UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

RAFAELLA CURVELANO LEMES

**Análise do perfil de expressão gênica de oócitos bovinos advindos de complexos
cumulus-oócito com diferentes qualidades morfológicas**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

RAFAELLA CURVELANO LEMES

**Análise do perfil de expressão gênica de oócitos bovinos advindos de complexos
cumulus-oócito com diferentes qualidades morfológicas**

**Dissertação apresentada ao Departamento
de Genética da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Genética.**

Área de concentração: Genética

**Orientador: Prof. Dr. Raysildo Barbosa
Lôbo**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lemes, Rafaella Curvelano.

Análise do perfil de expressão gênica de oócitos bovinos advindos de complexos cumulus-oócito com diferentes qualidades morfológicas / Rafaella Curvelano Lemes; orientador Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo. Ribeirão Preto, 2013.

143 f.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2013.

1- bovino, 2- complexo cumulus-oócito, 3- *microarray*, 4- qualidade morfológica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaella Curvelano Lemes

Análise do perfil de expressão gênica de oócitos bovinos advindos de complexos cumulus-oócito com diferentes qualidades morfológicas.

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Área de concentração: Genética

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profa.Dra.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profa.Dra.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A todos aqueles que sorriram para mim,
me encorajando a seguir em frente

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo, pela enorme confiança depositada em mim e pelo incentivo nas horas necessárias. O privilégio de ser sua orientada me trouxe a oportunidade de aprender a lidar com as dificuldades e crescer muito com isso. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior, por disponibilizar seu laboratório para o meu uso, assim como seus alunos para me auxiliarem. Todas as conversas com a Anne, Aline, Cristiane, Greice, Nathália e Rafaela fizeram diferença no meu projeto. Em especial ao Júlio por ter me auxiliado em muitos experimentos e ter discutido comigo alguns resultados.

Ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, por se disponibilizar a me ajudar e a abrir seu laboratório para minha visita. Ao Prof. Dr. Marcos Chiaratti e ao Prof. Dr. Felipe Perecin que me auxiliaram com as dificuldades ao longo do projeto.

Ao Prof. Dr. Rui Ferriani, por disponibilizar seu laboratório para o meu uso. Por toda a ajuda que a Cristiana Ribas e Juliana Meola me deram durante o desenvolvimento do projeto.

Às professoras Dr^a. Ester Silveira Ramos, Dr^a. Lúcia Regina Martelli e Dr^a. Maria Armênia Ramalho de Freitas, pela convivência durante meus dias no Bloco C.

Aos doutorandos Anderson e Vivian, por serem muito mais que colegas de laboratório. Vocês foram meus co-orientadores, estando comigo sempre que eu precisei, me auxiliando em cada dificuldade, me ajudando a achar o caminho correto e a melhor solução. A amizade de vocês é muito importante para mim e todos os momentos que vivemos, no laboratório, nos cultivos noturnos, nos trabalhos que fizemos juntos, nos problemas que discutimos, nos congressos que participamos sempre fará parte das minhas lembranças. Obrigada por tudo!

Às doutoras Adriana e Fernanda por fazerem parte do início do meu mestrado, me auxiliando na escrita do projeto e na decisão do melhor caminho a seguir. Muito obrigada pela amizade que mantemos até hoje, apesar da distância.

Ao técnico Reginaldo, por todos os momentos que dividimos diariamente no laboratório. Você não só me ajudou com as questões do laboratório, mas se tornou um amigo com quem pude dividir momentos de aflição e felicidade. Obrigada por toda a ajuda, de meio de cultivo a para-choque de carro.

Aos técnicos Luiz, Marli, Paulo, Silvio, pela ajuda e convivência agradável.

A todos do Bloco C, Alexandra, Carolina, Ciro, Cristiana, Felipe, Flávia, Héliida, Heverton, Juliana, Karina, Larissa, Lisandra, Marcel, Marco, Murilo, Paula, Sarah, Tiago,

Vivian pela convivência diária, pelas conversas nos corredores, pelo almoços comunitários, pelas comemorações, por dividirem os dias comigo.

À Mara, por alegrar todas as minhas manhãs com seu bom-humor impecável.

Ao Luciano e ao Cristiano e todos os outros guardas do Bloco C que proporcionaram segurança nos horários mais distintos nos quais estive no laboratório.

Ao Frigorífico Barra Mansa, pelos ovários fornecidos.

Ao Laboratório de Micromanipulação de Embriões, ao Laboratório de Molecular e ao Laboratório Biologia da Reprodução da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Laboratório de Genética Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto por proporcionar a realização dos experimentos.

Ao CNPQ, FAPESP (processo 2011/50463-1), ANCP, PROEX pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

Aos integrantes da banca examinadora, que disponibilizaram parte de seu tempo para a análise desse trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho e conviveram comigo em algum momento, meu sincero agradecimento.

Aos meus pais, Orlandino e Carmen, pelo amor incondicional, carinho, apoio e compreensão que eles sempre me deram ao longo dos anos. Além de todo o apoio, eles sempre me disponibilizaram o necessário para que o meu aproveitamento escolar dependesse apenas de mim, inculcando-me uma responsabilidade desde de muito cedo. Se por um lado me deram liberdade de escolher o meu caminho, por outro, me mostraram que essa liberdade tinha de acarretar sentido de responsabilidade. É por tudo isso que tenho muito a agradecer e muito orgulho deles! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Ícaro e Orlandino Júnior, por estarem sempre por perto e dividirem momentos de alegria comigo. Vocês fizeram muita falta nos meus dias.

