hatoya, S., Sugiyama, Y., Nishida, H., Okuno, T., Torii, R., Sugiura, K., Kida, K., Kawate, N., Tamada, H. & Inaba, T. (2009). Canine oocyte maturation in culture: significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. *Theriogenology* **71**, 560–7.
- Hill, J.L., Hammar, K., Smith, P.J.S. & Gross, D.J. (1999). Stage-dependent effects of epidermal growth factor on Ca^{2+} efflux in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **53**, 244–53.

- Hsu, C.J., Holmes, S.D. & Hammond, J.M. (1987). Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 242–7.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method. *Methods* **25**, 402–8.
- Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonckt, A., Donnay, I., Khatir, H. & Mermillod, P., (1996). Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.* **54**, 1420–9.
- Mariante, A.S., Egito, A.A. (2002). Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. *Theriogenology* **57**, 223–235.
- Monniaux, D., Chupin, D. & Saumande, J. (1983). Superovulatory response of cattle. *Theriogenology*, **19**, 55–81.
- Pierson, J., Wang, B., Neveu, N., Sneek, L., Cote, F., Karatzas, C.N. & Baldassarre, H. (2004). Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reprod. Fertil. Dev.* **16**, 795–9.
- Prochazka, R., Srsen, V., Nagyova, E., Miyano, T. & Flechon, J.E. (2000). Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte–cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Mol. Reprod. Dev.* **56**, 63–73.
- Qu, J.M.D., Nisolle, M.D. & Donnez, J.M.D. (2000). Expression of transforming growth factor- α , epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertil. Steril.* **74**, 113–21.
- Sekiguchi, T., Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Kawata, H., Yoshino, M., Kajitani, T., Kameda, T., Minegishi, T. & Miyamoto, K. (2002). Transcriptional regulation of the epiregulin gene in the rat ovary. *Endocrinology* **143**, 4718–29.
- Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I. & Richards, J.S. (2006). Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus

- oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol. Endocrinology* **20**, 1352–65.
- Singh, B., Rutledge, J.M. & Armstrong, D.T. (1995). Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.* **40**, 391–99.
- Sirard, M.A., Dufort, I., Coenen, K., Tremblay, K., Massicotte, L. & Robert C. (2003). The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod. Suppl.* **61**, 117–129.
- Van Den Hurk, R. & Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **63**, 1717–51.
- Van Zutphen, L.F.M. & Balls, M. (1997). *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Amsterdam: Elsevier. 1260 pp.
- Webb, R., Garnsworthy, P.C., Campbell, B.K. & Hunter, M.G. (2007). Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology* **68S**, S22–S29.
- Westergaard, L.G. & Andersen, C.Y. (1989). Epidermal growth factor (EGF) in human preovulatory follicles. *Hum. Reprod.* **4**, 257–60.
- Wiley, L.M., Wu, J.X., Harari, I. & Adamson, E.D. (1992). Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. *Dev. Biol.* **149**, 247–60.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D. & Niemann, H. (2007). Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* **68S**, S77–S83.
- Zhang, M., Ouyang, H. & Xia, G. (2009). The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol. Hum. Reprod.* **15**, 399–409.

Tables

Table 1 Oligonucleotides used for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in goat oocytes and cumulus cells.

Gene	Nucleotide sequence	Product size	GenBank
		(bp)	accession number
EGFR	3'-AACTGTGAGGTGGTCCTTGG-5'	120	AY486452
	3'-CACTGTGTTGAGGGCAATGA-5'		
GAPDH	3'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-5'	119	XM_618013
	3'-ACATACTCAGCACCAGCATCAC-5'		

Table 2 Cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered from goats after five-dose or three-dose hormonal treatments for ovarian stimulation.

Treatment	N. of goats	Number of collected COCs (mean per animal $\pm$ SD)	Grading of COCs (%)		Matured COCs (%)*
			GI/GII	GIII	
Five doses	18	211 (11.7 $\pm$ 4.9)	73.9	14.2	49.1 ^a
Three doses	17	182 (10.7 $\pm$ 4.0)	66.5	12.6	32.1 ^b

^{a,b}: Numbers in the same column with distinct superscripts differ significantly ($p < 0.05$)

