

## MARCADORES MOLECULARES PARA QUALIDADE DE OVOCITOS BOVINO

Molecular markers for quality of bovine oocytes

José Felipe W. Sprícigo<sup>1</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embrapa, Recursos  
Genéticos e  
Biotecnologia, Brasília-DF,  
Brazil.

E-mail address:  
[margot.dode@embrapa.br](mailto:margot.dode@embrapa.br)

### RESUMO

A seleção de ovócitos baseada em critérios morfológicos tem sido o método utilizado até o presente, no entanto, esse método apresenta limitações quanto a acurácia, objetividade e constância. Dessa forma, existe a necessidade de se buscar outras ferramentas que permitam uma seleção mais acurada de ovócitos competentes. Considerando que o ambiente folicular pode refletir características do ovócito, esse pode fornecer alternativas para a avaliação não invasiva da qualidade do ovócito. Nesse sentido, os esforços estão concentrados no perfil transcricional de células do cumulus (CC) e células da granulosa (CGM) e no perfil bioquímico do líquido folicular (LF). Entre as abordagens estão a análise do transcriptoma, proteoma e metaboloma. Nessa revisão inicialmente são descritos estudos que visam identificar marcadores no próprio ovócito, que apesar de fornecerem informações importante para o entendimento sobre a regulação da capacidade de desenvolvimento, inviabilizam o uso subsequente do ovócito. Posteriormente, são revisados os estudos que avaliam a análise transcricional das CCs e da CMG em correlação com a competência do ovócito e, em especial, os que acompanham o desenvolvimento embrionário para validar marcadores. E, finalmente é abordada a possibilidade de se identificar marcadores bioquímicos no LF e a tendência dos últimos anos, que tem passado de estudo marcadores únicos para técnicas mais complexas que estudam todos os metabólitos de LF utilizando a metabolômica como ferramenta.

**Palavra-chave:** competência, ovócito, célula do cumulus, líquido folicular.

### ABSTRACT

Oocyte selection using morphological criteria is currently used, but this selection approach has limitations in terms of accuracy, objectivity, and constancy. Therefore, the development of new methods that could allow the identification of molecular markers that can predict the oocyte competency more accurately is needed. Considering that follicular environment may reflect oocyte status, it can provide new alternatives for non-invasive assessment of oocyte quality. The efforts are concentrated on determining transcriptional profiling of cumulus (CC) and granulosa cells (MGC) and on biochemical profiling of follicular fluid (FF). The approaches used are transcriptomics, proteomics, and metabolomics technologies. In this review, we first describe the studies that aimed to identify molecular markers on the oocyte itself, that although gives relevant information regarding to the understanding of competency acquisition, they destroy the oocyte. Then, studies that evaluated cumulus/granulosa cell gene expression and especially those that followed the embryo development until the blastocyst stage are reported. Lastly, the possibility of identifying markers on FF is discussed as well as the tendency observed on the last few years of evaluating not only one metabolite but all metabolites using metabolomics as tool.

**Keywords:** Competence, oocyte, cumulus cell, follicular fluid.

## INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida (TRAs) são ferramentas importantes para a produção animal, preservação de espécies e medicina humana. Algumas das TRAs estão bem estabelecidas e sendo utilizadas rotineiramente, como é o caso da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Apesar dos muitos esforços feitos nos últimos 20 anos, visando melhorar a eficiência dessa biotecnologia, os avanços têm sido limitados. Tanto que a produção de embriões nos últimos anos tem se mantido em torno de 40% (Pontes *et al.*, 2011; Barcelo-Fimbres *et al.*, 2015) sem que um aumento significativo tenha sido observado. O sucesso da PIVE depende de vários fatores, dentre esses a qualidade ou competência ovocitária, o qual é um dos fatores mais limitante em animais domésticos. Isso porque, na maioria dos casos, os ovócitos utilizados para as TRAs são retirados prematuramente dos folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento e, assim, os ovócitos recuperados possuem diferentes graus de competência.