Ao meu amigo e companheiro Daniel por todo o apoio, carinho, compreensão durante esse último ano. Sem você pra me fazer erguer a cabeça e seguir adiante, após cada experimento mal-sucedido, eu não teria conseguido chegar aonde cheguei. Muito obrigada pela paciência e palavras de conforto nesses últimos meses tão corridos.

Às minhas quase irmãs, Camila Palma e Maryna, por dividirem comigo o mesmo teto e também todas as aflições com os experimentos, as dificuldades e o tempo. Muito obrigada pela amizade, pelo companherismo, por serem a minha família durante esse tempo.

Às minhas amigas Camila Devicaro e Laís pelos momentos de descontração, pela amizade, pela ajuda, pelas palavras doces nos momentos certos. Vocês fazem muita falta no meu dia-a-dia!

Às minhas amigas Geisa e Luiza por dividirem comigo todos os momentos do mestrado: o começo tranquilo, o meio intenso e o fim tumultuado! Poder dividir com vocês todas os momentos de diversão e aflição fez crescer ainda mais a nossa amizade. Muito obrigada por estarem sempre dispostas a me ouvir e me ajudar, em qualquer circunstância!

A todas as dificuldades encontradas durante o percurso, que me proporcionaram um crescimento exponencial tanto intelectual, quanto moral, e principalmente espiritual. Encontrar dificuldades pelo caminho me mostrou que é preciso coragem e paciência para seguir adiante, mesmo quando tudo parece ir ao contrário.

E por último, mas não menos importante, a Deus pela vida!

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo”

(Winston Churchill)

RESUMO

Lemes, R. C. **Análise do perfil de expressão gênica de oócitos bovinos advindos de complexos cumulus-oócito com diferentes qualidades morfológicas.** 143f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. 2013

A busca por melhores resultados nas biotecnologias reprodutivas leva a um estudo dos mecanismos fisiológicos básicos dos gametas e embriões em estágios iniciais. Entender como funciona o desenvolvimento destes, quais os nutrientes que eles precisam para se desenvolver *in vitro* e quais as condições ambientais necessárias permitem maiores taxas de sucesso. Tendo em vista a heterogeneidade dos complexos cumulus-oócito (COC) bovinos recuperados de ovários obtidos em frigorífico para a maturação *in vitro* e a relação entre oócito e células do cumulus nos resultados da produção *in vitro* de embriões, esse trabalho visa a identificação de fatores moleculares que possam explicar as melhores taxas de blastocistos obtidas por COCs com mais de três camadas de células do cumulus compactas e ooplasma homogêneo (COCI) quando comparados com COCs com menos de duas camadas de células do cumulus, com parte da zona pelúcida exposta e ooplasma homogêneo ou heterogêneo (COCIII). Para isso, COCI e III foram maturados *in vitro* separadamente, foram vortexados para retirada das células do cumulus e os oócitos foram submetidos a extração de RNA. O RNA foi amplificado em aRNA, marcado com biotina, fragmentado e hibridizado em *microarray*. Os *arrays* foram escaneados e os dados gerados analisados pelo métodos *Significance Analysis of Microarrays* e *Rank Products* em busca de genes diferencialmente expressos (DEG). A análise funcional *in silico* foi realizada com a ferramenta *Ingenuity Pathway Analysis*. Os resultados mostraram que o perfil de expressão dos oócitos de COCIII é diferente do perfil dos oócitos de COCI, como pode ser observado pelos 446 DEGs identificados, sendo 24 com expressão aumentada em oócitos de COCIII. Os genes com expressão alterada estão envolvidos em processos básicos da célula, como reassunção da meiose, metabolismo do oócito e maturação molecular, o que corrobora a ideia de que uma grande quantidade de células do cumulus interagindo com o oócito é crucial para a competência de desenvolvimento.

Palavras-chave: bovino, complexo cumulus-oócito, *microarray*, qualidade morfológica.

ABSTRACT

Lemes, R. C. **Analysis of the gene expression profile of bovine oocytes derived from cumulus-oocyte complexes with different morphological qualities.** 143f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. 2013

The researches for better results in reproductive biotechnologies have leading to studies of the basic physiological mechanisms of gametes and embryos in the early stages of developmental. Understand about their development, which nutrients they need and what environmental conditions are necessary to allow higher success rates. Because of the cumulus-oocyte complexes (COC) heterogeneous recovered from bovine ovaries obtained from an abattoir used for in vitro maturation and the relationship between oocyte and cumulus cells in the in vitro production of embryos, this study aims to identify molecular factors which might explain the improved rates of blastocyst obtained by COCs with more than three compact layers of cumulus cells and homogeneous ooplasm (COCI) compared with COC with less than two layers of cumulus cells, with part of the zona pellucida exposed and homogeneous or heterogeneous ooplasm (COCIII). For this, COCI and III were matured in vitro separately, their cumulus cells were removed and oocytes were subjected to RNA extraction. The RNA was amplified in aRNA, biotin labeled, fragmented and hybridized on microarray. The arrays were scanned and the data generated analyzed by the Significance Analysis of Microarrays and Rank Products methods in search of differentially expressed genes (DEG). In silico functional analysis were performed using Ingenuity Pathway Analysis. The results showed that the expression profile of COCIII oocytes is different from the profile of COCI oocytes. 446 DEGs were identified of which 24 presented increased expression in COCIII oocytes. Genes with altered expression are, in general, involved in the basic processes of the cell, as reassume of meiosis, metabolism of the oocyte and molecular maturation, which confirms the idea that a large amount of cumulus cells interacting with the oocyte is crucial for the development of competence.