*Proportion of GI/GII-only COCs, as GIII COCs were not submitted to IVM

Figures

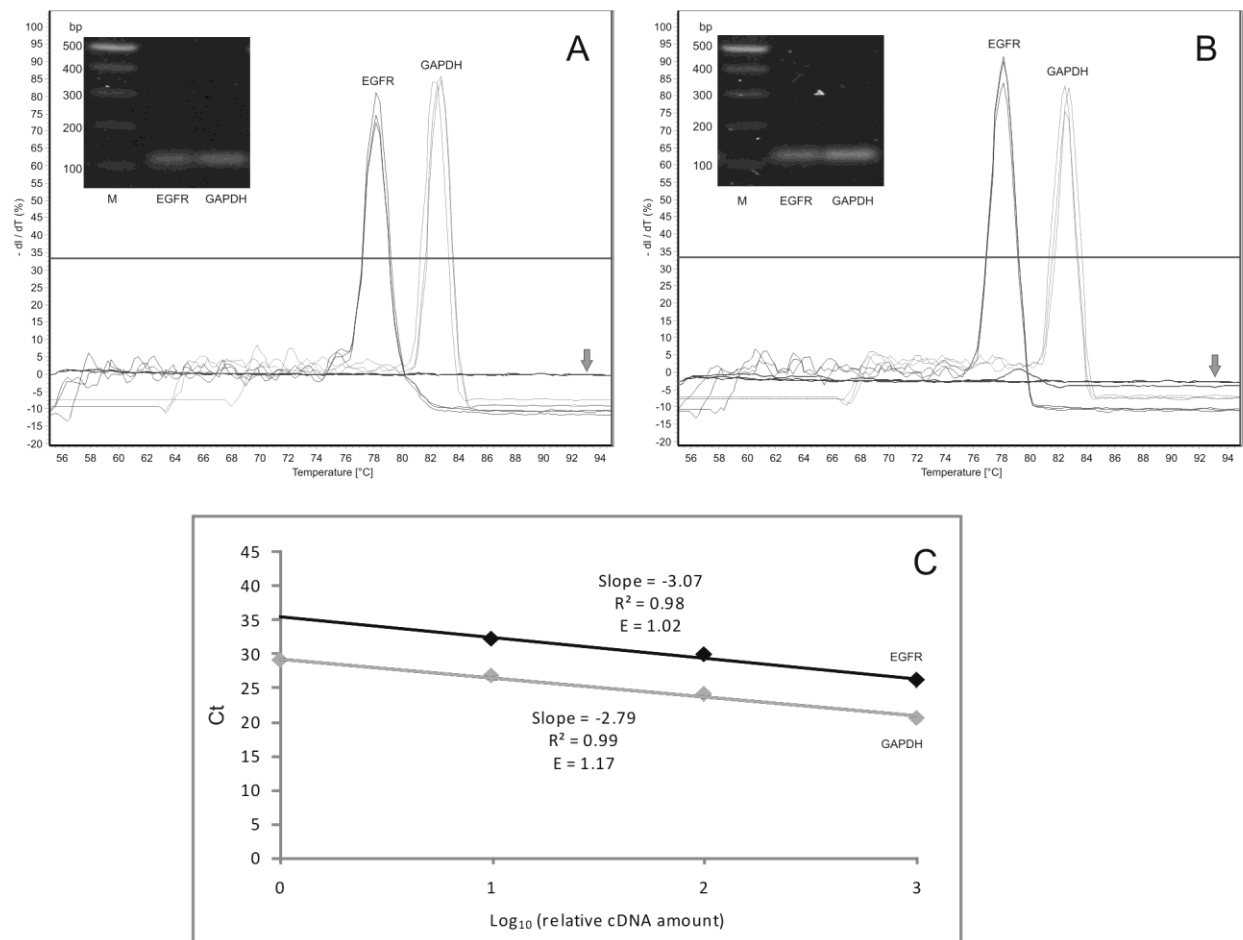


Figure 1 Specificity, linearity and efficacy of EGFR and GAPDH qRT-PCR amplifications in oocytes and cumulus cells. Derivative melting curves of EGFR and GAPDH amplicons in oocytes (A) and cumulus cells (B). Negative controls (arrows) were constituted of mRNA templates without reverse transcriptase. The inserts in panels A and B show the eletroforetic analysis of the products. M: 100 bp DNA ladder. Standard curves for EGFR (upper line) and GAPDH (lower line) amplifications in COCs (C). The curve slopes, efficiency values (E) and square of Pearson correlation coefficients (R^2) were plotted.

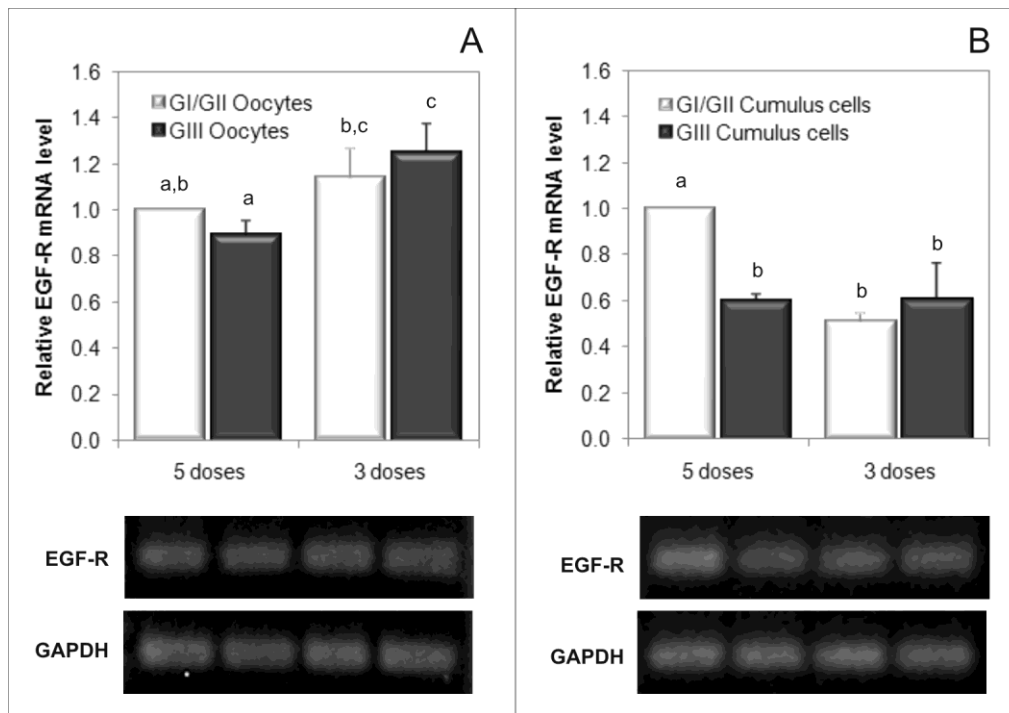


Figure 2 Real-time qRT-PCR analysis of EGFR expression in goat (A) oocytes and (B) cumulus cells from graded COCs obtained from the five-dose or three-dose FSH treatment groups for ovarian stimulation. Shown are the fold differences in mRNA expression after normalization to the internal standard (GAPDH). The mRNA levels in GI/GII oocytes and cumulus cells, both for the five-dose FSH treatment, were arbitrarily set to one-fold for oocyte and cumulus cells groups, respectively. Lower panels in A and B show the eletroforetic analysis of the EGFR and GAPDH amplicons. Histograms with columns with distinct superscripts differ, for $p < 0.05$ in A and $p < 0.01$ in B.