A competência é definida como a capacidade do ovócito de maturar, ser fecundado e de formar um embrião viável capaz de induzir uma gestação e o nascimento de um produto saudável (Orozco-Lucero *et al.*, 2014). Esta competência é desenvolvida ou adquirida durante a foliologênese e se refere a uma série de modificações celulares e moleculares que conferem ao ovócito a capacidade de desenvolvimento (Lonergan *et al.*, 2003). Essas modificações dependem de múltiplos fatores que envolvem a transcrição e estoque RNAs, estoque e tradução de proteínas, organização de organelas e estabelecimento da maquinaria necessária para retomada e progressão da meiose. Somente os ovócitos competentes têm capacidade de formar embriões, desta forma se a população de ovócitos a serem utilizados nas TRAs forem mais competentes certamente a eficiência da técnica aumentará e mais produtos poderão ser obtidos a partir de uma mesma manipulação.

Até o presente, o método utilizado para a seleção de ovócitos é a avaliação morfológica, em que critérios tais como a coloração, uniformidade de citoplasma e, o número e uniformidade das células do cúmulus (CC) são levados em consideração. Apesar de ser uma ferramenta simples e rápida, a avaliação morfológica tem uma eficiência limitada para prever a competência ovocitária. Portanto, a identificação de marcadores mais objetivos e que possam prever com maior precisão a capacidade de um ovócito de se desenvolver tem grande importância para os programas de produção de embriões em espécies domésticas. A busca por parâmetro de seleção além dos aspectos morfológicos, tem sido realizada por vários grupos de pesquisa em vários países, utilizando novas tecnologias tais como transcriptômica, proteômica e metabolômica (Assou *et al.*, 2006; Bettegowda *et al.*, 2008; Regassa *et al.*, 2011; O'Gorman *et al.*, 2016). De fato, marcadores bioquímicos presentes nas CC, células da granulosa mural (CGM), líquido folicular (LF), meio de maturação e no próprio ovócito, para prever a competência ovocitária já foram identificados (Bettegowda *et al.*, 2008; Bunel *et al.*, 2015; Caixeta *et al.*, 2009; Kussano *et al.*, 2016; Matoba *et al.*, 2014).

Esta revisão tem o objetivo de abordar as pesquisas recentes na busca por marcadores para a qualidade ovocitária e, reunir evidências da literatura sobre os avanços, nessa área utilizando o próprio ovócito, as CC, CGM e também o LF.

## Marcadores no ovócito

A competência pode ser correlacionada com diâmetro do ovócito e também com o diâmetro folicular. Em bovinos, um diâmetro mínimo de 120µm é essencial para que o ovócito possa ser competente. Isso porque aqueles que apresentam diâmetro menor ainda não completaram o seu crescimento e, esse fator é fundamental para que o mesmo possa adquirir a competência para o desenvolvimento (Fair *et al.*, 2003). Tanto que ovócitos provenientes de folículos entre 1,0-1,5 mm, por exemplo, que medem menos de 120µm e que não completaram o seu crescimento são capazes de retomar a meiose, porém, dificilmente completam a meiose e dão origem a um embrião (Miyano *et al.*, 2003). Existe também uma relação entre tamanho do folículo e competência, sendo que ovócitos provenientes de folículos maiores, em geral, tem maior potencial para desenvolvimento quando comparado à ovócitos totalmente crescidos, mas provenientes de folículos menores (Caixeta *et al.*, 2009). Estas informações sugerem que além de fatores intrínsecos dos ovócitos, estes são afetados pelo ambiente em que estão inseridos, e que, portanto, nem o tamanho do ovócito nem do folículo é capaz de diferenciar os competentes dos incompetentes.

Uma característica do ovócito é que, ao contrário do que ocorre com qualquer célula somática, as moléculas de RNAm são armazenadas em uma forma quiescente até que sejam usadas ao longo da maturação e do desenvolvimento embrionário inicial (Sirard, 2001). Sendo assim, a eficiência desse armazenamento, ou seja, o tipo e a abundância de transcritos específicos no pool de RNAm estocados determinam o grau de competência ao ovócito (Picton *et al.*, 1998).