Keywords: bovine, cumulus-oocyte complex, microarray, morphological quality.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01. Esquema representando os processos de oogênese e foliculogênese relacionados.....33
- Figura 02. As células germinativas primordiais, em mamíferos, migram da região do saco vitelínico (A) para a região dos sulcos genitais, onde as gônadas se formarão (B) (imagem de GILBERT, 1997).....34
- Figura 03. Comunicação bidirecional entre o oócito e as células do cumulus, essencial para os processos de oogênese e foliculogênese. A comunicação ocorre via sinalização parácrina (seta rosa) e pela troca por meio das junções *gap* (seta azul) (imagem adaptada de GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).....37
- Figura 04. Esquema ilustrando os processos de transcrição, síntese de proteína e ultraestrutura do nucléolo durante o crescimento, maturação e fertilização do oócito e o desenvolvimento inicial em bovinos. Parte superior: mRNA materno (laranja) é sintetizado durante o crescimento do oócito, alguns mRNA são traduzidos imediatamente em proteínas (azul), enquanto outros são estocados para a tradução posterior (rosa). Uma pequena ativação da transcrição de mRNA embrionários ocorre a partir do zigoto até sua ativação completa no estágio de oito células em bovinos. Parte mediana: rRNA materno (laranja) é sintetizado durante o crescimento do oócito, resultando na produção de ribossomos (azul). A síntese de rRNA embrionário é iniciada juntamente com a ativação completa da síntese de mRNA embrionário, contribuindo para a produção de ribossomos. Parte inferior: durante o crescimento oocitário, o nucleólo é ativado no folículo secundário sendo inativado ao fim do crescimento do oócito. A ativação do nucleólo no embrião ocorre em paralelo com a maior ativação da síntese de mRNA embrionário (imagem adaptada de HYTTEL, 2011).....40
- Figura 05. Visão geral de alguns aspectos da regulação da expressão em oócitos. Coluna da direita, parte superior: durante o crescimento do oócito, os rRNA são transcritos, traduzidos e estocados na célula. Coluna da esquerda: os mRNA são transcritos, poliadenilados e traduzidos durante o crescimento do oócito. Coluna direita, parte

mediana: com a inibição da maquinaria transcricional, durante a maturação oocitária, os mRNA passam por processos de deadenilação e são estocados para utilização futura. Parte inferior: de acordo com as necessidades da célula, os mRNA estocados são recrutados e traduzidos (imagem adaptada de EICHENLAUB-RITTER; PESCHKE, 2002).....43

Figura 06. Delineamento experimental.....54

Figura 07. Regiões do eletroferograma gerado pelo software do *Bioanalyzer* e o respectivo gel. Regiões do eletroferograma (A) e marcador do Pico LabChip (B), que possibilita estimar o tamanho dos RNAs de cada região. A pré-região precede o marcador (M) e corresponde aos RNAs menores que 25 nucleotídeos; a região 5S inclui RNAs com tamanho menor que 200 nucleotídeos. Já a região-rápida inclui RNA de tamanho aproximadamente entre 200 e 1500 nucleotídeos. A região 18S inclui RNAs entre 1600 e 1800 nucleotídeos, enquanto a região 28S inclui RNAs de tamanho entre 3200 e 3600 nucleotídeos. Os RNAs com tamanho entre 1800 e 3200 nucleotídeos fazem parte da inter-região e a pós-região inclui RNAs de tamanho maior que 4500 nucleotídeos.....60

Figura 08. Imagem dos gráficos gerados das amostras de RNA submetidas à análise de integridade no *Bioanalyzer*. É possível observar em cada gráfico o pico do marcador, os pico dos rRNA 18S e 28S, o RIN (*RNA Number Integrity*) e a razão rRNA gerado para cada amostra.....66

Figura 09. Imagem dos gráficos gerados das amostras de aRNA submetidas a análise do perfil de distribuição dos fragmentos no *Bioanalyzer*. É possível observar que a maior parte dos aRNA estão distribuídos entre 600-1200 nucleotídeos, o que era esperado após o passo de amplificação de todo o conteúdo de mRNA do oócito.....69

Figura 10. Imagem dos gráficos gerados das amostras de aRNA fragmentadas submetidas a análise do perfil de distribuição dos fragmentos no *Bioanalyzer*. É possível observar que o pico de aRNA fragmentado está aproximadamente entre 100-120

nucleotídeos, o que era esperado após o passo de fragmentação de todo o conteúdo de aRNA.....71

Figura 11. Imagem gerada pelo *software* após escaneamento do *array*. Os controles de hibridização podem ser visualizados em quatro pontos diferentes: ao redor de toda a imagem, os pontos brancos que delimitam o *array*; no canto superior esquerdo, formando o nome do *array* (*GeneChip Bovine*); dois quadrados na área central, o superior com os controles negativos e o inferior com os controles positivos.....72

Figura 12. Imagem dos seis *arrays* gerados pelo *software*. O arrays 120, 121 e 126 pertencem ao grupo de oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I e os arrays 123, 124 e 129 pertencem ao grupo de oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III.....73

Figura 13. Boxplot das seis amostras antes da normalização (A) e após a normalização pelo método RMA (*Robust Multi-array Average*) (B). OO-COCI: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I, OO-COCIII: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III.....74

Figura 14. Gráfico mostrando os resultados da correlação de Spearman antes da normalização (A), após normalização pelo método RMA (*Robust Multi-array Average*) (B) e após correção do batch e filtro IQR (*Inter-Quartile-Range*) (C). Os arrays 120, 121 e 126 pertencem ao grupo OO-COCI (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I) e os arrays 123, 124 e 129 pertencem ao grupo OO-COCIII (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III). Em C, a correlação entre as amostras de OO-COCI e entre as amostras de OO-COCIII ficaram maiores e a diferença entre os dois grupos também ficou mais evidente. A escala de cores nos gráficos varia do branco ao vermelho, sendo o branco correspondente à menor correlação e o vermelho à maior.....76