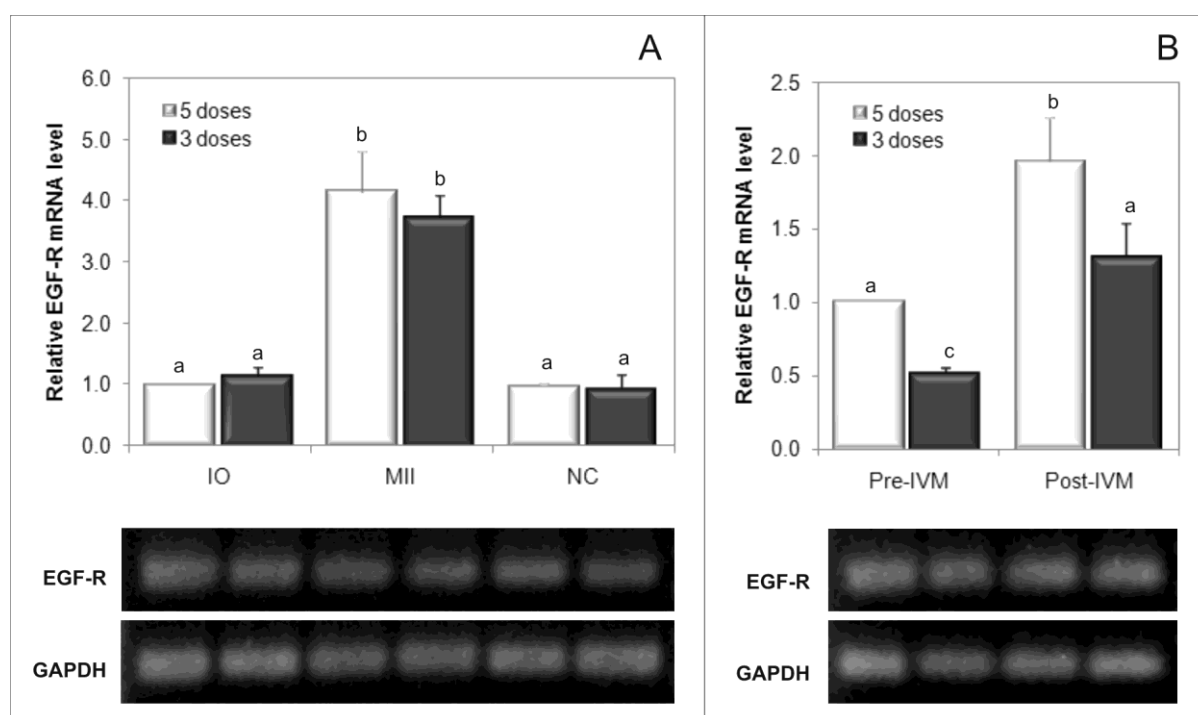


Figure 3 Real-time qRT-PCR analysis of EGFR expression in goat (A) oocytes and (B) cumulus cells from pre- and post-IVM COCs obtained from the five-dose or three-dose FSH treatment groups for ovarian stimulation. Shown are the fold differences in mRNA expression in the immature (OI), mature (MII) and non-competent (NC) oocytes, and in cumulus cells from pre- and post-IVM COCs, after normalization to the internal standard (GAPDH). The mRNA levels in OI and pre-IVM cumulus cells, both for the five-dose treatment, were arbitrarily set to one-fold for oocyte and cumulus cells groups, respectively. Lower panels in A and B show the eletroforetic analysis of the EGFR and GAPDH amplicons. Histograms with columns with distinct superscripts differ, for $p < 0.001$ in A and $p < 0.05$ in B.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo levaram as seguintes conclusões:

- O tratamento de estimulação ovariana com cinco injeções de pFSH resultou em CCOs de maior nível de expressão de EGFR nas células do *cumulus*.
- O EGFR apresenta-se como um bom candidato a marcador da qualidade oocitária em caprinos.
- O estudo da expressão gênica em células do *cumulus* pode ser adicionado aos critérios convencionais de avaliação morfológica para a qualidade oocitária e posterior competência à MIV.
- O processo de MIV aumenta a expressão de EGFR tanto em oócito como em células do *cumulus*.

8 PERSPECTIVAS

O estudo, com o uso do RT-PCR em tempo real quantitativo, da expressão diferencial de genes caprinos envolvidos em vias regulatórias das células do *cumulus* adicionado ao monitoramento dos posteriores embriões pode levar ao melhor conhecimento das conseqüências de diferentes protocolos de estimulação ovariana sobre a população oocitária disponível.

Eventualmente, esta abordagem pode melhorar consideravelmente a compreensão sobre os fatores que controlam o desenvolvimento folicular em caprinos, dando a oportunidade de sugerir novas estratégias de estimulação ovariana para otimizar a qualidade oocitária.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAKI, Y.; YOSHIOKA, K.; NOGUCHI, M.; HOSHI, H.; FUNAHASHI, H. Successful piglet production in a chemically defined system for in vitro production of porcine embryos: dibutyryl cyclic AMP and epidermal growth factor-family peptides support in vitro maturation of oocytes in the absence of gonadotropins. *Journal of Reproduction and Development*, v. 55, p. 446-453, 2009.

ANGUITA.; A, B.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMITO, M.T. Effect of oocytes diameter on meiotic competence embryo development, p 34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goats oocytes. *Theriogenology*, v. 67, p. 526-536, 2007.

AROCHO A, CHEN B, LADANYI M, PAN Q. Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagnostic Molecular Pathology*, v. 15, p. 56-61, 2006.

ASSEY, R.J.; HYTTTEL, P.; GREVE, T.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 37, p. 335-344, 1994.

