

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

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E DA MATURAÇÃO NUCLEAR *IN VITRO*
EM COMPLEXOS *CUMULI*-OÓCITOS BOVINOS

Dissertação de Mestrado

Fernanda Araujo de Britto Velho

Porto Alegre

2011

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

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E DA MATURAÇÃO NUCLEAR *IN VITRO*
EM COMPLEXOS *CUMULI*-OÓCITOS BOVINOS

AUTOR: Fernanda Araujo de Britto Velho

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na área de Reprodução Animal

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rui Fernando Felix Lopes

Porto Alegre

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Britto Velho, Fernanda Araujo de
Avaliação da expressão gênica e da maturação
nuclear in vitro em complexos cumuli-oócitos bovinos
/ Fernanda Araujo de Britto Velho. -- 2011.
41 f.

Orientador: Rui Fernando Felix Lopes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Reprodução animal. 2. Maturação in vitro. 3.
Expressão gênica. 4. Cumulus-oophorus. I. Lopes, Rui
Fernando Felix, orient. II. Título.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E DA MATURAÇÃO NUCLEAR *IN VITRO*
EM COMPLEXOS *CUMULI*-OÓCITOS BOVINOS

APROVADO POR:

Prof. Dr. Rui Fernando Felix Lopes
Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Adriana Bos Mikich
Membro da Comissão - UFRGS

Prof. Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira
Membro da Comissão - UFCSPA

Dra. Fabiana Forell - CAV/UEDESC
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Rui Fernando Felix Lopes, pelo exemplo, dedicação, orientação na iniciação científica e curso de mestrado, apoio, paciência e amizade em todos os momentos.

Ao Professor Alexandre Tavares Duarte de Oliveira, pela amizade, incentivo e por todo o auxílio na realização desta dissertação.

Ao Frigorífico Sim Sul, nas pessoas do Médico Veterinário Sérgio Luiz Araújo Galvão dos Santos, do Sr. João Roberto Rau e do Sr. Alceu Moisés da Silveira, pela extrema boa vontade na coleta e fornecimento dos ovários, viabilizando a realização deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica Bruna Grandi da Costa, Bianca Letícia da Rosa Braga, Diego Duarte Alcoba, Nathallie Louise Sandi Monroy, por todo o auxílio na realização dos experimentos, e pelos agradáveis momentos de convívio.

À minha família, pelo incentivo em mais esta etapa da minha vida.

Ao Leandro, pelo apoio e companheirismo.

À amiga Eliana Franco Lopes, pelo incentivo e amizade.

Aos amigos e colegas de trabalho que me incentivaram, principalmente durante o final do curso de mestrado.

A todos que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dentre os principais desafios que persistem no campo da biologia da reprodução está a compreensão da natureza dos processos celulares e moleculares que determinam a qualidade dos oócitos. Um dos fenômenos a serem melhor compreendidos é a aquisição da competência do oócito, e qual o papel desempenhado pelo ambiente folicular que circunda o gameta no seu potencial de desenvolvimento. As células foliculares, especialmente as células do *cumulus*, certamente desempenham um papel fundamental na aquisição da competência de oócitos *in vivo*. Durante a maturação *in vitro* (MIV) do oócito observa-se expansão e mucificação das células da granulosa que formam o complexo *cumulus oophorus*-oócito (CCO), em função da intensa síntese de componentes da matriz extracelular. Essas modificações no aspecto do *cumulus* são utilizadas como indicativo da ocorrência de maturação oocitária e contribuem para que ocorra a fecundação. A expressão de proteínas associadas à matriz extracelular das células do *cumulus* pode estar sob influência de fatores de origem oocitária, e também pode estar relacionada à composição do meio de MIV. Os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar a expressão dos transcritos dos genes que codificam para as proteínas ácido hialurônico sintase 2 (HAS2), link protein 1 (HAPLN1), conexina 43 (GJA1) e β -actina (ACTB) em complexos *cumuli*-oócitos (CCOs) bovinos não maturados, e submetidos à maturação *in vitro* em meios com diferentes suplementações protéicas; e 2) avaliar as taxas de maturação nuclear dos oócitos submetidos às diferentes condições de MIV. Os CCOs foram obtidos a partir de ovários coletados de fêmeas bovinas logo após o abate, selecionados morfológicamente e distribuídos em três grupos experimentais: **G1**: CCOs não maturados; **G2**: CCOs submetidos à MIV em meio TCM suplementado com soro fetal bovino (SFB); **G3**: CCOs submetidos à MIV em meio TCM suplementado com albumina sérica bovina (BSA). A MIV foi realizada em a 39°C, 5% de CO₂ e máxima umidade relativa, por 22 a 24 horas. Para a extração do RNA total das amostras de CCOs foi utilizado o reagente TRIzol®. O RNA total foi submetido à captação específica do mRNA através de separação magnética (Dynabeads® mRNA™ DIRECT Micro Kit). Os mRNAs foram transcritos reversamente em cDNA utilizando-se a técnica de RT-PCR, para avaliar os padrões de expressão dos transcritos. Parte dos oócitos dos grupos **G2** e **G3** foi desnudada das células do *cumulus*, e submetida à coloração com Hoechst 33342, para avaliação da maturação nuclear. A análise dos resultados de abundância relativa dos mRNAs de interesse mostrou diferença significativa entre os diferentes grupos testados para os transcritos de *HAS2* (p=0,000), *link protein 1* (p=0,001), *conexina 43* (p=0,007) e *β -actina* (p=0,011), sendo maior nos grupos de CCOs submetidos à MIV em meio suplementado com SFB. A avaliação da morfologia nuclear não mostrou diferenças significativas entre as taxas de maturação nos grupos **G2** e **G3**. Pode-se concluir que a exposição de CCOs bovinos à diferentes condições de MIV influenciou a expressão dos transcritos de *HAS2*, *link protein 1*, *conexina 43* e *β -actina*. Entretanto, a MIV em presença de SFB ou BSA não mostrou diferença nas taxas de retomada da meiose e de maturação nuclear.

Palavras chave: *cumulus oophorus*, expressão gênica, maturação *in vitro*.

ABSTRACT

Understanding the cellular and molecular processes that determine the oocytes quality is one of the main challenges that persist in biology of reproduction. The acquisition of oocyte competence, and the role played by the follicular environment surrounding the gamete in its development potential are phenomena to be better understood. Follicular cells, especially the *cumulus* cells, certainly play a role in the oocyte competence acquisition *in vivo*. During *in vitro* maturation (IVM) of oocytes was observed expansion and mucification of granulosa cells forming the *cumulus*-oocyte complex (COC), due to the intense synthesis of extracellular matrix components. These changes in the appearance of *cumulus* are used as indicative of the oocyte maturation occurrence and contribute to fertilization to occur. The expression of proteins associated with the extracellular matrix of *cumulus* cells may be under the influence of oocyte origin, and may also be related to the composition of the IVM medium. The aim of this work were 1) to evaluate the expression of gene transcripts coding for proteins hyaluronic acid synthase 2 (HAS2), link protein 1 (HAPLN1), connexin 43 (GJA1) and actin- β (ACTB) in bovine *cumulus*-oocyte complexes (COCs) not matured or submitted to IVM in media with different proteic supplements, and 2) assess the rates of nuclear maturation of oocytes subjected to different conditions of IVM. The COCs were obtained from ovaries collected from cows immediately after slaughter, morphologically selected and divided into three groups: **G1**: not matured COCs; **G2**: COCs submitted to IVM in TCM supplemented with fetal calf serum (FCS); and **G3**: COCs submitted to IVM in TCM supplemented with bovine serum albumin (BSA). IVM was performed at 39°C in 5% CO₂ and maximum relative humidity for 22 to 24 hours. For extraction of total RNA of COCs samples, TRIzol[®] reagent was used. Total RNA was subjected to capture of specific mRNA by magnetic separation (Dynabeads[®] mRNA[™] DIRECT Micro Kit). The mRNAs were reverse-transcribed into cDNA using the RT-PCR to evaluate the expression patterns of transcripts. Some of the oocytes from **G2** and **G3** was stripped of *cumulus* cells, and subjected to staining with Hoechst 33342 to assess nuclear maturation. The analysis of relative abundance of interest mRNAs showed a significant difference between the different groups tested for transcripts of *HAS2* ($p = 0.000$), *link protein 1* ($p = 0.001$), *connexin 43* ($p = 0.007$) and *actin- β* ($p = 0.011$), being higher in the groups of COCs submitted to IVM in medium supplemented with FCS. The evaluation of nuclear morphology showed no significant differences between maturation rates of **G2** and **G3**. In conclusion, the IVM in media supplemented with FCS or BSA showed differences in *HAS2*, *link protein 1*, *connexin 43* and *actin- β* transcripts expression of bovine COCs. However, the nuclear maturation rates of oocytes subjected to IVM in media with different proteic supplements was not affected.

Key words: *cumulus* cells, gene expression, *in vitro* maturation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	Maturação Oocitária	9
2.1.1	Maturação Nuclear	9
2.1.2	Maturação Citoplasmática	11
2.2	<i>Cumulus Oophorus</i>	12
2.2.1	Junções Comunicantes	12
2.2.2	Funções do <i>Cumulus Oophorus</i> durante a Maturação Oocitária	14
2.2.2.1	Controle da Divisão Meiótica	14
2.2.2.2	Maturação Citoplasmática do Oócito	15
2.2.3	Matriz Extracelular do <i>Cumulus Oophorus</i>	15
3	ARTIGO: Avaliação da expressão gênica e da maturação nuclear <i>in vitro</i> em complexos <i>cumuli</i>-oócitos bovinos	17
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos é uma tecnologia na qual, embora a maturação e fecundação prossigam de forma aparentemente normal, a proporção de embriões que alcançam o estágio de blastocisto dificilmente é superior a 40 %, e muitas vezes estes embriões apresentam comprometimento em qualidade e competência. Evidências indicam que, enquanto as condições de cultivo durante a PIV podem ter impacto sobre o potencial de desenvolvimento do embrião nos estádios iniciais, a qualidade intrínseca do oócito é o fator-chave, determinando a proporção de oócitos que desenvolverão até o estágio de blastocisto.

Dentre os principais desafios que persistem no campo da biologia da reprodução está a compreensão da natureza dos processos celulares e moleculares que determinam a qualidade dos oócitos. Um dos fenômenos a serem melhor compreendidos é a aquisição da competência do oócito, e qual o papel desempenhado pelo ambiente folicular que circunda o oócito no seu potencial de desenvolvimento.

A competência do oócito em se desenvolver pode ser definida como sua capacidade de sofrer maturação, ser fecundado e originar descendência normal e fértil, após uma gestação normal. A competência de oócitos obtidos de folículos em crescimento e maturados *in vitro* é mais baixa que a competência de oócitos maturados *in vivo*. Rizo *et al.* (2002) demonstraram que oócitos maturados *in vivo* são mais competentes que oócitos maturados *in vitro*.