Portanto, os estoques de RNAm são diferentes quando se compara ovócitos com diferentes graus de competência, sendo essa diferença uma alternativa para identificação de genes marcadores (Racedo *et al.*, 2008). Estudos com esse objetivo foram realizados por vários grupos de pesquisa, o que resultou na identificação de vários marcadores potenciais (Tabela 1), com diversas funções biológicas (Robert *et al.*, 2000; Donnison and Pfeffer, 2004; Mouro *et al.*, 2006; Pfeffer *et al.*, 2006; Ghanem *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2007; Racedo *et al.*, 2008; Caixeta *et al.*, 2009; Bessa *et al.*, 2013).

Apesar desse tipo de estudo fornecer informações importante para o entendimento sobre a regulação da capacidade de desenvolvimento, é necessário a destruição do ovócito para realizar a análise molecular. Portanto, esses não podem ser utilizados como marcadores para selecionar ovócitos mais competentes, o que leva a busca por outros métodos que não sejam invasivos.

Tabela 1. Marcadores moleculares de competência em ovócitos bovinos.

Gene	Estágio de maturação	Referência
CCNB1	VG	(Robert <i>et al.</i> , 2000)
CCNB2, CKS1B, CDC5L, PSMB2, SKIIP, RGS16, PRDX1	VG	(Mourot <i>et al.</i> , 2006)
CCMA2, NDFIP1, OCT4, MSX1, ZNF198, SLBP	VG	(Donnison and Pfeffer, 2004)
DNAJA1 (DJA4), GDF9, TRAPPC3	VG	(Pfeffer <i>et al.</i> , 2007)
DYNLL1, DYNC111	VG	(Racedo <i>et al.</i> , 2008)
PTTG1	VG	(Mourot <i>et al.</i> , 2006; Ghanem <i>et al.</i> , 2007)
H2A	VG	(Caixeta <i>et al.</i> , 2009)
RPL24, MSX1	VG	(Ghanem <i>et al.</i> , 2007)
INHBA, INHBB	VG	(Patel <i>et al.</i> , 2007)
PRDX1, PRDX2	VG	(Romar <i>et al.</i> , 2011)
G6PDH	VG	(Ghanem <i>et al.</i> , 2007)
RBM42, LSM10, HAUS8, AURKAIP1, CDK1, PAIP2, ENY2, ESCO2, PMS1, ELP4, TFTP1, SFRS7, TAF1A	VG	(Labrecque <i>et al.</i> , 2013)
CCNB1, GDF9, SOD1, SOD2	MII	(Lonergan <i>et al.</i> , 2003)
AQP3, SEPT7, ABHD4, SIAH2	MII	(Katz-Jaffe <i>et al.</i> , 2009)
SFRS14, DDR1, NDUFB6, UQCRH, DUSP6, NDUFS4	MII	(Biase <i>et al.</i> , 2014)
HDAC2	VG	(Bessa <i>et al.</i> , 2013)

### Marcadores moleculares nas CC e CGM

Uma alternativa interessante para avaliar a qualidade do gameta feminino, de forma não invasiva é o uso de componentes do ambiente folicular tais como as células somáticas que o constituem.

Durante a ovogênese e folliculogênese, os ovócitos crescem e se desenvolvem com uma relação direta com as células somáticas adjacentes. Durante a, a formação do antro, as células da granulosa que rodeiam o ovócito se diferenciam em duas linhagens funcional e anatomicamente distintas: as CGM que se aderem à parede do folículo e tem papel importante na esteroidogênese, e as CCs, que são metabolicamente ligadas com o ovócito. As CCs possuem projeções citoplasmáticas trans-zonais que são altamente especializadas e que penetram através da zona pelúcida e fazem contato diretamente com o citoplasma do ovócito pelas junções GAP, formando o complexo-cumulus-ovócito (Albertini *et al.*, 2001; Yeo *et al.*, 2009). Essa estrutura facilita a transferência de moléculas reguladoras e metabólitos necessárias para o desenvolvimento do ovócito e o controle do ciclo meiótico (Gilchrist and Richani, 2013).