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.

ATEF, A.; FRANÇOIS, P. ; CHRISTIAN, V.; MARC-ANDRE, S. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 71, p. 358-67, 2005.

BALDASSARRE, H. Aplicaciones prácticas de la produccion de embriones in vitro en la especie caprina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v. 31, p. 261-67, 2007.

BALDASSARRE, H., WANG, B., GAUTHIER,M., NEVEU,N., LAZARIS, A., KARATZAS, C.N. Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. *Zygote*, v. 12, p. 257–261, 2004.

BALDASSARRE, H.; RAO, K. M.; NEVEU, N.; BROCHU, E.; BEGIN, I.; BEHBOODI, E.; HOCKLEY, D. K. Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 612-616, 2007.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*. v. 57, p. 275-84, 2002.

BALDASSARRE, H.; KEEFER, C.; WANG, B.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Nuclear transfer in goats using in vitro matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. *Cloning and Stem Cells*, v. 5, p. 279-285, 2003a.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GUATHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINT, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; ZHOU, J. F.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v. 59, p. 831-839, 2003b.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 255-266, 2004.

BALLESTER, M.; CASTELLO, A.; IBANEZ, E.; SANCHEZ, A.; FOLCH, J.M. Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *Biotechniques*v. v. 37, p. 610-613, 2004.

BEBBERE, D.; BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S. LEONI, G.G.; TORE, S.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; NAITANA, S.; LEDDA, S. Expression pattern of zygote arrest 1 (ZAR1), maternal antigen that embryo requires (MATER), growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) genes in ovine oocytes and in vitro-

produced preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 20, p. 908-915, 2008.

BENGTSSON, M.; KARLSSON, J.H.; WESTMAN, G.; KUBISTA, M. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 31, p. 45, 2003.

BILODEAU, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content on zona-free and cumulus enclosed bovine oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 97, p. 5-11, 1993.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A.; Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 41, p. 54-62, 1995.

BORMANN, C.L.; ONGERI, E.M.; KRISHER, L.R. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential in vitro. *Theriogenology*, v. 59, p. 1373-1380, 2003.

CHABOT, J. G.; ST-ARNAUD, R.; WALKER, P.; PELLETIER, G. Distribution of epidermal growth factor receptors in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 44, p. 99-108, 1986.

CHEN, A.Q.; YU, S.D.; WANG, Z.G.; XU, Z.R.; YANG, Z.G. Stage-specific expression of bone morphogenetic protein type I and type II receptor genes: Effects of follicle-stimulating hormone on ovine antral follicles. *Animal Reproduction Science*. v. 111, p. 391-99, 2009.

CHIA, C. M.; WINSTON, R. M. L.; HANDYSIDE, A. H. EGF, TGF- α and EGF-R expression in human preimplantation embryos. *Development*, v. 121, p. 299-307, 1995.

CHOI, J.H.; CHOI, K.C.; AUERSPERG, N.; LEUNG, P.C. Gonadotropins upregulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogenactivated protein kinases and phosphatidyl-inositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. *Endocr. Relat. Cancer*, v. 12, p. 407-21, 2005.

COGNIE, Y. ; BARIL, G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* e *in vitro* chez bebris e la chèvre. *INRA Prod. Anim.* v. 15, p. 199-207, 2002.

COGNIE, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v. 9, p. 71-188, 2003.

COGNIE, Y.; POULIN, N. In: Produção *in vitro* de oócitos maduros e embriões em caprinos e ovinos. *Biotechnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*, v. 1, p. 46-60, 2006.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M.P.; Developmental competence of goat oocyte from follicle of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 103, p. 293-298, 1995.

DAS, K.; STOUT, L.E.; HENSLEIGH, H.C.; TAGATZ, G.E.; PHIPPS, W.R.; LEUNG, B.S. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertility and Sterility*. v. 55, p. 1000-1004, 1991.

DEDIEU, T.; GALL, L.; CROZET, N.; SEVELLEC, C.; RUFFINI, S. Mitogen activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Molecular Reproduction and Development*, v. 45, p. 351-358, 1996.

DEKEL, N.; SHERIZLY, I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology*, v. 116, p. 406-409, 1985.

DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T.A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, v. 57, p. 5–20, 2002.

DIEZ, C.; DUQUE, P.; GOMEZ, E.; HIDALGO, C.O.; TAMARGO, C.; RODRIGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, L.; DE LA VARGA, S.; FERNÁNDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before and after meiotic arrest: effect on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*, v. 64, p. 317–333. 2005.

DOWNS, S.M.; CHEN, J. EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, p. 105-114, 2008.

DUSSAULT, A. A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biology Procedures Online*, v. 8, p. 1-10, 2006.

EGITO, A.A.; MARIANTE A.S.; ALBUQUERQUE M.S.M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Archivos de Zootechnia*, v. 51, p. 41, 2002.

EICHENLAUB-RITTER, U.; PESCHKE, M. Expression in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human Reproduction Update*, v. 8, p. 21-41, 2002.

EPPIG, J.J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *ByoEssays*, v.13, p. 569-574, 2001.

EVANS, A.C.O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 289-306, 2003.

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

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

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.

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

FREITAS, V.J.F.; SEROVA, I.A.; ANDREEVA, L.A.E.; DVORYANCHIKOV, G.A.; LOPES-JUNIOR, E.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; DIAS, L.A.; AVELAR, S.R.G.; MOURA, R.R.; MELO, L.M.; PEREIRA, A.F.; CAJAZEIRAS, J.B.; ANDRADE, M.L.L.; ALMEIDA, K.C.; SOUSA, F.C.; CARVALHO, A.C.C.; SEROV, O.L. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 79, p. 1-8, 2007.

GALL, L.; BOULESTEIX, C.; RUFFINI, S.; GERMAIN, G. EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat cumulus cells during in vitro maturation. *Molecular reproduction and development*, v.71, p. 489-494, 2005.