As condições de maturação têm influência importante no número de embriões com desenvolvimento até o estágio de blastocisto, sugerindo que modificações nos meios e protocolos de maturação *in vitro* (MIV) ainda poderiam ser feitas, para melhorar a competência do oócito e as taxas de desenvolvimento embrionário.

As células somáticas do folículo, especialmente as células do *cumulus*, certamente desempenham um papel fundamental na aquisição da competência de oócitos *in vivo*. A associação entre o oócito e as células da granulosa permanece durante as fases de crescimento, diferenciação, maturação e fecundação do oócito. Esta comunicação é crucial tanto para o crescimento e diferenciação do oócito como para as células do *cumulus*, permitindo o sucesso do processo de oogênese.

A competência de desenvolvimento de oócitos pode ser determinada por marcadores, expressos pelas células foliculares que o circundam. Entretanto, segundo estes autores, a relação entre a expressão de genes específicos durante o crescimento folicular e sua capacidade de determinar a qualidade do embrião ainda precisa ser melhor investigada.

O excesso das células da granulosa e do *cumulus* normalmente é descartado durante

os procedimentos de recuperação dos oócitos. A análise do perfil de expressão gênica destas células poderia refletir de forma confiável o potencial de fertilidade dos oócitos de uma forma não-invasiva. Além disso, informações sobre condições favoráveis associadas à produção de folículos de boa qualidade poderiam ser úteis na otimização de protocolos de estimulação ovariana.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar a expressão dos transcritos dos genes que codificam para as proteínas ácido hialurônico sintase 2 (HAS2; hyaluronan synthase 2), link protein 1 (HAPLN1; hyaluronan and proteoglycan link protein 1), conexina 43 (GJA1; gap junction protein, alpha 1, 43kDa) e β -actina (ACTB; actin, beta) em complexos *cumuli*-oócitos (CCOs) bovinos não maturados, e submetidos à MIV em meio suplementado com albumina sérica bovina ou soro fetal bovino; e 2) avaliar as taxas de maturação nuclear dos oócitos submetidos às diferentes condições de MIV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Maturação Oocitária

A maturação oocitária está relacionada a uma seqüência de mudanças sofridas pelo gameta feminino, que envolvem transformações nucleares, citoplasmáticas e de membranas, preparando o oócito para a fecundação. O término destas mudanças permite a ocorrência de fecundação normal e desenvolvimento embrionário (SZÖLLÖSI, 1993; MATZUK, 2002).

Mehllmann (2005) define maturação oocitária como sendo o processo pelo qual o oócito completa sua primeira divisão meiótica, e sofre outras modificações citoplasmáticas, progredindo até a metáfase II.

Durante a transição folicular preantral a antral, o oócito adquire a capacidade de recomeçar a meiose. Assim que é possível a resolução meiótica, considera-se que o oócito é competente (SZÖLLÖSI, 1993; MATZUK, 2002). Segundo Hyttel *et al.* (1997), os oócitos bovinos gradualmente adquirem competência para sofrer maturação meiótica, ao atingir um diâmetro entre 100 e 110 μm .

Segundo Bézard (1997), um oócito é considerado maduro quando está apto a ser fecundado normalmente por um espermatozóide, com formação normal de pró-núcleo e desenvolvimento embrionário.

A competência de oócitos obtidos de folículos em crescimento e maturados *in vitro* é mais baixa que a competência de oócitos maturados *in vivo* (HENDRIKSEN *et al.*, 2000). As condições de maturação (oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*) têm influência importante no número de embriões com desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Isto sugere que modificações nos meios e protocolos de maturação ainda poderiam ser feitas, para melhorar a competência do oócito e taxas de desenvolvimento embrionário (CALDER *et al.*, 2003).

2.1.1 Maturação Nuclear

A maturação meiótica do oócito é iniciada em folículos de diferentes tamanhos nas diferentes espécies. A maturação só é possível quando uma série de processos preparatórios no folículo tenha sido completada, sendo que o mais evidente é o crescimento do oócito e aumento de volume do fluido folicular. Oócitos de mamíferos devem completar a fase de crescimento para seu tamanho crítico antes que possa adquirir competência para maturação. Em camundongos, esta fase de crescimento do oócito ocorre durante o desenvolvimento no período preantral, e normalmente termina quando o folículo atinge o estágio antral. Em bovinos, o oócito continua aumentando seu tamanho durante o desenvolvimento do folículo

antral. Acredita-se que oócitos de bovinos devem atingir um diâmetro crítico de 100 a 110 µm para adquirir competência meiótica completa (HYTTEL *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1998). Segundo Szöllösi (1993), os oócitos devem alcançar aproximadamente 80% do seu tamanho final para tornarem-se aptos a recomeçar a meiose. Segundo Hendriksen *et al.* (2000), o momento em que os oócitos adquirem competência para serem fecundados e se desenvolver *in vitro* até o estágio de blastocisto coincide com o término do seu crescimento e da maior parte da síntese de RNA.

A maturação do oócito tem início com a maturidade sexual. O bloqueio da meiose é mantido até a puberdade, quando a onda pré-ovulatória de FSH e LH estimula a resolução da meiose em um ou mais oócitos, dependendo da espécie. Como consequência, oócitos que completaram seu crescimento nos folículos reiniciam seu desenvolvimento na divisão meiótica I: os cromossomos re-condensam, a vesícula germinativa é rompida (marcando o início da maturação), e os cromossomos homólogos replicados separam-se na anáfase I dando origem a dois núcleos, cada um contendo a metade do número original de cromossomos. No término da meiose I, o citoplasma é dividido assimetricamente, gerando duas células de diferentes tamanhos: uma pequena, chamado corpúsculo polar, e outra grande, o oócito secundário. Neste momento, cada um dos cromossomos é ainda composto de duas cromátides, que só serão separadas na meiose II, gerando duas células individuais. Após a separação dos cromossomos na anáfase II, o citoplasma do oócito secundário se divide novamente originando o oócito maduro e um segundo corpúsculo polar, ambos contendo um número haplóide de cromossomos. Devido às duas divisões citoplasmáticas assimétricas, os oócitos mantêm um tamanho grande, apesar de sofrerem duas divisões celulares (HYTTEL *et al.*, 1997; GOSDEN; KRAPEZ; BRIGGS, 1997; DE LA FUENTE, 2006).

A maturação do oócito bovino progride até a metáfase da meiose II e então repousa até a fecundação. Na ovulação, o oócito secundário em repouso é liberado do ovário e, se a fecundação ocorrer, o oócito é estimulado a completar a meiose (STAIGMILLER & ENGLAND, 1982; HYTTEL *et al.*, 1997; GOSDEN *et al.*, 1997). A maturação meiótica pode ser induzida experimentalmente em um determinado período, antes que o folículo tenha alcançado seu tamanho pré-ovulatório definitivo.

Quando oócitos em crescimento são removidos dos folículos antes da onda de gonadotrofinas e colocados em meio de cultivo, completam a primeira divisão meiótica e maturam *in vitro*. Porém, mostram pouco potencial para uma fecundação normal e desenvolvimento embrionário (DRAIN COURT & CAHILL, 1984; HYTTEL *et al.*, 1997).

Ainda que a maturação oocitária envolva alterações nucleares e citoplasmáticas, na

prática a avaliação da maturação do oócito utilizada na rotina de fecundação *in vitro* (FIV) é a observação da expansão das células do *cumulus* e da emissão do primeiro corpúsculo polar, que indicam que a metáfase II foi atingida (BÉZARD, 1997).

A capacidade dos oócitos alcançarem a metáfase II em cultivo é relacionada às condições de cultivo durante a maturação *in vitro* (MIV). A adição de gonadotrofinas e esteróides ao meio de maturação, permite a MIV destas estruturas fora do folículo, resultando em um aumento do potencial de fecundação e desenvolvimento embrionário (XU *et al.* 1987). O meio de cultivo mais comumente utilizado para a MIV é o TCM 199 suplementado com soro e hormônios (PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1991; HAWK & WALL, 1994, OLIVEIRA *et al.*, 2006). Embora pelo menos 80% dos oócitos bovinos coletados de folículos antrais sofram maturação nuclear espontaneamente em cultivo, freqüentemente são adicionadas gonadotrofinas ao meio de maturação para induzir maturação citoplasmática, expansão do *cumulus* e para melhorar o desenvolvimento embrionário (CALDER *et al.*, 2003).

2.1.2 Maturação Citoplasmática

A maturação nuclear completa não é suficiente para garantir a qualidade do oócito para ser fecundado e promover o crescimento de um embrião. A maturação citoplasmática também deve ser concluída. Enquanto a maturação nuclear consiste principalmente na segregação dos cromossomos, a maturação citoplasmática envolve a reorganização de organelas e armazenamento de RNAs mensageiros, proteínas e fatores de transcrição, que atuam durante os processos de maturação, fecundação e início da embriogênese (FERREIRA *et al.*, 2009).

Durante a maturação oocitária, ocorrem várias mudanças na organização citoplasmática, tais como um desenvolvimento contínuo da reserva lipídica, redução do compartimento de Golgi, rearranjo das mitocôndrias e alinhamento dos grânulos corticais ao longo do oolema. Segundo Bézard (1997), a migração de grânulos corticais para o oolema é um critério utilizado para avaliar a maturação citoplasmática em oócitos de mamíferos.

O aumento do compartimento lipídico provavelmente constitui uma reserva energética para o oócito suportar o desenvolvimento após a fecundação até o estágio de blastocisto (DIELEMAN *et al.*, 2002).

A maturação citoplasmática é composta da aquisição de um fator que permite a descondensação da cromatina espermiática e a substituição de suas nucleoproteínas. As células da granulosa são responsáveis pela aquisição desta capacidade, poucas horas após a descarga

de gonadotrofinas (SZÖLLÖSI, 1993).

O desenvolvimento embrionário *in vitro* no estágio de blastocisto é significativamente menor do que *in vivo*, e isto pode ocorrer devido a deficiências na competência do oócito. Embora grande parte dos oócitos bovinos sofra maturação nuclear espontaneamente, pouco se conhece sobre os requerimentos para uma adequada maturação citoplasmática (CALDER *et al.*, 2003).

2.2 Cumulus Oophorus

A formação do antro folicular subdivide as células da granulosa em duas populações distintas tanto espacialmente quanto funcionalmente: as células do *cumulus oophorus*, e as células da granulosa parietal. As células do *cumulus oophorus* (aproximadamente 1.000 por folículo) estão intimamente próximas ao oócito, enquanto que as células da granulosa parietal (em torno de 50.000 por folículo) formam a parede do folículo (SALUSTRI *et al.*, 1990; MATZUK, 2002).