Portanto, as junções GAP são o canal direto de comunicação entre o ovócito e CC, sendo essa comunicação essencial para o crescimento e maturação do ovócito (Yeo *et al.*, 2009). Isso porque existe uma interdependência entre esses dois tipos celulares, sendo que fatores secretados pelo ovócito (OSF) como o Fator de Diferenciação de Crescimento 9 (GDF-9) e a Proteína Morfogenética de osso 15 (BMP-15) influenciam as CC regulando seu crescimento e mantendo o seu fenótipo. O

ovócito, por sua vez, necessita das CC para fornecer produtos glicolíticos, como piruvato e aminoácidos essenciais para o seu crescimento (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2008). Desta forma, é esperado que os eventos inerentes às CGM e principalmente às CC possam refletir ou indicar a qualidade e/ou comprometimento do ovócito. Alguns estudos têm demonstrado que apesar de serem derivadas das mesmas células foliculares, após a diferenciação CC e CGM apresentam uma grande variação na expressão gênica (Burnick *et al.*, 2015; Koks *et al.*, 2016).

Os estudos que utilizam as CGM para identificar genes relacionados com competência são menos intensos dos que os que utilizam as CC, até porque quando da aspiração folicular as CGM muitas vezes não estão presentes e, também quando essas são utilizadas é necessário utilizar outros procedimentos para confirmar que sejam realmente CGM e não outro tipo de célula folicular. Em bovinos estudos visando esclarecer os eventos que ocorrem na camada da granulosa que levam a aquisição da competência do ovócito foram realizados utilizando o modelo de tamanho de folículo (Matoba *et al.*, 2014) e de horas de restrição de FSH (Nivet *et al.*, 2013). Esses estudos identificaram marcadores para prever o potencial de desenvolvimento dos ovócitos, tais como os genes LHCGR, IGF2, NRP1, VNN1, KCNJ8 (Matoba *et al.*, 2014; Nivet *et al.*, 2013). No trabalho de Matoba *et al.*, (2014) foi identificado uma expressão aumentada de LHCGR nas CGM no momento em que o ovócito teria maior competência, o que estaria relacionado ao início da seleção do folículo dominante.

Quando a privação de FSH foi utilizada como modelo, e análise molecular foi realizada considerando o período da privação que correspondia a obtenção de ovócitos mais competentes, três mudanças funcionais importantes foram identificadas (Nivet *et al.*, 2013). As mudanças identificadas considerando a mudança de expressão de genes específicos foram: 1) final do crescimento folicular (genes BMPR1B, IGF2, RELN) envolvendo interações com a matriz extracelular (TFPI2); angiogênese (NRP1), incluindo hipóxia e estresse oxidativo (GFPT2, TF e VNN1); 2) apoptose (KCNJ8) e 3) inflamação (ANKRD1).

O maior volume de informações disponível com relação a identificação de biomarcadores se concentra nos estudos com CC. De fato, os biomarcadores que são associados a produção de embriões, gestação e nascimento são mais comumente encontrados nas CC do que nas CGM, o que é esperado considerando que as CC têm contato mais direto com ovócitos.

Inúmeros trabalhos em humanos têm sido realizados na tentativa de identificar nas CC genes relacionados com a capacidade dos ovócitos de formarem embrião, produzir gestação e nascimento. Vários genes já foram identificados, mas até o momento não existe nenhum que possa ser utilizado com precisão e de forma rotineira. Recentemente, Kordus e La Voie (2017), realizaram uma compilação de todas as publicações relativas a esse assunto em humanos. Esses autores agruparam os marcadores em três classes, os que estão positivamente associados à gestação ou nascimento, os que apresentam resultados controversos e os que não estão associados com prenhez e nascimento.

Apesar dos resultados obtidos em humanos poderem ser utilizados para direcionar os estudos em animais domésticos vários fatores que influenciam os resultados da PIVE e a expressão de genes devem ser levados em conta quando comparações são realizadas. Dentre esses fatores, é importante ressaltar o fato de que em humanos a grande maioria dos pacientes recebem diversos tipos de superestimulação ovariana e apresentam diferentes diagnósticos de infertilidade ou subfertilidade. E que, portanto, os dados obtidos com TRAs e mesmo com análise molecular possam ter sido afetados pela superestimulação e pelo problema reprodutivo. Outro fator importante é que as CC de ovócito imaturos e maduros têm diferenças na expressão de genes (Assou *et al.*, 2006; Mamo *et al.*, 2011) e, trabalhos em humanos, na maioria dos casos, utilizam CCOs já maturados em contraste com a maioria imaturo em animais.