Figura 15. Gráfico mostrando os resultados da análise por componentes principais antes da normalização (A), após normalização pelo método RMA (*Robust Multi-array*

Average) (B) e após correção do batch e filtro IQR (*Inter-Quartile-Range*) (C), quando uma melhor separação entre os dois grupos pode ser observada. Os arrays 120, 121 e 126, representadas pelos pontos azuis, pertencem ao grupo OO-COCI (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I) e os arrays 123, 124 e 129, representados pelos pontos verdes, pertencem ao grupo OO-COCIII (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III).....77

Figura 16. Os 389 DEGs reconhecidos pelo IPA foram classificados quanto a função da molécula na célula.....79

Figura 17. Os 389 DEGs reconhecidos pelo IPA foram classificados quanto a localização da molécula na célula.....80

Figura 18. Funções biológicas enriquecidas com os genes diferencialmente expressos que foram selecionadas por estarem relacionadas a competência de desenvolvimento do oócito. Para cada função é apresentado o número de genes com expressão aumentada e o número de genes com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III quando comparados com oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I.....81

Figura 19. Análise de agrupamento hierárquico dos 108 DEGs. As amostras estão claramente separadas em dois grupos: os arrays 120, 121 e 126 pertencem ao grupo OO-COCI (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I) e os arrays 123, 124 e 129 pertencem ao grupo OO-COCIII (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III). No eixo dos genes, observa-se dois grupos, o primeiro contendo 104 genes menos expressos nos OO-COCIII e o segundo grupo contendo 4 genes mais expressos nos OO-COCIII.....82

Figura 20. As 10 vias biológicas mais significativas que foram enriquecidas com os DEGs. Para cada via biológica é apresentado o $-\log(\text{valor-p})$84

Figura 21. A via biológica mais significativa relacionada a “disfunção mitocondrial”, com valor-p 0,00000000116. As figuras geométricas margeadas por laranja e preenchidas de verde referem-se aos genes que estão com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I. Legenda de todas as formas geométricas e interações entre genes consta no ANEXO C.....87

Figura 22. Via biológica relacionada a “sinalização EIF2”, com valor-p 0,00225. As figuras geométricas margeadas por laranja e preenchidas de verde referem-se aos genes que estão com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I. Legenda de todas as formas geométricas e interações entre genes consta no ANEXO C.....89

Figura 23. Via biológica relacionada a “via das pentoses-fosfato”, com valor-p 0,00287. As figuras geométricas margeadas por laranja e preenchidas de verde referem-se aos genes que estão com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I. Legenda de todas as formas geométricas e interações entre genes consta no ANEXO C.....91

Figura 24. Rede biológica envolvendo “organização celular, manutenção e funcionamento celular e morfologia celular”. Essa foi a rede biológica com maior score e maior número de DEGs envolvidos. As figuras geométrica preenchidas de verde referem-se aos genes que estão com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I, enquanto as figuras preenchidas de vermelho referem-se aos genes com expressão aumentada. Legenda de todas as formas geométricas e interações entre genes consta no ANEXO C.....92

Figura 25. Esquema geral da via das pentoses-fosfato, envolvendo a fase oxidativa e a fase não oxidativa (NELSON; COX, 2011a).....101

Figura 26. Representação dos complexos I, II, III, IV e V (F_0 e F_1) da mitocôndria. Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de carregadores assimetricamente arranjados na membrana interna. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana, produzindo tanto um gradiente químico quanto um gradiente elétrico. A força próton-motriz que direciona os prótons de volta para a matriz proporciona a energia para a síntese de ATP, catalisada pelo complexo V (NELSON; COX, 2011b).....103

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01. Resultados das quantificações e razões 260/280 e 260/230 medidas no *NanoDrop* das amostras de RNA. OO-COCI: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I, OO-COCIII: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau.....65
- Tabela 02. Resultados das quantificações e razões 260/280 e 260/230 medidas no *NanoDrop* das amostras de aRNA. OO-COCI: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I, OO-COCIII: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III.....68
- Tabela 03. Resultados das quantificações e razões 260/280 e 260/230 medidas no *NanoDrop* das amostras de aRNA após diminuição do volume no *SpeedVac*. OO-COCI: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I, OO-COCIII: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III.....70
- Tabela 04. As cinco funções biológicas mais significativas da subdivisão “funções moleculares e celulares” foram confrontadas com as 10 vias biológicas mais significativas, levando a identificação de 12 genes comuns a essas funções/vias biológicas.....85
- Tabela 05. Os 10 genes, com maiores *fold-change*, com expressão aumentada em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I.....94
- Tabela 06. Os 10 genes, com maiores *fold-change*, com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I.....95

Tabela 07. Os genes envolvidos na função biológica “sinalização e interação célula-célula” foram ranqueados quanto ao seu fold-change e analisados quanto a sua função primária.....	96
--	----