As células do *cumulus* e as células da granulosa parietal são diferentes morfológicamente, e existem evidências que o oócito desempenhe um papel decisivo na determinação do destino destas células somáticas, através da secreção de fatores que promovem a sua proliferação (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990; GILCHRIST *et al.*, 2006).e regulam seu metabolismo e secreção (LI *et al.*, 2000; SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON, 2003).

As células do *cumulus* e as células da granulosa parietal juntamente com o oócito formam um sincício mediado por junções comunicantes, o qual é essencial para o crescimento do oócito. As células da granulosa fornecem nutrientes aos oócitos e os conectam com o ambiente externo (VAN SOOM *et al.*, 2002).

2.2.1 Junções Comunicantes

Ainda nos primeiros estágios foliculares, vários complexos juncionais são encontrados entre o oócito e as células foliculares, sendo que os mais importantes são as junções comunicantes. Uma vez estabelecidas, estas junções são uma das principais características do folículo ovariano. A comunicação intercelular entre o oócito e as células da granulosa, através destas junções, fornece suporte nutricional para o crescimento do oócito (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990).

As junções comunicantes permitem a troca de íons, segundo-mensageiros e pequenas moléculas, as quais são importantes para a comunicação célula-célula e para respostas

coordenadas (SIMON & GOODENOUGH, 1998). Embora estas células sejam incapazes de prover o oócito com macromoléculas pré-formadas através das junções comunicantes, elas podem contribuir no abastecimento de moléculas precursoras pequenas, com as quais as macromoléculas são formadas (CALDER *et al.*, 2003).

As conexinas são uma família de proteínas transmembrana que formam as junções comunicantes. Conexina-43 (Cx43) é uma proteína de junções comunicantes, a qual está envolvida no crescimento folicular. A quantidade da Cx43 aumenta nas células da granulosa de folículos bovinos na transição dos estágios pré-antral para antral. Além disso, durante a MIV, tanto o mRNA da Cx43 quanto a proteína estão presentes no complexo *cumulus*-oócito bovino (CALDER *et al.*, 2003).

Embora grande quantidade da Cx43 possa ser inativada durante a maturação do oócito, algumas junções comunicantes permanecem funcionais. A maturação de oócitos bovinos é dependente de junções comunicantes funcionais, assim com o bloqueio das junções comunicantes ou a redução de mRNA de Cx43 e da proteína estão associados com uma inibição da maturação do oócito. Ainda, Cx43 pode ser um importante mediador de sinais do *cumulus* para o oócito, promovendo a maturação do oócito durante a MIV (SUTOVSKY *et al.*, 1993; CALDER *et al.*, 2003).

Estes contatos celulares são importantes durante a existência dos folículos, não somente para o crescimento do oócito, mas também para sua manutenção metabólica. As células em contato direto com o oócito devem ser capazes de responder a certas moléculas secretadas por ele, como por exemplo, a secreção de ácido hialurônico pelo *cumulus* em resposta a sinais moleculares liberados pelo oócito (TANGHE *et al.*, 2002).

As junções entre o oócito e as células do *cumulus* são fundamentais, inicialmente para manter o oócito na prófase I da meiose e, após, para estimular o oócito a recomeçar a meiose no momento da ovulação (TANGHE *et al.*, 2002).

O crescimento do oócito não pode ser obtido *in vitro* na ausência das células foliculares e de junções comunicantes funcionais entre as células do *cumulus* e o oócito. Na sua ausência, não ocorre crescimento. Segundo Szöllösi (1993), a remoção das células do *cumulus* antes da MIV de oócitos bovinos é prejudicial ao processo de maturação.

A associação entre o oócito e as células da granulosa permanece durante as fases de crescimento, diferenciação, maturação e fecundação do oócito. Esta comunicação é crucial tanto para o crescimento e diferenciação do oócito como para as células da granulosa, permitindo o sucesso do processo de oogênese (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990).

2.2.2 Funções do *Cumulus Oophorus* durante a Maturação Oocitária

O *cumulus oophorus* totalmente desenvolvido exerce três importantes funções biológicas: antes da ovulação, o *cumulus* controla a maturação do oócito, durante a ovulação, auxilia na captação do oócito pela fímbria, e durante a fecundação participa dos mecanismos complexos que controlam o acesso do espermatozóide ao oócito (TANGHE *et al.*, 2002; VAN SOOM *et al.*, 2002).

As células do *cumulus* desempenham um importante papel no processo de maturação do oócito por mantê-lo sob bloqueio meiótico, participar na indução da meiose por conduzir o sinal do LH ao oócito e também são responsáveis pela própria maturação citoplasmática do oócito. Estas funções do *cumulus* durante a maturação oocitária podem ser atribuídas a sua rede de junções comunicantes e a suas características metabólicas específicas (TANGHE *et al.*, 2002; VAN SOOM *et al.*, 2002).

2.2.2.1 Controle da Divisão Meiótica

O bloqueio da meiose de oócitos mamíferos em um estado quiescente existe até a célula se tornar competente para responder à ação hormonal *in vivo* ou, quando após a remoção do oócito do interior do folículo, ele possa completar espontaneamente o processo de maturação em condições de cultivo. *In vivo*, células da granulosa bovina são capazes de manter o bloqueio da divisão meiótica em folículos normais até o momento do pico pré-ovulatório de LH (SIRARD; BILODEAU, 1990). O fator responsável pelo bloqueio da meiose tem origem nas células da granulosa, e deve passar através das células do *cumulus* ou ser transformado por elas para se tornar ativo. Várias substâncias poderiam atuar como inibidores da maturação meiótica, como por exemplo as purinas (adenosina e hipoxantina) e o AMP cíclico (SZÖLLÖSI, 1993).

Os níveis de AMP cíclico (cAMP) no oócito desempenham um papel dominante no reinício da meiose. O aumento experimental de cAMP interferiu no processo da retomada da divisão meiótica. A redução dos níveis de cAMP reestabelece as condições para a continuidade da meiose. Células do *cumulus* evidentemente controlam a meiose, visto que os componentes que elevam os níveis intracelulares de cAMP inibem ou detêm o reinício da meiose em oócitos envolvidos por células do *cumulus*, enquanto que nos oócitos cultivados sem as células do *cumulus* o mesmo não acontece. A retirada de oócitos do meio inibidor de meiose presente nos folículos não é suficiente para a maturação fisiológica dos oócitos (SZÖLLÖSI, 1993; MATZUK, 2002; MEHLLMANN, 2005). É necessário que os oócitos adquiram maturação citoplasmática, processo também influenciado pelas células do *cumulus*.

Diferentes mecanismos pelos quais as gonadotrofinas poderiam estimular o reinício da meiose são propostos. Primeiro, a ruptura ou bloqueio das junções comunicantes entre as células da granulosa e as células do *cumulus* é muito rápida, e precede o reinício da meiose. *In vivo*, a meiose é reiniciada quando as junções comunicantes são rapidamente eliminadas na totalidade do complexo células da granulosa parietal - células do *cumulus*, interrompendo o transporte do fator inibidor da meiose para o oócito. Segundo, a liberação pré-ovulatória de LH promove modificações importantes na expressão gênica em células da granulosa e estimula indiretamente a maturação meiótica do oócito e a ovulação de um oócito no estágio de metáfase II, o qual é competente para ser fecundado. Nesta hipótese, as células da granulosa interpretariam o sinal do LH e enviariam um segundo mensageiro para o oócito (SZÖLLÖSI, 1993; TANGHE, 2002).

2.2.2.2 Maturação Citoplasmática do Oócito

Embora ocorra o reinício espontâneo da meiose quando oócitos são incubados *in vitro*, as células do *cumulus* têm um papel fundamental na maturação citoplasmática e desenvolvimento subsequente (KONISHI *et al.*, 1996).

As células do *cumulus* desempenham um importante papel metabólico e protetor durante a maturação citoplasmática. As células da granulosa reduzem cistina a cisteína e promovem a captação de cisteína em oócitos bovinos durante a maturação. Desta forma, os níveis intercelulares de glutatona são aumentados, resultando em maiores taxas de fecundação normal e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (TANGHE *et al.*, 2002).

As células do *cumulus* também metabolizam glicose produzindo piruvato através do ciclo de Krebs, fornecendo piruvato ao oócito e, assim, melhorando sua qualidade. Oócitos cultivados sem as células da granulosa têm pouca habilidade para metabolizar glicose em comparação com oócitos cultivados com o *cumulus* (TANGHE *et al.*, 2002).

2.2.3 Matriz Extracelular do *Cumulus Oophorus*

No folículo pré-ovulatório bovino, o *cumulus oophorus* expande dramaticamente quando as células do *cumulus*, que consistem de poucas camadas de células da granulosa intimamente circundando o oócito, são induzidas a sintetizar grandes quantidades de ácido hialurônico. O ácido hialurônico interage com componentes específicos da matriz, formando uma matriz extracelular altamente hidratada e viscosa nos espaços intercelulares, resultando em um aumento de 20 a 40 vezes o volume do complexo *cumulus*-oócito. A expansão do

cumulus causa sua dissociação da parede folicular (TIRONE *et al.*, 1997; ZHUO & KIMATA, 2001). Segundo Yokoo *et al.* (2002), a quantidade de ácido hialurônico sintetizada é estreitamente correlacionada com o grau de expansão do *cumulus*.

A matriz extracelular do *cumulus* é composta por ácido hialurônico, proteoglicanos e proteínas, como as proteínas de ligação ao ácido hialurônico, que podem estar envolvidas na função do ácido hialurônico de formar a matriz extracelular dos complexos *cumuli*-oócitos (YOKOO *et al.*, 2002). O complexo *cumulus*-oócito expandido possui uma matriz complexa contendo o ácido hialurônico organizado em uma rede tridimensional através da qual ocorrem interações específicas com outras macromoléculas da matriz extracelular, responsáveis pela expansão e mucificação das células do *cumulus* (CAMAIONI *et al.*, 1996). Segundo Testart (1985), a condição mucosa do *cumulus oophorus* é normalmente correlacionada com a ocorrência de maturação do oócito.

Uma glicoproteína de ligação, a "link protein", encontrada também em cartilagens, interage especificamente com a molécula de ácido hialurônico, estabilizando a ligação de monômeros de proteoglicanos ao ácido hialurônico para a formação de moléculas agregadas (KOBAYASHI *et al.*, 1999). Sun; Kobayashi; Terao (1999), através de técnicas de imunohistoquímica, detectaram a presença de "link protein" principalmente na matriz extracelular do *cumulus*. A presença desta proteína não foi observada após tratamento com hialuronidase, sugerindo sua ligação a moléculas de ácido hialurônico.