Estudos realizados até o presente levaram a identificação de milhares de transcritos que são diferencialmente expressos em CC de ovócitos competentes e incompetentes, tornando difícil a eleição dos melhores candidatos potenciais. Na tentativa de superar esse problema O'Shea *et al.* (2012) realizaram uma meta-análise, onde foi feita a comparação de dados já publicados em vários estudos com CC em que transcritos diferencialmente expressos foram relatados. Nessa meta-análise foram identificados alguns transcritos associados com aumento ou diminuição de competência.

A super expressão do gene ATRX foi associada com menor competência enquanto a menor expressão com maior competência. Já os genes WASL, ERG1, e HSP90B1 foram associados com a maior competência dos CCOs. WASL tem um papel na despolimerização de actina, ERG1 é um fator de transcrição envolvido em mitogênese e diferenciação e HSP90β1 é uma proteína chaperona relacionada à resposta ao choque térmico (O'Shea *et al.*, 2012).

Os modelos mais utilizados para a comparação de CCs de ovócitos competentes e incompetentes são o tamanho do folículo, a idade da doadora, a exposição e a privação de FSH (Bettegowda *et al.*, 2008; Ghanem *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2017). Melo *et al.* (2017), por exemplo, separou CCOs competentes de incompetentes após a punção de folículos grandes (>8mm) ou pequenos (1-3mm), respectivamente. As biópsias das CCs destes dois grupos de CCOs foram comparadas pela técnica de Microarranjo, que revelou expressão diferencial de 223 genes. Após a seleção dos candidatos para avaliação por RT-qPCR, confirmou que CCs de CCOs obtidos de folículos maiores apresentavam aumento da expressão em três genes (FGF11, IGFBP4, SPRY1) e a diminuição em outros quatro (ARHGAP22, COL18A1 e GPC4). Essa estratégia de prospectar os genes candidatos e posteriormente validá-los por qPCR tem sido a preferida da maioria dos grupos de pesquisa tanto em animais como em humanos.

A quantificação da expressão de genes nas CCs de CCOs que comprovadamente são capazes ou não de produzir embriões é o melhor método para validar genes candidatos como marcadores moleculares para ovócitos competentes. Entretanto, em bovinos poucos estudos seguem o desenvolvimento embrionário para confirmar a associação do padrão de expressão de genes candidatos nas CCs com a qualidade do ovócito (Bunel *et al.*, 2015; Kussano *et al.*, 2016; Matoba *et al.*, 2014). Portanto, alguns genes já foram validados utilizando esses procedimentos (Tabela 2). Em todos esses estudos foi realizada a quantificação da expressão gênica de biópsias de CCs de CCOs que foram submetidos a maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, em cultivo individual. Após a PIVE as biópsias eram agrupadas de acordo com o resultado da produção de embriões sendo CCOs de ovócitos que não produziram embriões e dos que alcançaram o estágio de blastocisto. O objetivo era correlacionar a expressão gênica das células, em CCOs que se desenvolveram ou não ao estágio de blastocisto. Foi detectada a expressão de alguns genes ligados ao metabolismo de lipídeos (AGPAT9) e transporte molecular (CLIC3, KRT8 e LUM) em CC de CCOs que não atingiram o estágio embrionário após o cultivo. Ainda, nestes estudos os genes GATM ligado ao metabolismo proteico, GPC4 e o TNFAIP6 envolvidos na expansão das CC apresentaram expressão aumenta em CC de CCOs que se desenvolveram ao estágio de blastocisto.

Tabela 2- Marcadores moleculares de competência ovocitária em células do cumulus bovinas.

Gene	Referências
HAS, INHBA, EGFR, GREM1, BTC, CD44, TNFAIP6, PTGS2	(Assidi <i>et al.</i> , 2008)
CTS, CTSS, CTSZ	(Bettegowda <i>et al.</i> , 2008)
CYP11A1, NSDHL, GATM, MAN1A1, VNN1, NRP1	(Bunel <i>et al.</i> , 2013)
TNFAIP6	(Matoba <i>et al.</i> , 2014)
AGPAT9, CLIC3, KRT8, LUM	(Bunel <i>et al.</i> , 2013)
GPC4	(Kussano <i>et al.</i> , 2016)
FGF11, IGFBP4, SPTY1, ARHGAP22, COL18A1, GPC4	(Melo <i>et al.</i> , 2017)
FSHR, GHR, EGFR	(Caixeta <i>et al.</i> , 2009)

### Marcadores bioquímicos no líquido folicular

Outra estratégia interessante para identificação de marcadores é a avaliação da composição do líquido folicular (LF). O LF é facilmente recuperado durante a aspiração folicular e, teoricamente, representa uma excelente fonte de substâncias que podem prever de forma não invasiva a qualidade do ovócito.