LISTA DE SIGLAS

ABL1	<i>c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>
ACP1	<i>acid phosphatase 1, soluble</i>
AHCY	<i>adenosylhomocysteinase</i>
APC	complexo promotor da anáfase
aRNA	<i>anti-sense</i> ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
ATP5H	<i>ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d</i>
ATP5J2	<i>ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F2</i>
BMP15	<i>bone morphogenetic protein 15</i>
BMPR2	<i>bone morphogenetic protein receptor 2</i>
BTC	<i>betacellulin</i>
C19H17orf85	<i>chromosome 19 open reading frame, human C17orf85</i>
C1D	<i>C1D nuclear receptor co-repressor</i>
C9H12orf49	<i>chromosome 12 open reading frame 49 ortholog</i>
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
CBS	<i>cystathionine-beta-synthase</i>
CD200	<i>CD200 antigen</i>
CD44	<i>CD44 antigen</i>
CDC2	<i>cell division control protein 2</i>
CDC20	<i>cell division control protein 20</i>
CDK1	<i>cyclin-dependant kinase</i>
CDKN2AIPNL	<i>CDKN2A interacting protein N-terminal like</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CNIH4	<i>cornichon homolog 4 (Drosophila)</i>
COC	complexo cumulus-oócito
COG2	<i>component of oligomeric golgi complex 2</i>
COMMD4	<i>COMM domain containing 4</i>
COX17	<i>cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae)</i>
COX4I1	<i>cytochrome c oxydase subunit 4</i>
COX5B	<i>cytochrome c oxidase subunit Vb</i>
COX6A1	<i>cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1</i>
COX6C	<i>cytochrome c oxidase subunit VIc</i>

COX7A2	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)</i>
CSF	fator citostático
CTSB	<i>cathepsin B</i>
CTSS	<i>cathepsin S</i>
CTSZ	<i>cathepsin Z</i>
DDB2	<i>damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa</i>
DDX1	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1</i>
DDX39/URH49	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39</i>
DDX39B/UAP56	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39B</i>
DEAD-box	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box</i>
DEG	genes diferencialmente expressos
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAJC6	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6</i>
DPCD	<i>deleted in primary ciliary dyskinesia homolog (mouse)</i>
DUS3L	<i>dihydrouridine synthase 3-like (S. cerevisiae)</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EIF2	<i>eukaryotic translation initiation factor 2</i>
EIF2B3	<i>eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3 gamma, 58kDa</i>
EIF3F	<i>eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F</i>
EIF3G	<i>eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G</i>
EIF4	<i>eukaryotic translation initiation factor 4</i>
EIF	<i>eukaryotic translation initiation factor</i>
FADH2	<i>flavin adenine dinucleotide</i>
FAU	<i>Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV)</i>
FBOX5/EMI1	<i>F-box protein 5</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
FST	<i>follostatin</i>
GDF9	<i>growth differentiation factor 9</i>
GIT2	<i>G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 2</i>
GLUT	<i>glucose transporter</i>
GPX1	<i>glutathione peroxidase 1</i>

GPX4	<i>glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)</i>
GREM1	<i>gremlin</i>
GSH	<i>glutathione</i>
HAS2	<i>hyaluronic acid synthase 2</i>
HCL	<i>Hierarchical Clustering</i>
HSF	<i>heat shock transcription factors</i>
HSF2	<i>heat shock transcription factor 2</i>
HSP	<i>heat shock proteins</i>
HSP40	<i>heat shock 40kD protein</i>
HSP70	<i>heat shock 70kD protein</i>
HSP90	<i>heat shock 90kD protein</i>
HSP90AA1	<i>heat shock 90kD protein 1, alpha</i>
HSP90AB1	<i>heat shock 90 kDa protein 1β</i>
HSPA1A	<i>heat shock 70kDa protein 1A</i>
HSPA5	<i>heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)</i>
INHBA	<i>inhibin, beta A</i>
IP3R	<i>inositol 1,4,5-trisphosphate receptors</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IQR	<i>Inter-Quartile-Range</i>
KCl	cloreto de potássio
LENG1	<i>leukocyte receptor cluster (LRC) member 1</i>
LH	hormônio luteinizante
Lys	lisina
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>
MAS	esterol ativador de meiose
MERTK	<i>c-mer proto-oncogene tyrosine kinase</i>
microRNA	micro ácido ribonucleico
Mos	<i>v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog</i>
MPF	fator promotor da maturação
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MRPS14	<i>mitochondrial ribosomal protein S14</i>
NaCl	cloreto de sódio

NADH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NDUFA11	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 11, 14.7kDa</i>
NDUFA2	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2, 8kDa</i>
NDUFA5	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5, 13kDa</i>
NDUFA7	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7, 14.5kDa</i>
NDUFA8	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa</i>
NDUFB2	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2, 8kDa</i>
NDUFB9	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9, 22kDa</i>
NDUFS5	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5, 15kDa</i>
NDUFS6	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa</i>
NDUFS7	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa</i>
NOL12	<i>nucleolar protein 12</i>
NOL7	<i>nucleolar protein 7, 27kDa</i>
NYREN18	<i>NEDD8 ultimate buster-1</i>
OO-COCI	oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I
OO-COCIII	oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III
PABP	<i>poly(A)-binding protein</i>
PAIP1	<i>poly(A) binding protein interacting protein 1</i>
PAIP2	<i>poly(A) binding protein interacting protein 2</i>
PARK7	<i>Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7</i>
PGD	<i>phosphogluconate dehydrogenase</i>
PGLS (3.1.1.31)	<i>6-phosphogluconolactonase</i>
pH	potencial de hidrogênio
phe	fenilalanina
PIVE	produção <i>in vitro</i> de embriões
POLR1E	<i>polymerase (RNA) I polypeptide E, 53kDa</i>
PRDX2	<i>peroxiredoxin 2</i>
PRDX6	<i>peroxiredoxin 6</i>
PRPP	<i>phosphoribosyl pyrophosphate</i>
PSEN1	<i>presenilin 1</i>