Além das contribuições das células do *cumulus oophorus* durante a maturação do oócito, elas também previnem alterações do oócito prejudiciais à fecundação. Em camundongos, a remoção do *cumulus oophorus* durante a maturação do oócito resultou em um aumento da resistência da zona pelúcida à digestão proteolítica e penetração espermática (VAN SOOM *et al.*, 2002).

A expansão do complexo *cumulus*-oócito também pode facilitar a extrusão do oócito através da parede folicular rompida durante a ovulação, e auxiliar sua captura pela fímbria do oviduto. Além disso, o ácido hialurônico e proteoglicanos como o dermatan sulfato podem contribuir para o sucesso da fecundação do oócito através da estabilização da zona pelúcida, e por estimular a ativação e motilidade espermática (TIRONE *et al.*, 1997).

Chen; Russell; Larsen (1993) correlacionaram a eficiência da fecundação com a quantidade e qualidade da expansão das células do *cumulus*, verificando também que a perda ou remoção mecânica das células do *cumulus* foi relacionada com diminuição das taxas de fecundação *in vitro*.

3 ARTIGO

Avaliação da expressão gênica e da maturação nuclear *in vitro* em complexos cumuli-oócitos bovinos

Running headline: Maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Fernanda Araujo de Britto Velho

Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Porto Alegre, Brasil

Bruna Grandi da Costa

Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Porto Alegre, Brasil

Diego Duarte Alcoba

Laboratório de Biologia Celular – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – Porto Alegre, Brasil

Bianca Letícia da Rosa Braga

Laboratório de Biologia Celular – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – Porto Alegre, Brasil

Nathallie Louise Sandi Monroy

Laboratório de Biologia Celular – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – Porto Alegre, Brasil

Alexandre Tavares Duarte de Oliveira

Laboratório de Biologia Celular – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – Porto Alegre, Brasil

Rui Fernando Felix Lopes

Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Porto Alegre, Brasil

Correspondence:

Rui Fernando Felix Lopes

Rua Sarmento Leite, 500 - sala 001D

Porto Alegre - Rio Grande do Sul

90050-170 - Brasil

Fone: +55 (51) 3308 3631

Fax: +55 (51) 3308 3146 / e-mail: rui.lopes@ufrgs.br

*artigo a ser submetido para publicação na revista Zygote

RESUMO

Durante a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos observa-se expansão e mucificação das células da granulosa que formam o complexo *cumulus oophorus*-oócito (CCO), em função da intensa síntese de componentes da matriz extracelular. Essas modificações no aspecto do *cumulus* são utilizadas como indicativo da ocorrência de maturação oocitária e contribuem para que ocorra a fecundação. A expressão de proteínas associadas à matriz extracelular das células do *cumulus* pode estar sob influência de fatores de origem oocitária, e também pode estar relacionada à composição do meio de MIV. Os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar a expressão dos transcritos dos genes que codificam para as proteínas ácido hialurônico sintase 2 (HAS2), link protein 1 (HAPLN1), conexina 43 (GJA1) e β -actina (ACTB) em complexos *cumuli*-oócitos (CCOs) bovinos não maturados ou submetidos à maturação *in vitro* em meios com diferentes suplementações protéicas; e 2) avaliar as taxas de maturação nuclear dos oócitos submetidos às diferentes condições de MIV. Os CCOs foram selecionados e distribuídos em três grupos experimentais: **G1**, CCOs não submetidos à MIV; **G2**, CCOs submetidos à MIV em meio suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB); **G3**, CCOs submetidos à MIV em meio suplementado com 0,4 % de albumina sérica bovina (BSA). Foi utilizada a técnica de RT-PCR para a obtenção do cDNA e amplificação dos fragmentos específicos dos transcritos dos quatro genes. Parte dos oócitos foi submetida à coloração com Hoechst para a avaliação da morfologia nuclear. A análise dos resultados mostrou diferença significativa entre os grupos para a abundância relativa dos transcritos de *HAS2* (p=0,000), *link protein 1* (p=0,001), *conexina 43* (p=0,007) e *β -actina* (p=0,011). Não foram encontradas diferenças entre as taxas de maturação dos oócitos submetidos à MIV nos diferentes meios.

Palavras-chave: maturação *in vitro*, *cumulus oophorus*, expressão gênica.

INTRODUÇÃO

Dentre os principais desafios que persistem no campo da biologia da reprodução está a compreensão da natureza dos processos celulares e moleculares que determinam a qualidade dos oócitos (Gilchrist *et al.*, 2008). Um dos fenômenos a ser melhor compreendido é a aquisição da competência do oócito, e qual o papel desempenhado pelo ambiente folicular que circunda o oócito no seu potencial de desenvolvimento (Gilchrist e Thompson, 2007). A

competência do oócito em se desenvolver pode ser definida como sua capacidade de sofrer maturação, ser fecundado e originar descendência normal e fértil, após uma gestação normal (Duranthon e Renard, 2001). A competência de oócitos obtidos de folículos em crescimento e maturados *in vitro* é mais baixa que a competência de oócitos maturados *in vivo* (Hendriksen *et al.*, 2000). Rizos *et al.* (2002) demonstraram que oócitos maturados *in vivo* são mais competentes que oócitos maturados *in vitro*.

As condições de maturação têm influência importante no número de embriões com desenvolvimento até o estágio de blastocisto, sugerindo que modificações nos meios e protocolos de maturação *in vitro* (MIV) ainda poderiam ser feitas, para melhorar a eficiência do processo de MIV e taxas de desenvolvimento embrionário e gestação (Calder *et al.*, 2003). As células somáticas do folículo, especialmente as células do *cumulus*, certamente desempenham um papel fundamental na aquisição da competência de oócitos *in vivo* (Gilchrist e Thompson, 2007). O complexo *cumulus oophorus*-oócito (CCO) formado pela associação entre o oócito e as células do *cumulus* permanece durante as fases de crescimento, diferenciação, maturação e fecundação do oócito. Esta comunicação é crucial tanto para o crescimento e diferenciação do oócito como para as células da granulosa, permitindo o sucesso do processo de oogênese (Buccione *et al.*, 1990). Segundo Hamel *et al.* (2008), a competência de desenvolvimento de oócitos pode ser determinada por marcadores, expressos pelas células foliculares que o circundam; entretanto, para estes autores, a relação entre a expressão de genes específicos durante o crescimento folicular e sua capacidade de determinar a qualidade do embrião ainda precisa ser melhor investigada.

A análise do perfil de expressão gênica das células da granulosa poderia refletir o potencial de fertilidade dos oócitos de uma forma não-invasiva. Além disso, informações sobre condições favoráveis associadas à produção de folículos de boa qualidade poderiam ser úteis na otimização de protocolos de estimulação ovariana (Hamel *et al.*, 2008). Os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar a expressão dos transcritos dos genes que codificam para as proteínas ácido hialurônico sintase 2 (HAS2; hyaluronan synthase 2), link protein 1 (HAPLN1; hyaluronan and proteoglycan link protein 1), conexina 43 (GJA1; gap junction protein, alpha 1, 43kDa) e β -actina (ACTB; actin, beta) em complexos *cumuli*-oócitos (CCOs) bovinos não maturados, e submetidos à MIV em meios com diferentes suplementações protéicas; e 2) avaliar as taxas de maturação nuclear dos oócitos submetidos às diferentes condições de MIV.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se produtos Sigma-Aldrich Chemical Co. Ltd (St. Louis, MO, USA) testados para cultivo de embriões para a preparação de todos os meios utilizados. Os produtos obtidos de outros fornecedores são indicados no texto.

Obtenção dos complexos *cumuli oophorus*-oócitos (CCOs)

Os ovários necessários para a obtenção dos complexos *cumuli*-oócitos (CCOs) foram coletados de fêmeas bovinas abatidas em matadouro-frigorífico sob inspeção estadual, localizado na região metropolitana de Porto Alegre.

Os ovários foram transportados à temperatura de 22 a 26°C em solução salina tamponada com fosfato (PBSm; Whittingham, 1971). No máximo cinco horas após o abate do último animal, os folículos que apresentavam diâmetro entre 2 e 8 mm (Lehmkuhl *et al.*, 2002), foram puncionados com uma agulha de 14G acoplada a uma seringa descartável contendo PBSm suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell, Campinas, Brasil). A seleção dos CCOs foi realizada acordo com as características morfológicas (Loos *et al.*, 1989) com o auxílio de um estereomicroscópio (EMZ-13TR, Meiji Techno Co. Ltd, Saitama, Japão) sob aumento de 15 a 50x. Os CCOs que apresentaram citoplasma regular e homogêneo, com várias camadas de células do *cumulus oophorus* distribuídas e compactadas em toda a superfície do oócito foram transferidos pra uma placa contendo o meio de manipulação M2 (Quinn *et al.*, 1982).

Maturação *in vitro* (MIV)

Os CCOs selecionados para MIV foram lavados três vezes no meio para maturação TCM 199 contendo L-glutamina e 25 mM de Hepes acrescido de 22 µg/mL de piruvato de sódio, 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin®, Vetrepharm, Belleville, ON, Canada), 0,1 IU/ml LH (Chorulon®, Intervet, São Paulo, Brasil) e a fonte protéica de acordo com o grupo experimental: 10 % de soro fetal bovino (SFB; Nutricell, Campinas, Brasil) ou 4mg/mL de albumina sérica bovina (BSA; fração V, Life Technologies™, Grand Island, NY, EUA). Os CCOs foram divididos em grupos de 8 ou 10 e transferidos para gotas de 100 µL, em placas de cultivo, cobertas por óleo mineral.

As placas contendo os CCOs foram submetidas à MIV em estufa de cultivo celular sob atmosfera de 5% CO₂, 100% de umidade relativa do ar e 39°C, onde permaneceram por 22 a

24 horas.

Avaliação da maturação nuclear

Após o período de MIV, CCOs foram incubados durante 5 minutos em M2 contendo hialuronidase 0,1% e os oócitos foram desnudados através da pipetagem das células do *cumulus*. Os oócitos desnudos foram transferidos para uma gota contendo M2 suplementado com 5 µg/mL Hoechst 33342 e incubados durante 3 minutos em câmara escura. Após incubação, os oócitos foram observados através de microscópio de fluorescência (IX51, Olympus Co., Tóquio, Japão), sob aumento de 400x.

Foram utilizados os seguintes critérios de classificação: vesícula germinativa (GV), quebra da vesícula germinativa (GVBD), placa metafásica (MI), presença de corpúsculo polar (MII), degenerados (DEG) ou não observados (NO). Foi considerado como retomada da meiose a presença de GVBD, MI ou MII. Entretanto, apenas oócitos com extrusão do corpúsculo polar foram considerados como tendo atingido maturação nuclear.