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

GALL, L.; RUFFINI, S.; LE BOURHIS, D.; BOULESTEIX, C. Cdc25C expression in meiotically competent and incompetent goat oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 62, p. 4–12, 2002.

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

GARCÍA, A.R.; PRIETO, V.R.; ZUNZUNEGUI, D.K. Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de PRRS. *Revista Complutense de Ciencias Veterinárias*, v. 1, n.2, p. 646-653, 2007.

GARNETT, K.; WANG, J.; ROY, S.K. Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: Follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormones, luteinizing hormone, estradiol and progesterone. *Biology of Reproduction*, v. 67, 1593–604, 2002.

- GIBBONS, A.; BONNET, F. P.; CUETO, M. I.; CATALA, M.; SALAMONE, D. F.; GONZALEZ-BULNES, A. Procedure for maximizing oocyte harvest for *in vitro* embryo production in small ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p. 423-426, 2007.
- GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 431-446, 2004.
- GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, v.30, p.503-512, 2002.
- GINZINGER, D.G.; GODFREY, T.E.; NIGRO, J. Measurement of DNA copy number at microsatellite loci using quantitative PCR analysis. *Cancer Research*, v. 60, p. 5405, 2000.
- GORDO, A.C; HE, C.L.; SMITH, S.; FISSORE, R. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 59, p. 106-114, 2001.
- GOOSSENS, K.; VAN POUCKE, M.; VAN SOOM, A.; VANDESOMPELE, J.; VAN ZEVEEREN, A.; PEELMAN, L. J. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Development Biology*, v. 5, p. 27, 2005.
- GRAZUL-BILSKA, A.T.; CHOI, J.T.; BILSKI, J.J.; WEIGL, R.M.; KIRSCH, J.D.; KRAFT, K.C.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after *in vitro* fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology*, v. 59, p. 1449-1457, 2003.
- GULER, A., POULIN, N., MERMILLOD, P., TERQUI, M., COGNIE, Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*, v. 54, p. 209-218, 2000.
- HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. *Reprodução animal*. 7. Ed. São Paulo: Manole, 2004, 513 p.

HASHIMOTO, S.; SAEKI, K.; NAGAO, Y.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; UTSUMI K. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 49, p. 1451- 1463, 1998.

HATOYA, S.; SUGIYAMA, Y.; NISHIDA, H.; OKUNO, T.; TORII, R.; SUGIURA, K.; KIDA, K.; KAWATE, N.; TAMADA, H.; INABA, T. Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. *Theriogenology*, v. 71, p. 560–567, 2009.

HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S., GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *BioTechnology*, v. 10, p. 413–417, 1992.

HILL, J.L.; HAMMAR, K.; SMITH, P.J.S.; GROSS, D.J. Stage-dependent effects of epidermal growth factor on Ca^{2+} efflux in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v.53, p.244-253, 1999.

HOLLAND, P.M.; ABRAMSON, R.D.; WATSON, R.; GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'- 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 88, p. 7276–7280, 1991.

HSIEH, M.; LEE, D.; PANIGONE, S.; HORNER, K.; CHEN, R.; THEOLOGIS, A.; LEE, D.C.; THREADGILL, D.W.; CONTI, M. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular Cellular Biology*, v.17, p. 1914-1924, 2007.

HSU, C. J., HOLMES, S. D., HAMMOND, J. M. Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 147, p. 242-247, 1987.

HUE, I.; DEDIEU, T.; HUNEAU, D.; RUFFINI, S.; GALL, L.; CROZET, N. Cyclin B1 expression in meiotically competent and incompetent goat oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 46, p.1-7, 1997.

HUMBLLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; WRENZYCKI, C.; LEQUARRE, A.S.; JOLY CG. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 63, p. 1149-66, 2005.

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

INGHAM, D.J., BEER, S., MONEY, S., HANSEN, G. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotechniques*, v. 31, p.132-134, 2001.

JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; LAZAR, S.; KAUFMAN, O.; SEGER, R.; DEKEL, N. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rats oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1282-1290, 2003.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; OPIELA, J.; RYNSKA, B. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology*, v. 68, p. 36-744, 2007.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; RYNSKA, B.; GAJDA, B.; SMORAG, Z. Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of IVP in goats. *Theriogenology*, v. 62, p. 576–586, 2004.

KAWASHIMA, I.; OKAZAKI, T.; NOMA, N.; NISHIBORI, M.; YAMASHITA, Y.; SHIMADA, M. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. *Reproduction*, v. 136, p. 9-21, 2008.

KLEIN D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, v. 8, p. 257-260, 2002.

KOEMAN, J.; KEEFER, C.L.; BALDASSARRE, H.; DOWNEY, B.R. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology*, v. 60, p. 879–889, 2003.

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

KRUIP, T.A.M.; CRAN, D.G.; VAN BENEDEN, T.H.; DIELEMAN, S.J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Research*, v. 8, p. 29-47, 1983.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 95–125, 2006.

KUMAR, J.; OSBORN, J. C.; CAMERON, A. W. N.; TROUNSON, A. O. Follicular steroidogenesis and oocyte maturation after superovulation of goats (*Capra hircus*) with gonadotrophins. *Journals of Reproductions and Fertility*, v. 95, p. 371-383, 1992.

LEJONA, D.S.; BENETTI, M.S.; FAY, F; FAY, O. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio*, v. 14, p. 033 – 037, 2006.

LEONI, G.G.; SUCCU, S.; SATTA, V.; PAOLO, M.; BOGLIOLO, L.; BEBBERE, D.; ANTONIO SPEZZIGU, A.; MADEDDU, M.; BERLINGUER, F.; SERGIO LEDDA, S.; NAITANA, S. In vitro production and cryotolerance of prepubertal and adult goat blastocysts obtained from oocytes collected by laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU) after FSH treatment. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 21, p. 901–908, 2009.