PTGR2	<i>prostaglandin reductase 2</i>
PTGS2	<i>cyclooxygenase 2</i>
PTPN2	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2</i>
PVP	polivinilpirrolidona
RALBP1	<i>ralA binding protein 1</i>
RIN	número de integridade do RNA
RMA	<i>Robust Multi-array Average</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNF8	<i>ring finger protein 8</i>
ROBLD3	<i>roadblock domain containing 3</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio
RP	<i>Rank Products</i>
RPL10A	<i>ribosomal protein L10a</i>
RPL13	<i>ribosomal protein L13</i>
RPL18	<i>ribosomal protein L18</i>
RPL26	<i>ribosomal protein L26</i>
RPL38	<i>ribosomal protein L38</i>
RPL7	<i>ribosomal protein L7</i>
RPL7L1	<i>ribosomal protein L7-like 1</i>
RPS3A	<i>ribosomal protein S3A</i>
rRNA	ácido ribonucleico ribossômico
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SEMA3A	<i>semaphorin 3A</i>
SEMA6A	<i>semaphorin 6A</i>
SEMA6D	<i>semaphorin 6D</i>
siRNA	pequeno ácido ribonucleico de interferência
SLC2A8	<i>solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 8</i>
SLC6A4	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4</i>
SQRDL	<i>sulfide quinone reductase-like (yeast)</i>
TALDO1 (2.2.1.2)	<i>transaldolase 1</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor-beta</i>
Thr	treonina
TIMM22	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)</i>

TKT (2.2.1.1) *transketolase*

TM2D3 *TM2 domain containing 3*

TMEM11 *transmembrane protein 11*

TNFAIP6 *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6*

TNFSF11/RANKL *tumour necrosis factor (ligand) superfamily, member 11*

tRNA *ácido ribonucleico transportador*

UCK2 *uridine-cytidine kinase 2*

UQCRFS1 *ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1*

ZNF304 *zinc finger protein 304*

LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

μg – micrograma

cm – centímetro

G – gauge

g - grama

g – medida da gravidade da Terra

M – molar

ml – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

°C – graus Celsius

rpm – rotações por minuto

U – unidade

ng – nanograma

nm – nanômetro

μl – microlitro

μm – micrometro

pg – picograma

SUMÁRIO

1. Introdução.....	29
2. Revisão Bibliográfica.....	32
2.1. Oogênese e foliculogênese.....	32
2.2. Complexo cumulus-oócito.....	36
2.3. Maturação oocitária.....	39
2.4. Metabolismo Energético.....	44
2.5. Expressão gênica em oócitos.....	46
3. Objetivos.....	51
3.1. Geral.....	51
3.2. Específico.....	51
4. Delineamento experimental.....	53
5. Material e Métodos.....	56
5.1. Coleta, seleção e maturação <i>in vitro</i> dos COCs.....	56
5.2. Denudação dos COCs e armazenamento do oócitos.....	57
5.3. Extração e purificação do RNA.....	57
5.4. Quantificação e avaliação da integridade do RNA.....	59
5.5. Amplificação, purificação e fragmentação do aRNA.....	61
5.6. Hibridização, lavagem e escaneamento dos <i>arrays</i>	62
5.7. Análise dos dados de transcriptoma.....	63
6. Resultados.....	65
6.1. Quantificação e integridade do RNA.....	65
6.2. Quantificação, integridade e fragmentação do aRNA.....	68
6.3. Hibridização do aRNA fragmentado e escaneamento dos <i>arrays</i>	71
6.4. Análise dos dados do transcriptoma.....	74
6.4.1. Normalização dos dados e identificação dos genes diferencialmente expressos.....	74
6.4.2. Análise funcional <i>in silico</i> dos DEGs.....	79
7. Discussão.....	98
7.1. Quinases e Fosfatases.....	98
7.2. Desenvolvimento complexo cumulus-oócito.....	99
7.3. Metabolismo energético.....	100
7.4. Retomada da meiose.....	104

7.5. Processamento do RNA.....	105
7.6. Tradução e processamento das proteínas.....	106
7.7. Apoptose.....	109
8. Conclusão.....	111
Referências Bibliográficas.....	113
Anexos.....	125

Introdução

1. Introdução

A busca por melhores resultados nas biotecnologias reprodutivas leva a um estudo dos mecanismos fisiológicos básicos dos gametas e embriões em estágios iniciais. Entender como funciona o desenvolvimento destes, quais os nutrientes que eles precisam para se desenvolver *in vitro* e quais as condições ambientais necessárias permitem maiores taxas de sucesso, que são refletidas comercialmente.

Uma das biotecnologias, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) envolve a maturação *in vitro* do oócito, a fertilização *in vitro* e o cultivo *in vitro* dos embriões. A busca pela melhoria dessa biotecnologia é constante, pois ela propicia a seleção e melhoramento genético do rebanho em um curto espaço de tempo, além de ser a base de outras biotecnologias, como a transferência nuclear e a sexagem dos embriões.

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, a taxa de produção de embriões após a PIVE permanece baixa, em torno de 40% (PONTES et al., 2009, 2011). Isso porque mesmo empregando uma seleção criteriosa aos gametas e usando meios de cultura mais específicos, muitos embriões não conseguem completar todas as clivagens, estagnando no quarto ciclo celular, processo conhecido como bloqueio embrionário (MEIRELLES et al., 2004).

Muitos são os fatores que influenciam na PIVE, entre eles, a qualidade do complexo cumulus-oócito (COC – do inglês *cumulus-oocyte complex*) que é submetido à maturação *in vitro*. Os COCs são selecionados visualmente e a qualidade morfológica é um indicativo da competência de desenvolvimento. COCs que apresentam mais de três camadas de células do cumulus compactas e ooplasma homogêneo apresentam uma maior taxa de produção de blastocistos, para diferentes touros, quando comparados com COCs que apresentam menos de duas camadas de células do cumulus, com parte da zona pelúcida exposta e ooplasma homogêneo ou heterogêneo (LEMES, 2010).