Extração do RNA mensageiro (mRNA)

A extração do mRNA das amostras contendo 8 CCOs foi realizada em duas etapas. Antes da extração de RNA total, foi adicionado a cada amostra 0,1 pg de mRNA de alfa-hemoglobina (HBA; Life Technologies™, Gaithersburg, MD, EUA) de coelho, como controle interno. Para a extração do RNA total das amostras foi utilizado o reagente TRIzol® (Life Technologies™, Grand Island, NY, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA total foram submetidas à captação específica do mRNA utilizando-se o produto comercial de separação magnética Dynabeads® mRNA™ DIRECT Micro Kit (DYNAL, Oslo, Noruega), conforme protocolo descrito por Oliveira *et al.* (2006).

Reação de transcrição reversa (RT)

Os mRNAs isolados dos 8 CCOs em cada amostra foram transcritos reversamente em cDNA, em solução contendo 4 µL de tampão 5X First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA); 2 µL de DTT 50 mM (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA); 1µL oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (0,5 µg/mL; Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA); 2 µL de solução com 2,5 mM de cada dNTP (Life Technologies™, Gaithersburg, MD, EUA); 20 U de RNaseOUT™ recombinant ribonuclease inhibitor (40 U/µL; Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA); e 100 U de enzima M-MLV Reverse Transcriptase

(200 U/ μ L; Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), em um volume final de 20 μ L, em tubos cônicos de polipropileno de 0,5 mL. A solução foi coberta com óleo mineral para prevenir evaporação e a reação de RT foi realizada em termociclador (PTC-100 MJ Research, Watertown, MA, USA) com incubação a 37°C por 60 minutos, seguida de aquecimento a 95°C por 10 minutos. Ao final da reação de transcrição reversa, as amostras de cDNA dos CCOs foram diluídas para um volume final de 80 μ L, com água ultra-pura livre de RNase, de maneira que cada amostra apresentasse o correspondente a 0,1 CCO em cada 1 μ L do cDNA (0,1 CCO/ μ L; equivalente CCO).

Amostras contendo mRNA de HBA de coelho adicionadas às amostras de CCOs (CCOs + alfa-hemoglobina), amostras apenas com mRNA de HBA (alfa-hemoglobina pura) e amostras sem mRNA (controle negativo) foram submetidas à RT.

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A PCR foi realizada em tubos de 0,5 mL contendo: 2 μ L de tampão 10X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl; Invitrogen™, São Paulo, Brasil); 0,6 μ L de MgCl₂ (50 mM; Invitrogen™, São Paulo, Brasil); 1 μ L da solução contendo 10 mM de dNTP (Life Technologies™, Gaithersburg, MD, EUA); 1 U de enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen™, São Paulo, Brasil); 10 pmoles (exceto para *link protein 1* que utilizou 20 pmoles) de cada oligonucleotídeo específico (Life Technologies™, Rockville, MD, EUA); 0,1 a 1,2 equivalente CCO (1 μ L a 12 μ L) de cDNA das amostras, de acordo com o mRNA pesquisado, ou 1 μ L (1pg/ μ L) de cDNA de HBA de coelho; e água ultra-pura livre de DNase, em quantidade suficiente para completar um volume final de 20 μ L.

A mistura foi coberta com óleo mineral, e os tubos foram submetidos a PCR em termociclador (PTC-100, MJ Research, Watertown, MA, USA), com desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 33 ciclos de amplificação de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 90 segundos (exceto para *link protein 1* que utilizou 35 ciclos), e um ciclo de extensão final de 72°C por 3 minutos.

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações foram produzidos a partir da região codificada para cada gene de interesse. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados e os tamanhos dos fragmentos amplificados são apresentados na Tabela 1.

Os controles negativos foram realizados excluindo cDNA dos tubo de reação. A PCR para os genes de interesse e *HBA* (controle interno) foram realizadas em tubos individuais. Foi utilizado 0,2 equivalente CCO para *HAS2*; 1,2 equivalente CCO para *link protein 1*; 0,1

equivalente CCO para *conexina 43*; 0,3 equivalente CCO para β -actina; e 1 μ L do volume de reação (20 μ L) para *HBA* de coelho.

Tabela 1 - Sequência de bases dos oligonucleotídeos utilizados na técnica de RT-PCR

Genes	Acesso no GenBank	Sequência dos oligonucleotídeos	Produto amplificado
<i>HAS2</i>	NM_174079	5' GCTTGACCCAGCATCATCTGTGG 3' CTGGTTTAACCATCTGAGATATT	403pb
<i>HAPLN1</i>	NM_174288	5' GGTCTGTGCAATATCCCATC 3' CCCACTTTAGCAATCTGAGC	232pb
<i>GJAI</i>	NM_174068	5' GGGAAAGAGCGATCCTTACCACACTACCAC 3' CCACCTCCAATGAAACAAAATGAACACCTA	516pb
<i>ACTB</i>	NM_173979	5' GAG AAG CTC TGC TAC GTG GC 3' CCG GAC AGC ACC GTG TTG GC	263pb
<i>HBA</i>	NM_001082389	5' GCAGCCACGGTGGCGAGTAT 3' GTGGGACAGGAGCTTGAAAT	257pb

ACTB (actin, beta): β -actina; *GJAI* (gap junction protein, alpha 1, 43kDa): *conexina 43*; *HAPLN1* (hyaluronan and proteoglycan link protein 1): *link protein 1*; *HAS2* (hyaluronan synthase): *ácido hialurônico sintase 2*; *HBA* (alpha-hemoglobin): *alfa-hemoglobina*.

Análise da expressão gênica após RT-PCR semi-quantitativo

Os produtos da RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (Life Technologies™, Grand Island, NY, EUA) em tampão TBE 0,5X (45 mM Trisborato; 1 mM EDTA, pH 8,3) contendo 0,5 μ g de brometo de etídio por mL de gel. Os géis foram fotografados com câmera digital (DC40 camera, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA), e a intensidade de cada banda obtida foi quantificada por densitometria e analisada com a utilização do programa Scion Image (Scion Co., Frederick, MD, EUA). A abundância relativa de mRNA dos genes de interesse foi calculada através da divisão da intensidade da banda de cada amostra de CCO pela intensidade da banda de *HBA* de coelho da amostra correspondente.

Delineamento experimental

Comparou-se a abundância relativa dos transcritos de *HAS2*, *link protein 1*, *conexina 43* e β -actina em CCOs bovinos não submetidos a MIV (grupo 1 = G1) e CCOs submetidos a

MIV com suplementação protéica de 10% de SFB (grupo 2 = G2) ou 4 mg/mL de BSA (grupo 3 = G3) e a taxa de maturação nuclear de CCOs submetidos a MIV.

Os CCOs selecionados foram homogeneamente distribuídos nos três grupos experimentais. No G1, oito CCOs foram coletados em 80 μ L de M2, sem serem submetidos a MIV e armazenados em nitrogênio líquido em tubo cônico de 1,0 mL. No G2, oito CCOs foram submetidos às condições de MIV em meio de maturação acrescido de 10 % de SFB. No G3, oito CCOs foram submetidos às condições de MIV em meio de maturação acrescido de 4mg/mL de BSA. Os CCOs dos grupos 2 e 3 foram coletados em 80 μ L do respectivo meio de maturação, transferidos para tubos cônicos de 1,0 mL e armazenados em nitrogênio líquido. A abundância relativa dos transcritos dos genes avaliados foi calculada a partir de oito repetições.

Nos CCOs selecionados para avaliação do estágio de maturação nuclear, a MIV foi realizada em gotas do meio de maturação contendo 10 CCOs, nas mesmas condições descritas para os grupos 2 (SFB) e 3 (BSA). A avaliação de maturação nuclear foi calculada a partir de dez repetições.

Análise estatística

A abundância relativa dos transcritos de *HAS2*, *link protein 1*, *conexina 43* e *β -actina* foi analisada usando o programa SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA). Após serem testados para a homogeneidade das variâncias (teste de Levene), os dados de abundância relativa foram comparados pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas (teste de Tukey). Os resultados da avaliação de maturação nuclear foram analisados com o auxílio do teste do Qui-quadrado complementado, quando necessário, pelo teste exato de Fisher. Diferenças de $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

RESULTADOS

Durante os experimentos, a manipulação durante a coleta para análise de expressão gênica e para avaliação da maturação nuclear permitiu observar maior expansão e mucificação da matriz extracelular das células do *cumulus* nos CCOs submetidos a MIV em meio suplementado com SFB comparado ao meio suplementado com BSA (dados não apresentados).

Os transcritos para *HAS2*, *link protein 1*, *conexina 43* e *β -actina* foram detectados em

todos os géis submetidos a eletroforese realizados para avaliar o perfil de expressão gênica (Figura 1).

A análise dos géis, através da medição da intensidade de cada banda dos fragmentos de cDNA, permitiu estabelecer um valor de abundância relativa para cada amostra. A média e o desvio padrão dos valores de abundância relativa dos transcritos obtidos a partir dos 8 CCOs bovinos em cada um dos três grupos experimentais (oito repetições) são apresentados na Figura 2. Foi observada diferença estatística significativa na abundância relativa dos transcritos de *HAS2* ($p=0,000$), *link protein 1* ($p=0,001$), *conexina 43* ($p=0,007$) e β -actina ($p=0,011$) entre os três grupos experimentais (Figura 2). A expressão de todos os transcritos foi maior no grupo de CCOs submetidos à MIV na presença de SFB (G2) em comparação a CCOs não submetidos à MIV (G1) ou maturados na presença de BSA (G3).

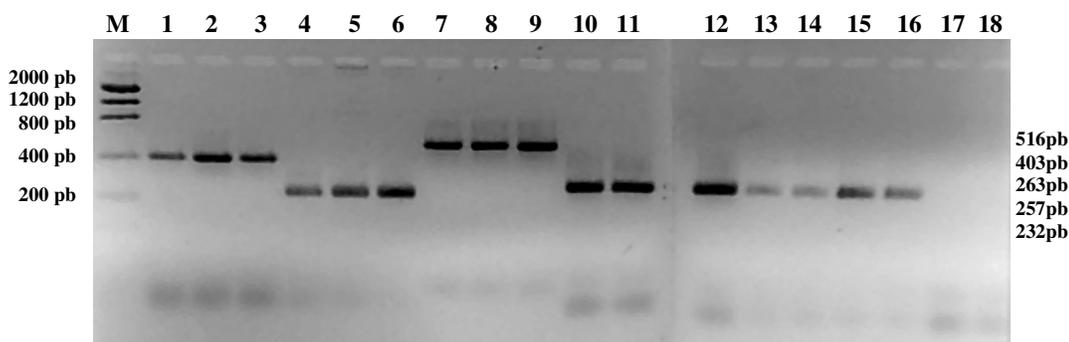


Figura 1 - Detecção dos transcritos dos genes em amostras de CCOs bovinos. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, mostrando produtos de amplificação de *HAS2* (403pb; amostras 1 a 3), *link protein 1* (232pb; amostras 4 a 6), *conexina 43* (516pb; amostras 7 a 9) e β -actina (263pb; amostras 10 a 12). Os produtos de amplificação de alfa-hemoglobina de coelho (257 bp) são observados nas amostras 13 a 16. Amostra M: 4 μ L de padrão de peso molecular low DNA mass™ ladder (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA); Amostras 1, 4, 7, 10 e 13: cDNA dos CCOs não submetidos a MIV; Amostras 2, 5, 8, 11 e 14: cDNA dos CCOs submetidos a MIV em presença de SFB; Amostras 3, 6, 9, 12 e 15: cDNA dos CCOs submetidos a MIV em presença de BSA; Amostra 16: controle com cDNA de alfa-hemoglobina de coelho; Amostras 17 e 18: controles sem cDNA.