LEVSKY, J.M.; SHENOY, S.M.; PEZO, R.C.; SINGER, R.H. Single-cell gene expression profiling. *Science*, v. 297, p. 836–840, 2002.

LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and

preimplantation embryo development *in vitro*. *Biology of Reproduction*. v. 54, p. 1420-29, 1996.

LORENZO, P.L.; ILLERA, J.C.; SILVÁN, G.; MUNRO, C.J.; ILLERA, M. J.; ILLERA, M. Steroid-level responsive to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. *Journal of Reproduction Immunology*, v. 35, p. 11-29, 1997.

LUALDI, S.; DI ROCCO, M.; CORSOLINI, F.; SPADA, M.; BEMBI, B.; COTUGNO, G.; BATTINI, R.; STROPPIANO, M.; GABRIELA PITTIS, M.; FILOCAMO, M. Identification of nine new IDS alleles in mucopolysaccharidosis II. Quantitative evaluation by real-time RT-PCR of mRNAs sensitive to nonsensemediated and nonstop decay mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1762, n. 4, p.478-484, 2006.

MACHALKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOSEKOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental of bovine oocyte s: effect of follicle size and the phase follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*, v. 61, p. 329-335, 2004.

MACKYA, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 10, p. 190–212, 2004.

MARIANTE, S.S.; MCMANUS, C.; MENDONÇA, J.F. *Recursos Genéticos e Biotecnologia*. Informativo Nacional sobre a situação dos Recursos Genéticos Animais do Brasil. 1. Ed, Brasília: EMBRAPA, 2003, 92p

MARIANTE, A.S.; EGITO, A.A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. *Theriogenology*, v. 57, p. 223–235, 2002.

MATTARUCCHI, E.; MARSONI, M.; BINELLI, G.; PASSI, A.; L.O.; CURTO, F.; PASQUALI, F.; PORTA, G. Different real time PCR approaches for the fine quantification of SNP's alleles in DNA pools: assays development, characterization and pre-validation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, p. 555–562, 2005.

MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIÉ, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect that developmental potencial of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 4, p. 449-460, 1999.

MHLANGA, M.M.; MALMBERG, L. Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *Methods*, v. 25, p. 463–471, 2001.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory response of cattle. *Theriogenology*, v. 19, p. 55-81, 1983.

NEMCOVA, L.; MACHATKOVA, M.; HANZALOVA, K.; HORAKOVA, J.; KANKA, J. Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage. *Theriogenology*, v. 65, p. 1254–1264, 2006.

ONG, Y.L.; IRVINE, A. Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. *Hematology*. v. 7, p. 59-67, 2002.

PABINGER, S.; THALLINGER, G.G.; SNAJDER, R.; EICHHORN, H.; RADER, R.; TRAJANOSKI, Z. QPCR: Application for real-time PCR data management and analysis. *BMC Bioinformatics*, v. 10, p. 268, 2009.

PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. v. 303, p. 682-84, 2004.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS, G.T.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, v. 22, p. 153-183, 2001.

PIERSON, J.; WANG, B.; NEVEU, N.; SNEEK, L.; COTE, F.; KARATZAS, C. N.; BALDASSARRE, H. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 16, p. 795-799, 2004.

PROCHAZKA, R.; KALAB, P.; NAGYOVA, E. Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biology of reproduction*, v. 68, p. 797-803, 2003.

PROCHAZKA, R.; SRSEN, V.; NAGYOVA, E.; MIYANO, T.; FLECHON, J. E. Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte–cumulus cell complexes: Nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Molecular Reproduction and Development*, v. 56, p. 63–73, 2000.

PTAK, G.; CLINTON, M.; BARBONI, B.; CAPPAL, P.; TISCHINER, M.; ET AL. Preservation of the wild European mouflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 796–801, 2002.

QU, J.M.D.; NISOLLE, M.D.; DONNEZ, J.M.D. Expression of transforming growth factor- α , epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertility and Sterility*, v. 74, p. 113–121, 2000.

RAEYMAEKERS, L. Basic principles of quantitative PCR. *Molecular Biotechnology*, v. 15, p. 115–122, 2000.

RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II Theca cells inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biology of Reproduction*, v. 52, p. 22–28, 1996a.

RODRÍGUEZ-DORTA, N.; COGNIE, Y.; GONZÁLEZ F.; POULIN, N.; GUIGNOT, F.; TOUZÉ, J-L.; BARIL, G.; CABRERA, F.; ÁLAMO, D.; BATISTA, M.; GRACIA, A.; MERMILLOD, P. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. *Theriogenology*, v. 68, p. 908–913, 2007.

RUTLEDGE, R.G.; COTE, C. Mathematics of quantitative PCR and the applications of standard curves. *Nucleic Acids Research*, v. 31, p. e93, 2003.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 20, p. 1350–1354, 1985.

SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NAGAI, T.; FIRST, N.L. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology*, v. 54, p. 1327 - 42. 2000.

SAKURAI, T., KAMIYOSHI, A., WATANABE, S., SATO, M., SHINDO, T. Rapid zygosity determination in mice by SYBR Green realtime genomic PCR of a crude DNA solution. *Transgenic Resesarch*, v. 17, p. 149–155, 2008.

SANTANA, C.J.; QUERINO, E.C.S.; COSTA, F.J.T.; MELO JÚNIOR, U.C. *Manual de Caprinocultura*. Agronegócios SEBRAE/PE, 2000, 43p.

SCHURMANN, A.; WELLS, D.N.; OBACK, B. Early zygotes are suitable recipients for bovine somatic nuclear transfer and result in cloned offspring. *Reproduction*, v. 132, p. 839-848, 2006.