O oócito é a única célula, entre os 212 tipos celulares, capaz de gerar um indivíduo. Essa capacidade requer características únicas que permitem que a transcrição seja ativada durante o crescimento do oócito e que após esse crescimento, um sistema automático coordene a transição de um estágio tetraploide para um haploide durante a maturação e fertilização desse oócito, voltando a ser diploide alguns dias depois. Para todas essas transformações, todo o programa regulatório que requer a separação dos cromossomos, a progressão do ciclo celular, a resposta a entrada do espermatozoide e a ativação do genoma

embrionário deve estar armazenado no oócito antes de sua liberação do ovário *in vivo* ou antes da inibição da transcrição pela retomada da meiose quando o COC é retirado do ambiente inibitório do ovário *in vitro* (SIRARD, 2011).

Para que o desenvolvimento embrionário seja normal é preciso que haja um balanço entre a presença de mRNAs (ácido ribonucleico mensageiro) essenciais em quantidade suficiente e protegidos da degradação e a ausência de mRNAs inibitórios (SIRARD, 2011). Como os mRNAs armazenados no oócito são responsáveis pelo desenvolvimento embrionário, uma caracterização mais extensa do perfil de expressão gênica em oócitos competentes é necessária para maior conhecimento da rede de regulação dos genes responsáveis por esse efeito e/ou dos genes que são regulados em consequência de um estímulo externo ou interno.

Tendo em vista a heterogeneidade dos COCs recuperados de ovários obtidos em frigorífico e a relação entre oócito e células do cumulus nos resultados da PIVE, esse trabalho visa a identificação de fatores moleculares que possam explicar as melhores taxas de blastocistos obtidas por COCs com mais de três camadas de células do cumulus compactas e ooplasma homogêneo quando comparados com COCs com menos de duas camadas de células do cumulus, com parte da zona pelúcida exposta e ooplasma homogêneo ou heterogêneo e a busca por marcadores moleculares da expressão gênica anormal em oócitos com competência reduzida.

Revisão

Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Oogênese e foliculogênese

As células germinativas são especializadas em transmitir o genoma para gerações futuras. Nas espécies animais, os gametas haploides, produzidos pela divisão meiótica, se unem na fecundação e originam um embrião diploide. Em ambos os sexos, interações entre os gametas em desenvolvimento e as células somáticas ao seu entorno são cruciais para a fertilidade. A importância dessa comunicação na espermatogênese é evidenciada pela participação de junções *gap* na proliferação e diferenciação da linhagem germinativa masculina (POINTIS et al., 2005). Da mesma forma, em fêmeas, o complexo diálogo intercelular regula a oogênese, atuando na maturação oocitária (SELA-ABRAMOVICH et al., 2006) e formação do corpo lúteo (REYNOLDS; REDMER, 1999).

A oogênese e a foliculogênese são processos interligados que ocorrem simultaneamente, levando ao desenvolvimento da célula germinativa, o oócito, e ao desenvolvimento do folículo ovariano (Figura 01).

Figura 01. Esquema representando os processos de oogênese e foliculogênese relacionados.

No início da vida fetal, células germinativas, ainda indiferenciadas, migram da região do saco vitelínico para a região das gônadas indiferenciadas, no sulco genital do feto (Figura 02). O epitélio dessas gônadas se prolifera em direção ao tecido mesenquimatoso conjuntivo frouxo acima dele, formando os cordões sexuais. Nos fetos femininos, esses cordões se degeneram e as células germinativas se dispõem próximas à superfície externa da gônada. Posteriormente, novos cordões sexuais são formados, permanecendo próximos à superfície, e sendo, portanto, denominados cordões sexuais corticais. As células dos cordões sexuais se diferenciam em células da granulosa, enquanto as células da teca são formadas a partir das células mesenquimatosas do ovário (GILBERT, 2003).

Figura 02. As células germinativas primordiais, em mamíferos, migram da região do saco vitelínico (A) para a região dos sulcos genitais, onde as gônadas se formarão (B) (imagem de GILBERT, 1997).

Essas células germinativas se proliferam por meio de mitoses. Enquanto algumas células germinativas continuam a se proliferar, outras se diferenciam em oogônias. Essas iniciam a meiose, parando o ciclo celular no diplóteno da prófase I, estágio chamado de vesícula germinativa, passando a ser chamadas de oócitos primários. Ao mesmo tempo, esses oócitos são circundados por células somáticas da gônada em desenvolvimento formando o folículo primordial. Nesse estágio, o folículo possui $34,6 \pm 3,7 \mu\text{m}$ de diâmetro, enquanto o oócito sozinho possui $27,9 \pm 3,3 \mu\text{m}$ (média $\pm$ desvio padrão) (HYTTEL, 2011). Os folículos primordiais representam o número máximo de folículos possíveis no organismo, com perdas subsequentes que ocorrem durante o desenvolvimento, nascimento e puberdade até que essa reserva acabe totalmente na menopausa (MATZUK; LAMB, 2008).

O desenvolvimento do folículo, desde a sua formação até a ovulação depende de fatores produzidos por esses dois tipos celulares. A importância relativa do oócito é maior nos estágios iniciais do desenvolvimento folicular, enquanto que a importância das células somáticas e das gonadotrofinas é maior nos estágios finais de desenvolvimento (BINELLI; MURPHY, 2010).