As avaliações de maturação nuclear foram realizadas em 98 oócitos submetidos à MIV em meio suplementado com SFB (G2) e em 94 oócitos submetidos à MIV em meio suplementado com BSA (G3). Os dados obtidos nas avaliações de maturação nuclear dos oócitos são mostrados na Tabela 2. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) na morfologia nuclear dos oócitos submetidos a MIV na presença de SFB ou BSA, tanto para a taxa de retomada de meiose (respectivamente, 86,7% ou 91,5%) quanto para a taxa de maturação nuclear (respectivamente, 56,1% ou 58,5%).

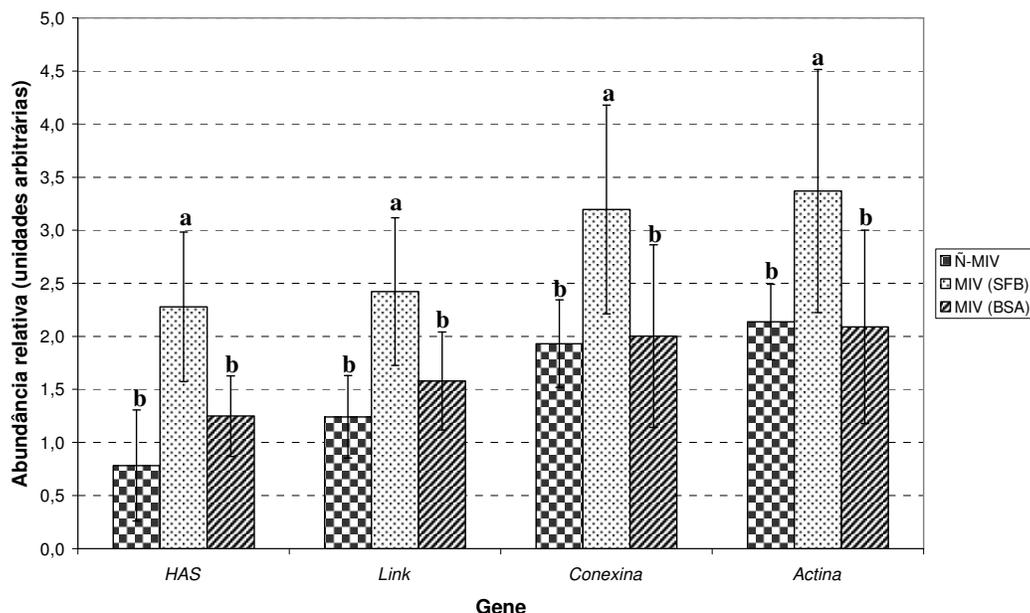


Figura 2 - Abundância relativa do mRNA (média \pm desvio padrão) de *HAS2*, *link protein*, *conexina 43* e β -*actina* nos diferentes grupos de CCOs bovinos. **Ñ-MIV** [Grupo 1: CCOs não submetidos à MIV]; **MIV (SFB)** [Grupo 2: CCOs submetidos à MIV na presença de SFB]; **MIV (BSA)** [Grupo 3: CCOs submetidos a MIV em presença de BSA]. **a,b**: letras diferentes em cada gene indicam diferença estatística entre os grupos pela ANOVA [*HAS2* ($p=0,000$), *link protein 1* ($p=0,001$), *conexina 43* ($p=0,007$) e β -*actina* ($p=0,011$)].

Tabela 2 - Avaliação da retomada da meiose (GVBD, MI e MII) e maturação nuclear (apenas MII) em oócitos bovinos maturados *in vitro* em presença de SFB ou BSA

Fonte protéica	Oócitos n	GV n (%)	GVBD n (%)	MI n (%)	MIII n (%)	DEG n (%)	NO n (%)
SFB	98	1 (1,0)	22 (22,4)	8 (8,2)	55 (56,1)	4 (4,1)	8 (8,2)
BSA	94	3 (3,2)	20 (21,3)	11 (11,7)	55 (58,5)	1 (1,1)	4 (4,3)

GV (vesícula germinativa); GVBD (quebra da vesícula germinativa); MI (placa metafásica); MII (presença de corpúsculo polar); DEG (degenerado); NO (não observado); $p > 0,05$.

DISCUSSÃO

Os eventos que ocorrem durante a MIV de oócitos bovinos influenciam sua capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Porém, não existe um consenso

sobre a influência da composição do meio e das condições de maturação sobre o desenvolvimento e expressão gênica dos embriões (Holm *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2000; Ali e Sirard, 2002; Knijn *et al.*, 2002). A avaliação da capacidade de desenvolvimento (taxa de clivagem e de formação de blastocistos), combinada com medidas qualitativas como a abundância relativa de mRNA, pode gerar mais informações sobre as consequências da MIV sobre a viabilidade embrionária.

Os trabalhos que avaliam a expressão de genes relacionados à MIV, geralmente abordam a expressão de transcritos do oócito, restringindo-se a discutir a participação das células do *cumulus* no desenvolvimento do gameta e os processos envolvidos na interação entre as duas estruturas (Yokoo *et al.*, 2002; Irving-Rodgers e Rodgers, 2005; Sagirkaya *et al.*, 2007; Vireque *et al.*, 2009). As células do *cumulus* são importantes para o processo de maturação oocitária; além disso, *in vivo*, o desenvolvimento folicular, maturação e ovulação só ocorrem de forma bem sucedida se há uma comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito (Tanghe *et al.*, 2002; Van Soom *et al.*, 2002). A avaliação da expressão de genes de CCOs pode ajudar a compreender melhor o que acontece durante a MIV (Sagirkaya *et al.*, 2007).

No presente trabalho, observou-se diferença na abundância relativa do mRNA dos genes *HAS2*, *link protein 1*, *conexina 43* e β -*actina*, quando comparados CCOs antes e após a MIV, sugerindo a importância destes na maturação. O ácido hialurônico (HA), juntamente com outras proteínas, é secretado em grandes quantidades durante a maturação do oócito produzindo a matriz extracelular protéica relacionada com a expansão e mucificação do CCO (Salustri *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2002). A importância do HA já foi demonstrada anteriormente, quando sua adição aos meios de maturação e cultivo mostrou, respectivamente, aumento do potencial de desenvolvimento de oócitos (Marquant-le Guiene *et al.*, 2002) e embriões (Furnus *et al.*, 1998; Stojkovic *et al.*, 1999) bovinos. A proteína HAS2 está envolvida com a síntese de HA pelas células do *cumulus*, tendo importância no processo de expansão da matriz (Irving-Rodgers e Rodgers, 2005) e sendo relacionada ao desenvolvimento da competência do oócito (Dunning *et al.*, 2007). A organização protéica da matriz extracelular, formada pela agregação de HA e proteoglicanas é dependente da link protein 1 (HAPLN1), proteína produzida pelas células do *cumulus* (Kobayashi *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999) e envolvida também na expansão do CCO (Spicer *et al.*, 2003; Wrenzycki *et al.*, 2007). A proteína e o mRNA do gene *conexina 43* está presente nos CCOs bovinos durante a MIV (Vozzi *et al.*, 2001; Calder *et al.*, 2003). A conexina 43 faz parte de uma família de proteínas que formam junções comunicantes importantes para comunicação célula-

célula e respostas coordenadas. A função das junções comunicantes para o oócito bovino durante a MIV tem sido relacionada tanto com as taxas de maturação quanto com a expansão do *cumulus*; o bloqueio da sinalização através das junções comunicantes ou a redução da proteína conexina 43 leva à diminuição das taxas de maturação (Vozzi *et al.*, 2001) enquanto a expansão das células do *cumulus* é acompanhada de modificações nos canais transmembrana formados pela conexina 43 (Dell'Aquila *et al.*, 2004).

Durante a MIV, e posterior desenvolvimento embrionário, ocorrem eventos importantes de reprogramação nuclear e citoplasmática, para os quais são necessários vários componentes químicos, que devem estar presentes no meio de cultivo (Chanson *et al.*, 2001; Sagirkaya *et al.*, 2007). O acúmulo de transcritos, durante o período de crescimento do oócito, é fundamental para o desenvolvimento inicial até a ativação do genoma embrionário. Entretanto, durante a MIV, a transcrição de genes pode ser afetada por uma série de suplementos aos quais os CCOs são expostos. Neste trabalho, a expressão de todos os transcritos foi maior nos grupos de CCOs submetidos à MIV com SFB, em comparação a CCOs antes da MIV ou maturados em presença de BSA. Além disso, no grupo submetido a MIV em presença de SFB observou-se uma maior expansão e mucificação da matriz extracelular (dados não mostrados). Estes resultados podem estar relacionados a componentes presentes no SFB, que atuam como fatores de transcrição destes genes que atuam tanto na expansão como na mucificação da matriz extracelular (Dell'Aquila *et al.*, 2004; Spicer *et al.*, 2003; Irving-Rodgers e Rodgers, 2005; Wrenzycki *et al.*, 2007).

Os protocolos de produção *in vitro* de embriões frequentemente incluem a utilização de suplementações como o soro, ou o co-cultivo com vários tipos de células somáticas, uma vez que o metabolismo e requerimentos embrionários ainda não são totalmente conhecidos. Preparações contendo soro e BSA estão entre as suplementações protéicas mais utilizadas em meios de MIV. Entretanto, a presença de soro, cuja composição química é indefinida, possui como desvantagens as variações entre partidas, e o risco de contaminações, podendo levar a problemas durante o desenvolvimento fetal (Chanson *et al.*, 2001; Sagirkaya *et al.*, 2007).