SEKIGUCHI, T.; MIZUTANI, T.; YAMADA, K.; YAZAWA, T.; KAWATA, H.; YOSHINO, M.; KAJITANI, T.; KAMEDA, T.; MINEGISHI, T.; MIYAMOTO, K. Transcriptional regulation of the epiregulin gene in the rat ovary. *Endocrinology*, v. 143, p. 4718-4729, 2002.

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J.S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Molecular Endocrinology*, v. 20, n. 6 , p. 1352-1365, 2006.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. *Zygote*, v. 14, p. 107-117, 2006.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H.T.A.; ROELEN, B.A.J.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in the ovaries of goats. *Molecular reproduction and development*, v. 70, p. 11-19, 2004.

SINGH, B.; RUTLEDGE, J.M.; ARMSTRONG, D.T. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 40, p. 391-399, 1995.

SIRARD, M.A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. v. 65, p. 126-36, 2006.

SONG, P.; CAI, C.Q.; SKOKUT, M.; KOSEGI, B.D.; PETOLINO, J.F. Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERS™-derived transgenic maize. *Plant Cell Reports.*, v. 20, p. 948–954, 2002.

STOCCO, M.D. Star protein and the regulations steroid hormone biosynthesis. *Annual Review of Physiology*. v. 63, p. 193-213, 2001.

TAJIK, P.; ESFANDABADI, N.S. In vitro maturation of caprine oocytes in different culture media. *Small Ruminant Research*, v. 47, p.155-158, 2003.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 263-275, 2000.

TIBARY, A.; ANOUASSI, A.; KHATIR, H. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology*, v. 64, p. 618-638, 2005.

TIRONE, E.; D’ALESSANDRIS, C.; HASCALL, V. C.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI, A. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor β 1). *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 4787-4794, 1997.

TRAN, A.; JULLIEN, V.; ALEXANDRE, J.; REY, E.; RABILLON, F.; GIRRE, V.; DIERAS, V.; PONS, G.; GOLDWASSER, F.; TRELUYER, J.M. Pharmacokinetics and toxicity of docetaxel: role of CYP3A, MDR1, and GST polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*, v. 79, n.6, p. 570-580, 2006.

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

VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BALLS, M. *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Amsterdam: Elsevier, 1997.

VELASCO, A.J.; GÓMEZ, J.R.; AGIRRE, X.; BARRIOS, M.; NAVARRO, G.; ENÉRIZ, E.S.J.; CORDEU, L.; GÁRATE, L., CASTILLEJO, J.A.; PROSPER, F.; TORRES, A.; HEINIGER, A.I. PCR en tiempo real, una nueva herramienta para la toma de decisiones clínicas. *Haematologica edición española*, v. 91, n. 1, p. 27-34, 2006.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; CAMPBELL, B. K.; HUNTER, M. G. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology*, v. 68S, p. S22-S29, 2007.

WESTERGAARD, L. G.; ANDERSEN, C. Y. Epidermal growth factor (EGF) in human preovulatory follicles. *Human Reproduction*, v. 4, p. 257-260, 1989.

WILEY, L. M.; WU, J. X.; HARARI, I.; ADAMSON, E. D. Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. *Development Biology*, v. 149, p. 247-260, 1992.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. v. 39, p. 75-85, 2005.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, v. 68S, p. S77–S83, 2007.

WU, B.; IGNOTZ, G.G.; CURRIE, B.; YANG, X. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and development*, v. 47, p. 560-565, 1996.

YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, M.; BAMBA, K. Detection of growth factor mRNA in porcine cumulus oocyte complexes during maturation in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Development*, v. 44, p. 121-128, 1998.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P.J.; YANG, X.; GODKE, R.A. Cumulus cells function during bovine oocyte maturation, fertilization and embryo development in vitro. *Molecular Reproduction and development*, v. 40, p. 338-344, 1995.

ZHANG, M.; OUYANG, H.; XIA, G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Molecular Human Reproduction*. v. 15, p. 399-409, 2009.

ZIPPER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.; VITZTHUM, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research.*, v. 32, p.e103, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A

RESUMO ACEITO: IN VITRO MATURATION OF OOCYTES FROM CANINDÉ GOATS SUBMITTED TO DIFFERENT HORMONAL TREATMENTS FOR OVARIAN STIMULATION

36TH Annual Conference of the IETS / 23rd Annual Meeting SBTE
Sheraton Córdoba Hotel. January 9-12, 2010, Córdoba, Argentina.

IN VITRO MATURATION OF OOCYTES FROM CANINDÉ GOATS SUBMITTED TO DIFFERENT HORMONAL TREATMENTS FOR OVARIAN STIMULATION

K.C. Almeida, A.F. Pereira*, A.S. Alcântara Neto, S.R.G. Avelar, F.C. Sousa, L.M. Melo, D.I.A. Teixeira, V.J.F. Freitas