De acordo com Revelli *et al.* (2009), os componentes químicos do LF podem ser agrupados nas seguintes categorias a) hormônios; b) fatores de crescimento da super família do Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta); c) outros fatores de crescimento e interleucinas; d) espécies reativas de oxigênio (ROS); e) fatores anti-apoptóticos; f) proteínas, peptídeos e amino-acíd0s; g) açúcares; h) prostanóides.

Nos últimos anos, tem sido observado uma tendência bem definida de passar da pesquisa de marcadores moleculares únicos para técnicas mais complexas que estudam todos os metabólitos de LF. A metabolômica é uma ferramenta poderosa para estudar marcadores bioquímicos para ovócitos no LF, pois estuda pequenas moléculas encontradas em fluidos biológicos que representam o fenótipo funcional de uma célula, tecido ou organismo (O'Gorman *et al.*, 2013).

Estudos em humanos tem mostrado a relação entre presença de citocinas, fatores de crescimento, proteínas e metabólitos com a qualidade do ovócito (Benkhalifa *et al.*, 2015; Dumesic *et al.*, 2015). Em bovinos, também tem sido relatado que a análise metabolômica do LF pode ser uma ferramenta útil para caracterizar a qualidade do ovócito (Sinclair *et al.*, 2014; Bender *et al.*, 2010).

Um dos fatores limitante para o uso do LF em animais domésticos é que para poder correlacionar as substâncias presentes com a qualidade do ovócito é necessário que cada foliculo seja aspirado individualmente, sendo esse procedimento demorado e trabalhoso e inviável de ser realizado na prática.

Na tentativa de identificar fatores relacionados com a qualidade do ovócito Gérard *et al.* (2015) compararam o LF de bovinos proveniente de foliculos pequenos e grandes. Os autores relataram que a concentração glicose  $\alpha$  e  $\beta$  era muito maior em foliculos grandes do que em pequenos. Além disso, diferenças também foram encontradas para o aminoácido tirosina e o lactato.

Já Matoba *et al.* (2014), correlacionaram metabólitos foliculares, hormônios esteróides, ácidos graxos saturados e insaturados, aminoácidos, uréia e a glicose com o desenvolvimento embrionário, que foi realizado de forma individual para CCOs obtidos após dissecação do foliculo. A análise dos metabólitos presentes no LF mostrou diferenças entre os CCOs que formaram blastocisto e os que degeneraram. A L-alanina, glicina e L-glutamato foram positivamente correlacionados e a uréia foi negativamente correlacionado com a formação de blastocisto. Foi também observada diferença significativa na fração de ácidos graxos entre os ovócitos de diferentes qualidades. O LF de ovócitos que degeneraram apresentava maior concentração de ácido palmítico e total de ácidos graxos saturados.

Apesar desses resultados serem promissores, até o momento nenhum estudo cujo objetivo era encontrar um bom marcador para prever a qualidade do ovócito no LF foi capaz de identificar uma substância que pudesse ser utilizada com segurança.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que o desenvolvimento folicular envolve múltiplas interações intra-ovarianas e endócrinas para criar o microambiente ideal para o ovócito, é plausível supor que os componentes desse ambiente possam indicar a sua qualidade. Portanto, é esperado que o perfil de expressão de genes das células foliculares e ou perfil metabólico do líquido folicular reflitam o potencial de desenvolvimento do ovócito.