No presente trabalho, embora tenham sido observadas diferenças na expressão dos genes investigados, a avaliação da morfologia nuclear dos oócitos após a MIV não mostrou diferenças significativas entre os grupos de CCOs submetidos maturação com SFB ou BSA, tanto para retomada da meiose (GVBD, MI e MII) quanto para maturação nuclear (MII). Reconhecidamente, a MIV é uma tecnologia da reprodução que possibilita a produção de oócitos maduros *ex-vivo*, sem a necessidade de tratamentos ovarianos com gonadotrofinas, envolvendo a remoção de CCOs de folículos antrais, e seu cultivo sob condições padronizadas

por 24 a 48 horas, até que os oócitos atinjam a metáfase II (Gilchrist e Thompson, 2007). Entretanto, mesmo ocorrendo a maturação nuclear, apenas uma pequena parte destes oócitos maturados possui pleno potencial de desenvolvimento (Schroeder e Eppig, 1984). A maturação citoplasmática também deverá ser concluída, ao final da qual haverá o armazenamento de mRNAs, proteínas e fatores de transcrição, que atuam durante os processos de maturação, fecundação e início da embriogênese (Ferreira *et al.*, 2009). Embora grande parte dos oócitos bovinos sofra retomada da meiose espontaneamente, pouco se conhece sobre os requerimentos para uma adequada maturação citoplasmática (Calder *et al.*, 2003).

Confrontando os resultados de maturação nuclear com os da avaliação da expressão gênica e de expansão e mucificação da matriz extracelular (dados não mostrados) do presente trabalho, nota-se que o grupo maturado em SFB apresentou taxas de maturação nuclear semelhantes ao grupo submetido à MIV em BSA, apesar dos distintos aspectos da mucificação e da abundância relativa dos mRNAs dos genes encontrados nos dois grupos. Embora seja possível associar a expressão diferenciada dos transcritos à presença do SFB no meio de MIV (Dell'Aquila *et al.*, 2004; Spicer *et al.*, 2003), aparentemente a maturação nuclear não foi influenciada pelas diferentes suplementações protéicas do meio de MIV. Porém, outros aspectos da maturação oocitária, como aqueles relacionados à maturação citoplasmática, poderiam ser influenciados pelas diferentes condições de MIV.

Embora tenham sido observadas diferenças na expressão dos transcritos analisados, não foi realizada análise da expressão gênica em embriões produzidos a partir do sistema de MIV utilizado, o que, talvez, pudesse trazer esclarecimentos e novos questionamentos em relação à maturação. Alguns autores consideram que o aumento da abundância relativa de transcritos em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* está relacionado com a suplementação do meio com BSA ou soro durante a MIV (Sagirkaya *et al.*, 2007; Vireque *et al.*, 2009), enquanto outros mostram que a suplementação protéica com BSA ou soro no meio de maturação ou cultivo não altera o perfil de abundância do mRNA dos embriões (Lazzari *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006). Porém, em experimentos nos quais foram avaliadas as taxas de blastocistos, foram encontrados melhores resultados com a utilização de SFB, em comparação à adição de BSA ao meio de maturação (Chanson *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2006).

Além disso, diferentes genes expostos às mesmas condições experimentais podem ser induzidos de forma diferente. Trabalhos com embriões bovinos (Bilodeau-Goeseels e Panich, 2002; Oliveira *et al.*, 2006) não mostram diferença significativa para a abundância relativa de mRNA entre os tratamentos, considerando como causa a alta variabilidade entre as amostras

de CCOs. Uma possibilidade para a variação no perfil de expressão gênica entre as amostras pode estar relacionada como sistema de MIV utilizado; em bovinos, a suplementação do meio com soro tem sido relacionada à variabilidade de resposta *in vitro* de embriões (Knijn *et al.*, 2002), de CCOs (Calder *et al.*, 2003) e de células do *cumulus* (Arend *et al.*, 2010). No presente trabalho, a análise dos dados mostrou homogeneidade entre as amostras utilizadas nas várias repetições experimentais.

Com base nos resultados observados pode-se concluir que a exposição de CCOs bovinos à diferentes condições de MIV influenciou a expressão dos transcritos de *HAS2*, *link protein 1*, *conexina 43* e *β -actina*, mostrando aumento da expressão destes transcritos quando a MIV ocorreu em presença de SFB. Entretanto, a MIV em presença de SFB ou BSA não mostrou diferença nas taxas de retomada da meiose e de maturação nuclear.

REFERÊNCIAS

- Ali, A. & Sirard, M-A. (2002). Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* **66**: 901-905.
- Arend, F.L., Vieira, A.D., Cesaro, M.P., Mezzalira, A., Oliveira, A.T.D. & Lopes, R. F.F. (2010). Expressão gênica das células do *cumulus oophorus* de bovinos após a vitrificação. *Acta Scientiae Veterinariae* **38**, 37-46.
- Bilodeau-Goeseels, S. & Panich, P. (2002). Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **71**, 143-155.
- Buccione, R., Schroeder, A. C. & Eppig, J. J. (1990). Interactions between somatic cells and germ cells during mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* **43**, 543-547.
- Calder, M. D., Caveney, A.N., Smith, L.C. & Watson, A.J. (2003). Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 14.
- Chanson, A., Nocera, D., Senn, A., De Grandi, P. & Germond, M. (2001). Development of a well-defined medium for the in vitro maturation of immature bovine cumulus-oocyte complexes. *J. Assist. Reprod. Genet.* **18**, 97-105.
- Dell'Aquila, M.E., Caillaud, M., Maritati, F., Martoriati, A., Gerard, N., Aiudi, G., Minoia, P. & Goudet, G. (2004). Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2**, 44.

- Dunning, K.R., Lane, M., Brown, H.M., Yeo, C., Robker, R. L. & Russel, D. L. (2007). Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. *Hum. Reprod.* **22**, 2842–2850.
- Duranthon, V. & Renard, J.P. (2001). The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* **55**, 1277-1289.
- Ferreira, E.M., Vireque, A.A., Adona, P.R., Meirelles, F.V. Ferriani, R.A. & Navarro, P.A. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71**, 836-848.
- Furnus, C.C., De Matos, D.G. & Martinez, A.G. (1998). Effect of hyaluronic acid on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* **49**,1489-1499.
- Gilchrist, R.B. & Thompson, J.G. (2007). Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* **67**, 6-15.
- Gilchrist, R.B., Lane, M. & Thompson, J.G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update* **14**, 159-177.
- Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Gravel, C., Leveille, M.C., Leader, A. & Sirard, M.A. (2008). Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum. Reprod.* **23**, 1118-1127.
- Hendriksen, P.J., Vos, P.L., Steenweg, W.N., Bevers, M.M. & Dieleman, S.J. (2000). Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* **53**, 11-20.
- Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T. & Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOF a medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. *Theriogenology* **52**, 683-700.
- Irving-Rodgers, H.F. & Rodgers, R.J. (2005). Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. *Cell Tissue Res.* **322**, 89-98.
- Kimura, N., Konno, Y., Miyoshi, K., Matsumoto, H. & Sato, E. (2002). Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* **66**, 707-717.
- Knijn, H.M., Wrenzycki, C., Hendriksen, P.J., Vos, P.L., Herrmann, D., Van Der Weijden, C.G., Niemann, H. & Dieleman, S.J. (2002). Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction* **124**, 365-375.
- Kobayashi, H., Sun, G.W., Hirashima, Y. & Terao, T. (1999). Identification of link protein during follicle development and cumulus cells cultures in rats. *Endocrinology* **140**, 3835-3842.

- Lazzari, G., Wrenzycky, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruip, T., Niemann, H. & Galli, C. (2002). Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol. Reprod.* **67**, 767-775.
- Lehmkuhl, R.C.; Mezzalira, A.; Vieira, A.D.; Barbieri, D.P.; Machado, M.F.; Rubin, M.I.B. & Silva, C.A.M. (2002). Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. *Ars Veterinaria* **18**, 273-279.
- Loos, F., Van Vliet, C., Van Maurik, P. & Kruip, T.A. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* **24**, 197-204.
- Marquant-le Guiene, B., Guyader-Joly, C., Ponchon, S., Delalleau, N. & Humblot, P. (2002). Effect of hyaluronic acid in a serum free maturation medium on bovine embryo development (abstract). *Theriogenology* **51**, 386.
- Oliveira, A.T.D., Lopes, R.F.F. & Rodrigues, J.L. (2006). Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro with different serum concentrations. *Reprod. Domest. Anim.* **41**, 129-136.
- Quinn, P., Barros, C. & Whittingham, D.G. (1982). Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **66**, 161-168.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P. & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 234-248.
- Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N.L., Parrish, J.J. & Memili, E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **101**, 225-240.
- Salustri, A., Camaioni, A., Di Giacomo, M., Fulop, C. & Hascall, V.C. (1999). Hyaluronan and proteoglycan in ovarian follicles. *Hum. Reprod. Update* **5**, 293-301.
- Schroeder, A. C. & Eppig, J. J. (1984). The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Dev. Biol.* **102**, 493-497.
- Spicer, A.P., Joo, A. & Bowling, Jr., R.A. (2003). A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links. *J. Biol. Chem.* **278**, 21083-21091.
- Stojkovic, M., Thompson, J.G. & Tervit, H.R. (1999). Effects of hyaluronic acid supplementation on in vitro development of bovine embryos in a two-step culture system (abstract). *Theriogenology* **51**, 254.
- Sun, G.W., Kobayashi, H. & Terao, T. (1999). Expression of link protein during mouse follicular development. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1433-1442.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M. & de Kruif, A. (2002). Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 414-424.

Van Soom, A., Tanghe, S., De Pauw, I., Maes, D. & de Kruif, A. (2002). Function of cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reproduction of Domestic Animals* **37**, 144-151.

Vireque, A.A., Camargo, L.S.A., Serapia, R.V., Rosa e Silva, A.A.M, Watanabe, Y.F., Ferreira, E.M., Navarro, P.A.A.S., Martins, W.P. & Ferriani, R.A. (2009). Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. *Theriogenology* **71**, 620-627.

Vozzi, C., Formenton, A., Chanson, A., Senn, A., Sahli, R., Shaw, P., Nicod, P., Germond, M. & Haefliger, J.A. (2001). Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction* **122**, 619-628.

Watson, A.J., Sousa, P.D., Caveney, A., Bancroft, L.C., Natale, D., Urquhart, J. & Westhusin, M.E. (2000). Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcripts levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol. Reprod.* **62**, 355-364.

Whittingham, D.G. (1971). Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **14**, 7-21.

Wrenzycki, C., Herrmann, D. & Niemann, H. (2007). Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* **68**, S77-S83.

Yokoo, M., Tientha, P., Kimura, N., Niwa, K., Sato, E. & Rodrigues-Martinez, H. (2002). Localization of the hyaluronan receptor CD44 in porcine cumulus cells during in vivo and in vitro maturation. *Zygote* **10**, 317-326.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da expressão dos genes no oócito e na células do *cumulus*, associando os resultados às taxas de MIV, pode ser de grande valia para aperfeiçoar os sistemas de produção *in vitro* de embriões (WRENZYCKI; HERRMANN; NIEMANN, 2007; SAGIRKAYA *et al.*, 2007).