State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Oocyte in vitro maturation (IVM) is a long process during which oocytes acquire their ability to support the stages of development in a stepwise manner, ultimately reaching activation of the embryonic genome. The overall success of this process can be affected by factors such as hormonal treatment for ovarian stimulation. Thus, current study aims to evaluate the possible effects of the ovarian stimulatory protocols on the goat oocyte quality and IVM rate. Adult and cyclic Canindé goats were heat synchronized by means of intravaginal sponges impregnated with 60 mg medroxyprogesterone acetate (MAP, Progespon, Syntex, Argentina) inserted for 11 days coupled with a luteolytic injection of 50 µg cloprostenol (Ciosin, Coopers, Brazil) in the 8th day of treatment. The ovarian stimulation was carried out using one of the following protocols: a) standard multi-doses (MD) with 120 mg pFSH (Folltropin-V, VetrepHarm, Canada) distributed in five injections (30/30; 20/20; 20 mg) at 12 h intervals (n=18); b) three-doses (TD) with 120 mg pFSH administered in three injections (60; 40; 20 mg) at 24 h intervals (n=17); c) oneshot (OD) of 70 mg pFSH plus 200 iu of eCG (Novormon, Syntex, Argentina) administered 36 h before sponge removal (n=17). In MD and TD groups, the pFSH injections started in 8th day of progestagen treatment. The follicles were aspirated just after the sponge removal using the laparoscopic oocyte recovery (LOR). This procedure was performed with a 22-gauge needle and a vacuum pump to 30 mmHg. The collection medium was TCM199 supplemented with HEPES (10 mM), heparin (20 iu/mL) and gentamicin sulfate (40 µg/mL). Cumulus-oocyte complexes (COCs) were classified as grade I, II, III or IV based on visual criteria (Baldassarre H et al., 2003 Theriogenology 56, 831-839). Good quality oocytes (grade I and II) were incubated in TCM199 supplemented with cysteamine (100 µM), EGF (10 ng/mL) and gentamicin sulfate (40 µg/mL) at 38.5°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air for 24 h. Oocyte maturation was assessed by the visualization of first polar body under inverted microscope. Data were expressed in percentage and analyzed using the Fischer's exact test. No statistical differences among hormonal treatments ($P > 0.05$) were observed for the percentage of the good quality oocytes, with $70.4 \pm 3.0\%$ of COCs graded in I and II. The IVM rate in TD (32.1%) was statistically lower than MD (32.1% vs 49.1%, $P=0.04$) group. However, no significant differences ($P=0.89$) were observed between OD (46.2%) and MD groups. Thus, current results indicate that oocyte production for IVM can be facilitated using ovarian stimulation with oneshot FSH/eCG regime, without affect meiotic competence. In summary, OD and MD treatments can be used for oocyte IVM in an embryo production programme in Canindé goats.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the following Brazilian agencies: FINEP, CNPq, FUNCAP and CAPES.

APÊNDICE B

RESUMO ACEITO: TAXA DE MATURAÇÃO DE OÓCITOS DE CABRAS DA RAÇA CANINDÉ SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS HORMONAIS PARA ESTIMULAÇÃO OVARIANA

Universidade Estadual do Ceará – UECE XIV Semana Universitária Encontro de Iniciação Científica e Encontro de Pesquisadores 9 a 13 de novembro de 2009, Fortaleza, CE.

TAXA DE MATURAÇÃO DE OÓCITOS DE CABRAS DA RAÇA CANINDÉ SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS HORMONAIS PARA ESTIMULAÇÃO OVARIANA

K.C. Almeida, A.F. Pereira, A.S. Alcantâra Neto, S.R.G. Avelar, F.C. Sousa, L.M. Melo, V.J.F. Freitas

A maturação oocitária é um longo processo durante o qual o oócito adquire a habilidade para suportar os estágios de desenvolvimento culminando com a ativação do genoma embrionário. Diferentes fatores podem influenciar o sucesso desta etapa, tal como a fonte de estimulação ovariana. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes protocolos hormonais sobre a qualidade e a taxa de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos caprinos. Para tanto, cabras Canindé adultas e cíclicas tiveram seu estro sincronizado pelo uso de esponja vaginal impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon, Syntex, Argentina) por 11 dias, associado a uma injeção intra-muscular (i.m.) de 50 µg de cloprostenol (Ciosin, Coopers, Brasil) no oitavo dia de tratamento. A estimulação ovariana foi realizada utilizando-se um dos seguintes protocolos: grupo padrão (GP, n=18): 120 mg de pFSH (Folltropin-V, Vetepharm, Canadá) administradas em cinco doses decrescentes (30/30; 20/20; 20 mg) intervaladas de 12 h; Grupo 3 doses (TD, n=17): 120 mg de pFSH administradas em três doses decrescentes (60; 40; 20 mg), intervaladas de 24 h e Grupo dose única (DU, n=17): 70 mg de pFSH e 200 UI de eCG (Novormon, Syntex, Argentina) administradas em única dose 36 h antes da colheita de oócitos por laparoscopia (COL). As injeções de pFSH de GP e TD foram iniciadas no oitavo dia do tratamento progestágeno. O sistema de colheita oocitária consistiu de uma agulha 22G e uma bomba de vácuo a 30 mmHg. Os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram recuperados em TCM199 acrescido de HEPES (10 mM), heparina (20 UI/mL) e gentamicina (40 µg/mL). Os CCOs foram classificados em grau I, II, III ou IV, de acordo com critérios visuais (Baldassarre *et al.*, 2003). Os CCOs com boa qualidade (graus I e II) foram submetidos a MIV, sendo incubados em TCM199 suplementado com cisteamina (100 µM), EGF (10 ng/mL) e gentamicina (40 µg/mL) a 5% de CO₂, 38,5 °C por 24 h. A avaliação da maturação foi realizada pela visualização do 1º corpúsculo polar em microscópio invertido. Os dados foram expressos em percentual médio ($\pm$ desvio padrão) e comparados através do teste exato de Fisher. Os três grupos experimentais não diferiram ($P > 0,05$) quanto à produção de oócitos de boa qualidade, com $70,4 \pm 3,0\%$ das estruturas classificadas em grau I ou II. No entanto, a taxa de MIV para o grupo TD (32,1%) foi estatisticamente inferior ($P=0,04$) à taxa do grupo GP (49,1%). Por outro lado, o percentual de MIV não diferiu ($P=0,89$) entre os grupos DU (46,2%) e GP. Assim, a produção de oócitos para MIV pode ser facilitada quanto à execução, sem afetar a qualidade oocitária, através da utilização da estimulação ovariana com dose única de pFSH e eCG. Em conclusão, ambos os grupos experimentais (GP e DU) podem ser utilizados na obtenção de oócitos competentes à MIV em caprinos da raça Canindé.