De fato, vários genes candidatos para a competência do ovócito têm sido identificados nas CC e CGM, entretanto esses marcadores ainda não estão sendo utilizados em programas de PIVE, nem mesmo em humanos. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que ainda não se tem estabelecido um padrão de expressão de genes candidatos que possa ser utilizado como um método acurado de seleção de ovócitos. Os fatores que tem limitado o uso desses marcadores envolvem a variabilidade nos resultados e falta de consistência. Nos estudos revisados, a variabilidade se deve ao uso de diferentes metodologias, sistemas de cultivo, estágios de desenvolvimento folicular, espécies e faixas etárias. Portanto, montar um painel de marcadores, que possa ser utilizado para estimar a competência dos CCOs, nos diferentes sistemas *in vitro*, utilizados atualmente é um desafio.

Apesar dos perfis metabolômicos e proteômicos do líquido folicular serem promissores, ainda são demorados de serem realizados, caros e dependem de equipamentos sofisticados e pessoal altamente especializado. Além disso, a dificuldade de aspirar cada foliculo individualmente, na prática quase que inviabiliza o uso dessa estratégia para animais domésticos.

Finalmente, esforços devem continuar no sentido de identificar e validar nas CC mais marcadores, fazendo uso das tecnologias disponíveis. Assim, fazendo a associação entre a expressão alterada de RNAm nas CC e o desenvolvimento e viabilidade embrionária será possível confirmar aqueles que realmente são marcadores mais consistentes. É importante ressaltar que um único gene não poderá ser usado como feramente par a seleção de ovócitos, mas sim um conjunto de genes (marcadores) são necessários para que seja possível formar um padrão específico ou que possam coloca-los em um algoritmo utilizado para esse fim.

### REFERÊNCIAS

- Pontes JH, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KC, et al. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (Bos indicus) donors. *Theriogenology*. 2011;75(9):1640-6.
- Barcelo-Fimbres M, Campos-Chillon LF, Mtango NR, Altermatt J, Bonilla L, Koppang R, et al. Improving *in vitro* maturation and pregnancy outcome in cattle using a novel oocyte shipping and maturation system not requiring a CO<sub>2</sub> gas phase. *Theriogenology*. 2015;84(1):109-17.
- Orozco-Lucero E, Dufort I, Robert C, Sirard MA. Rapidly cleaving bovine two-cell embryos have better developmental potential and a distinctive mRNA pattern. *Molecular reproduction and development*. 2014;81(1):31-41.

- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene.* 2003;38(4):259-67.
- Bettgowda A, Patel OV, Lee KB, Park KE, Salem M, Yao J, et al. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biology of reproduction.* 2008;79(2):301-9.
- Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrouer T, Pellestor F, Klein B, et al. The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. *Human reproduction.* 2006;21(7):1705-19.
- Regassa A, Rings F, Hoelker M, Cinar U, Tholen E, Looft C, et al. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. *BMC genomics.* 2011;12:57.
- Mamo S, Carter F, Lonergan P, Leal CL, Al Nalb A, McGettigan P, et al. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. *BMC genomics.* 2011;12:151.
- O'Gorman A, Wallace M, Cottell E, Gibney MJ, McAuliffe FM, Wingfield M, et al. Metabolic profiling of human follicular fluid identifies potential biomarkers of oocyte developmental competence. *Reproduction.* 2013;146(4):389-95.
- Bunel A, Jorssen EP, Merckx E, Leroy JL, Bols PE, Sirard MA. Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. *Theriogenology.* 2015;83(2):228-37.
- Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Dode MA. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev.* 2009;21(5):655-64.
- Kussano NR, Leme LO, Guimaraes AL, Franco MM, Dode MA. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. *Theriogenology.* 2016;85(6):1167-76.
- Matoba S, Bender K, Fahey AG, Mamo S, Brennan L, Lonergan P, et al. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. *Reprod Fertil Dev.* 2014;26(2):337-45.
- Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular reproduction and development.* 1995;42(4):437-42.
- Miyano T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology.* 2003;59(1):61-72.
- Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology.* 2001;55(6):1241-54.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;145(1-2):27-37.
- Racedo SE, Wrenzycki C, Herrmann D, Salamone D, Niemann H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. *Molecular reproduction and development.* 2008;75(1):17-25.
- Bessa IR, Nishimura RC, Franco MM, Dode MA. Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene.* 2013;48(5):781-9.
- Donnison M, Pfeffer PL. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. *Biology of reproduction.* 2004;71(6):1813-21.
- Mourot M, Dufort I, Gravel C, Algriany O, Dieleman S, Sirard MA. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Molecular reproduction and development.* 2006;73(11):1367-79.
- Pfeffer PL, Sisco B, Donnison M, Somers J, Smith C. Isolation of genes associated with developmental competency of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2007;68 Suppl 1:S84-90.
- Robert C, Barnes FL, Hue I, Sirard MA. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. *Molecular reproduction and development.* 2000;57(2):167-75.
- Ghanem N, Holker M, Rings F, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, et al. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. *BMC developmental biology.* 2007;7:90.
- Patel OV, Bettgowda A, Ireland JJ, Coussens PM, Lonergan P, Smith GW. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction.* 2007;133(1):95-106.
- Romar R, De Santis T, Papillier P, Perreau C, Thelie A, Dell'Aquila ME, et al. Expression of maternal transcripts during bovine oocyte in vitro maturation is affected by donor age. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene.* 2011;46(1):e23-30.
- Labrecque R, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. Gene expression analysis of bovine oocytes with high developmental competence obtained from FSH-stimulated animals. *Molecular reproduction and development.* 2013;80(6):428-40.
- Katz-Jaffe MG, McCallie BR, Preis KA, Filipovits J, Gardner DK. Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. *Theriogenology.* 2009;71(6):939-46.
- Biase FH, Everts RE, Oliveira R, Santos-Biase WK, Fonseca Merighe GK, Smith LC, et al. Messenger RNAs in metaphase II oocytes correlate with successful embryo development to the blastocyst stage. *Zygote.* 2014;22(1):69-79.
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction.* 2001;121(5):647-53.
- Yeo CX, Gilchrist RB, Lane M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. *Biology of reproduction.* 2009;80(5):1072-80.
- Gilchrist RB, Richani D. Somatic guidance for the oocyte. *Developmental cell.* 2013;27(6):603-5.
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 2001;122(6):829-38.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update.* 2008;14(2):159-77.