A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir a avaliação da eficiência da MIV com experimentos que verifiquem se existe relação entre a expressão dos genes analisados e a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos (taxa de blastocistos), testando meios com diferentes suplementações protéicas, como já foi mostrado anteriormente por outros autores (CHANSON *et al.*, 2001; LAZZARI *et al.*, 2002; OLIVEIRA; LOPES; RODRIGUES, 2006; SAGIRKAYA *et al.*, 2007; VIREQUE *et al.*, 2009).

A maturação oocitária também poderia ser avaliada pela determinação das taxas de maturação nuclear em associação com técnicas que permitam a verificação de outros aspectos da maturação citoplasmática a partir de oócitos bovinos selecionados morfológicamente, como a técnica de coloração com azul cresil brilhante (BCB, do inglês, *brilliant cresyl blue*), que se baseia na atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Embora a seleção dos oócitos com BCB não tenha mostrado diferença entre os grupos para taxa de clivagem ou a formação e eclosão de blastocistos (OPIELA *et al.*, 2008; OPIELA *et al.*, 2010; MOTA *et al.*, 2010), a associação desta técnica com a análise da expressão de genes relacionados a MIV talvez possa melhorar a eficiência de etapas posteriores da produção *in vitro*.

Outra possibilidade seria investigar a expressão de genes associados com o desenvolvimento folicular e maturação oocitária, na busca de possíveis marcadores relacionados à ocorrência de maturação nuclear e citoplasmática. A expressão do mRNA da enzima anti-apoptótica survivina foi relacionada à qualidade dos CCOs, a sua competência de desenvolvimento e a qualidade dos blastocistos bovinos produzidos *in vitro* (JEON *et al.*, 2008). Em humanos, a competência dos oócitos pode ser determinada pelos marcadores CYP19A1 (*cytochrome P450 aromatase*), cdc42 (*cell division cycle 42*), HSD3b1 (*3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase*), SERPINE2 (*serine or cysteine proteinase inhibitor clade E member 2*) e FDX1 (*ferredoxin 1*), que são expressos nas células foliculares (HAMEL *et al.*, 2008).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A.; SIRARD, M-A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p. 901-905, 2002.

AREND, F. L. *et al.* Expressão gênica das células do *cumulus oophorus* de bovinos após a vitrificação. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n.1, p. 37-46, 2010.

BÉZARD, J. Aspects of in vivo and in vitro fertilization of the equine oocyte. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, Porto Alegre, v. 25, n. 1, p. 36-61, 1997 (Supl.).

BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 71, n. 3-4, p. 143-155, 2002.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A. C.; EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells during mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 43, p. 543-547, 1990.

CALDER, M. D. *et al.* Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 1, n. 11, p. 1-14, 2003.

CAMAIONI, A. *et al.* Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 235, n. 2, p. 190-198, jan., 1996.

CHANSON, A. *et al.* Development of a well-defined medium for the in vitro maturation of immature bovine cumulus-oocyte complexes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 18, n. 2, p. 97-105, 2001.

CHEN, L.; RUSSELL, P. T.; LARSEN, W. J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 34, p. 87-93, 1993.

DE LA FUENTE, R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. **Developmental Biology**, San Diego, v. 292, p. 1-12, 2006.

DELL'AQUILA M.E. *et al.* Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 2, p.44, 2004.

DIELEMAN, S. J. *et al.* Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, Gainesville, v. 57, p. 5-20, 2002.

DRAIN COURT, M.A.; CAHILL, L.P. Preovulatory follicular events in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 71, p. 205-211, 1984.

DUNNING K.R. *et al.* Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 2842–2850, 2007.

DURANTHON, V.; RENARD J.P. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 1277–1289, 2001.

FERREIRA, E. M. *et al.* Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, Gainesville, v. 71, p. 836-848, 2009.

FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; MARTINEZ, A.G. Effect of hyaluronic acid on development of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, n. 8, p. 1489-1499, 1998.

GILCHRIST, R.B. *et al.* Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 119, p. 3811-3821, 2006.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 6–15, 2007.

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

GOSDEN, R.; KRAPEZ, J.; BRIGGS, D. Growth and development of the mammalian oocyte. **Bioessays**, Cambridge, v. 19, p. 875-882, 1997.

HAMEL, M. *et al.* Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 23, p. 1118–1127, 2008.

HAWK, H.W.; WALL, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes: I: selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 1571-1583, 1994.

HENDRIKSEN, P.J. *et al.* Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, p. 11-20, 2000.

HOLM, P. *et al.* High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOF a medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, Stoneham, v.52, p. 683-700, 1999.

HYTTEL, P. *et al.* Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, p. 23-32, 1997.

IRVING-RODGERS, H.F.; RODGERS, R.J. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 322, n. 1, p.89-98, 2005.

JEON, K. *et al.* Survivin protein expression in bovine follicular oocytes and their in vitro developmental competence. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 108, n. 3-4, p. 319-333, 2008.

KIMURA, N. *et al.* Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 707-717, 2002.

KNIJN, H.M. *et al.* Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. **Reproduction**, Cambridge, v.124, p. 365-375, 2002.

KOBAYASHI, H. *et al.* Identification of link protein during follicle development and cumulus cells cultures in rats. **Endocrinology**, Baltimore, Md., US., v. 140, p. 3835-3842, 1999.

KONISHI, M. *et al.* Presence of granulosa cells improved in vitro development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, p. 573-581, 1996.

LAZZARI, G. *et al.* Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 3, p. 767-775, 2002.

LEHMKUHL, R. C. *et al.* Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v.18, n.3, p.273-279, 2002.

LI, R. *et al.* Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, p. 839-845, 2000.

LOOS, F. *et al.* Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, New York, v. 24, p. 197-204, 1989.

MARQUANT-LE GUIENE, B. *et al.* Effect of hyaluronic acid in a serum free maturation medium on bovine embryo development. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n. 1, p. 386, 2002.

MATZUK, M. M. *et al.* Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, Washington, v. 296, n. 5576, p. 2178-2180, 2002.

MEHLLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, Cambridge, v. 130, p. 791-799, 2005.

- MOTA, G.B. *et al.* Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. **Zygote**, Cambridge, v. 18, n. 3, p. 209-216, 2010.
- OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro with different serum concentrations. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, n. 2, p. 129-136, 2006.
- OPIELA, J., *et al.* Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, n. 5, p. 546-555, 2008.
- OPIELA, J., *et al.* Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 2-4, p. 188-193, 2010.
- PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 45, p. 736-742, 1991.
- QUINN, P.; BARROS, C.; WHITTINGHAM, D.G. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 66, p. 161-168, 1982.
- RIZOS, D. *et al.* Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 61, p. 234-248, 2002.
- SAGIRKAYA, H. *et al.* Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 101, p. 225-240, 2007.
- SALUSTRI, A. *et al.* Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor- β . **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Md., US., v. 265, n. 32, p. 19517-19523. nov., 1990.
- SALUSTRI A. *et al.* Hyaluronan and proteoglycan in ovarian follicles. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 293-301, 1999.
- SCHROEDER, A. C.; EPPIG, J. J. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. **Developmental Biology**, San Diego, v. 102, p. 493-497, 1984.
- SIMON, A.M.; GOODENOUGH, D.A. Diverse functions of vertebrate gap junctions. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 8, p. 477-483, 1998.
- SIRARD, M. A.; BILODEAU, S. Effects of granulosa cell co-culture on in-vitro meiotic resumption of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 89, p. 459-465, 1990.

SPICER, A.P.; JOO, A.; BOWLING Jr., R.A. A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 23, p. 21083-21091, 2003.

STAIGMILLER, R.B.; ENGLAND, B.G. Folliculogenesis in the bovine. **Theriogenology**, Los Altos, v.17, n. 1, p. 43-52, 1982.

STOJKOVIC, M.; THOMPSON, J.G.; TERVIT, H.R. Effects of hyaluronic acid supplementation on in vitro development of bovine embryos in a two-step culture system. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n. 1, p. 254, 1999.

SUN, G. W.; KOBAYASHI, H.; TERAU, T. Expression of link protein during mouse follicular development. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, Md., US., v. 47, n. 11, p. 1433-1442, 1999.

SUTOVSKY, P. *et al.* Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during the in vitro culture of bovine cumulus oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 49, n. 6, p. 1277-1287, 1993.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J.G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 9, p. 35-48, 2003.

SZÖLLÖSI, D. Oocyte maturation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. (Eds). **Reproduction in mammals and man**. Paris, Ellipses, 1993. cap. 16, p. 307-325.

TANGHE, S. *et al.* Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 61, p. 414-424, 2002.

TESTART, J. Criteria for evaluating the quality of oocytes and their aptitude for IVF. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, v. 43, n.1, p. 17-21, 1985.

TIRONE, E. *et al.* 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). **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, p. 4787-4794, feb. 1997.

VAN SOOM, A. *et al.* Function of cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin, v. 37, p. 144-151, 2002.

VIREQUE, A.A. *et al.* Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, n. 4, p. 620-627, 2009.

VOZZI, C. *et al.* Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, n. 4, p. 619-628, 2001.

WATSON, A.J. *et al.* Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcripts levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.62, p. 355-364, 2000.

WHITTINGHAM, D.G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 14, p. 7-21, 1971 (Supl.).

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, p. S77-S83, 2007 (Supl. 1).

XU, K.P. *et al.* Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 81., n. 2, p. 501-504, 1987.

YANG, X. *et al.* Control of oocyte maturation in cows - biological factors. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 471-482, 1998.

YOKOO, M. *et al.* Identification of hyaluronic acid-binding proteins and their expression in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, p. 1165-1171, 2002.

ZHUO, L.; KIMATA, K. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. **Cell Structure and Function**, Okayama, JP., v. 26, p. 189-196, 2001.

CURRICULUM VITAE

Fernanda Araujo de Britto Velho, filha de Victor Carrion de Britto Velho e Liliane Araújo de Britto Velho, nasceu em 18 de outubro de 1978, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

De 1985 a 1995, estudou no Colégio Nossa Senhora do Rosário e Colégio Nossa Senhora do Bom Conselho, onde completou, respectivamente, seus estudos de primeiro e segundo grau. Em 1998, ingressou na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante a graduação, participou de atividades de monitoria acadêmica na área de Histologia e de projetos de pesquisa, como bolsista de iniciação científica, na área de Biotecnologia Animal. Graduou-se como Médica Veterinária em janeiro de 2004.

Aprovada no Concurso Público realizado em 2005, trabalhou na Secretaria Estadual da Agricultura do Rio Grande do Sul, de março de 2006 a setembro de 2010, ocupando o cargo de Médico Veterinário, na área de defesa sanitária animal e inspeção de produtos de origem animal. Ingressou via Concurso Público, na Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, em agosto de 2010, e na Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, em janeiro de 2011, em ambas exercendo, atualmente, suas atividades na área de saúde pública/vigilância sanitária.

Desde março de 2009, vem realizando seu Mestrado na UFRGS, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.