- Burnik Papler T, Vrtacnik Bokal E, Maver A, Kopitar AN, Lovrecic L. Transcriptomic Analysis and Meta-Analysis of Human Granulosa and Cumulus Cells. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136473.
- Koks S, Velthut A, Sarapik A, Altmae S, Reinmaa E, Schalkwyk LC, et al. The differential transcriptome and ontology profiles of floating and cumulus granulosa cells in stimulated human antral follicles. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(4):229-40.
- Nivet AL, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. Changes in granulosa cells' gene expression associated with increased oocyte competence in bovine. *Reproduction*. 2013;145(6):555-65.
- Kordus RJ, LaVoie HA. Granulosa cell biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle. *Reproduction*. 2017;153(2):R69-R83.
- O'Shea LC, Mehta J, Lonergan P, Hensey C, Fair T. Developmental competence in oocytes and cumulus cells: candidate genes and networks. *Syst Biol Reprod Med*. 2012;58(2):88-101.
- Melo EO, Cordeiro DM, Pellegrino R, Wei Z, Daye ZJ, Nishimura RC, et al. Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. *Anim Genet*. 2017;48(1):19-29.
- Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S, et al. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biology of reproduction*. 2008;79(2):209-22.
- Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2009;7:40.
- Benkhalifa M, Madkour A, Louanjli N, Bouamoud N, Saadani B, Kaarouch I, et al. From global proteome profiling to single targeted molecules of follicular fluid and oocyte: contribution to embryo development and IVF outcome. *Expert review of proteomics*. 2015;12(4):407-23.
- Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and sterility*. 2015;103(2):303-16.
- Sinclair KD, Lunn LA, Kwong WY, Wonnacott K, Linforth RS, Craigon J. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development. *Reproductive biomedicine online*. 2008;16(6):859-68.
- Bender K, Walsh S, Evans AC, Fair T, Brennan L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction*. 2010;139(6):1047-55.
- Gerard N, Fahiminiya S, Grupen CG, Nadal-Desbarats L. Reproductive physiology and ovarian folliculogenesis examined via <sup>1</sup>H-NMR metabolomics signatures: a comparative study of large and small follicles in three mammalian species (*Bos taurus*, *Sus scrofa domestica* and *Equus ferus caballus*). *Omics : a journal of integrative biology*. 2015;19(1):31-40.