Com a puberdade, as células somáticas achatadas do folículo primordial se tornam cuboides, caracterizando o folículo primário, no qual o núcleo é gradualmente ativado, sendo que a ativação completa da transcrição no oócito ocorre no folículo secundário, sintetizando rRNA (ácido ribonucleico ribossômico) e mRNA (HYTTEL et al., 1997). A atividade transcricional do genoma do oócito é modulada por meio de trocas entre o oócito e as células somáticas durante o desenvolvimento folicular (LI et al., 2000). Nesse estágio, é possível observar pequenas porções de zona pelúcida entre as células da granulosa e o oócito, o qual

possui $31,6 \pm 4,3 \mu\text{m}$ em diâmetro, enquanto o folículo apresenta $46,1 \pm 6,1 \mu\text{m}$ (média $\pm$ desvio padrão) (HYTTEL, 2011).

As células somáticas se proliferam, formando no mínimo duas camadas em torno do oócito. A formação da zona pelúcida em torno do oócito pela deposição de mucopolissacarídeos continua, acompanhada da emissão de prolongamentos pelas células da granulosa que atravessam a zona pelúcida e formam junções *gap* com o oócito, formando o folículo secundário (HYTTEL, 2011; HYTTEL et al., 1997). A zona pelúcida possui os sítios de ligação ao espermatozoide, é responsável pelo bloqueio a polispermia, previne a dispersão de blastômeros durante a fase pré-implantacional, facilita a passagem do embrião através do oviduto e protege o embrião durante os primeiros estágios de desenvolvimento (SANTOS et al., 2008). O folículo secundário possui $101,7 \pm 41,8 \mu\text{m}$ de diâmetro e o oócito, sozinho, apresenta $45,6 \pm 14,0 \mu\text{m}$ (média $\pm$ desvio padrão) (HYTTEL, 2011).

No folículo terciário, as células da granulosa continuam a proliferar, formando de duas a sete camadas. Estas se dividem em dois grupos: as células da granulosa murais, que são células epiteliais pseudoestratificadas em contato com a membrana basal do folículo; e as células do cumulus, que emitem prolongamentos que atravessam a zona pelúcida e formam junções *gap* com o oócito e com as células murais (FAIR et al., 1997). Forma-se então uma cavidade preenchida por líquido folicular, o antro. Esse líquido é originário do plasma periférico por transudação através da membrana basal folicular. Nesse estágio, o oócito está completando seu crescimento, possuindo em torno de 110 a $120 \mu\text{m}$ (HYTTEL, 2011), enquanto o folículo continua a se desenvolver devido ao aumento da quantidade de fluido folicular (ARLOTTO et al., 1996).

Ao final da fase de crescimento do oócito, ocorre uma inativação da maquinaria transcricional, com isso, a transcrição de mRNA e rRNA é totalmente inativada (HYTTEL et al., 1997), interrompendo a produção de novos transcritos. Nessa fase, o oócito já possui a capacidade de reassumir a meiose.

Os folículos crescem até atingirem em torno de oito a nove milímetros, enquanto o oócito permanece com 110 a $120 \mu\text{m}$. Nesse momento, em resposta ao pico do hormônio luteinizante (LH), ocorre a divergência folicular, processo pelo qual um dos folículos recrutados continua a se desenvolver, enquanto os demais entram em atresia, sendo que o folículo dominante pode atingir de 15 a 20mm (SAVIO et al., 1988). O oócito desse folículo selecionado reassume a meiose, progredindo pelos estágios de metáfase I, anáfase I, telófase I, prófase II, estagnando novamente em metáfase II, passando a ser chamado de oócito

secundário. Ao fim da telófase I, ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar, que contém pouca quantidade de citoplasma, enquanto o oócito secundário recebe quase a totalidade dos constituintes citoplasmáticos (GILBERT, 2003).

In vivo, com a ovulação do folículo dominante, em torno de 24 horas após o pico do LH, o COC é liberado. A segunda meiose só é concretizada se o oócito secundário for fertilizado. Com a penetração do espermatozoide, o gameta feminino avança pelas fases de anáfase II e telófase II, expulsando o segundo corpúsculo polar, que igualmente ao primeiro, possui uma pequena quantidade de citoplasma. Dessa forma, a meiose oogênica conserva o volume citoplasmático em uma única célula (GILBERT, 2003).

A capacidade de desenvolvimento em oócitos de mamíferos é dependente de altas taxas de RNA (ácido ribonucleico) e síntese de proteína, processos de *imprinting*, biogênese de organelas e armazenamento de ribossomos, mRNA e proteínas no ooplasma do oócito durante sua fase de crescimento, anterior a retomada da meiose. Assim como, uma capacidade do oócito de utilizar toda essa informação estocada de uma forma muito bem orquestrada durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário inicial (EICHENLAUB-RITTER; PESCHKE, 2002).

2.2. Complexo cumulus-oócito

Os oócitos são nutridos por células somáticas intimamente associadas nos folículos ovarianos, que regulam o crescimento do oócito, provendo os nutrientes que a célula germinativa não consegue obter por falta de sistemas de transporte e que controlam a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos quando esses são selecionados para a ovulação (EPPIG, 1991, 1996). A comunicação entre as células do cumulus e o oócito é estabelecida pela sinalização parácrina e pelas extremidades dos processos celulares das células do cumulus, que penetram no córtex e fazem junções intracelulares do tipo *gap* com o oolema. Através destas conexões, ocorre a transferência de moléculas de pequeno peso molecular, tais como: metabólitos, íons, aminoácidos e nucleotídeos, assim como pequenas moléculas reguladoras, como o cAMP (adenosina monofosfato cíclico) e as purinas (SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON, 2003) (Figura 03).

Figura 03. Comunicação bidirecional entre o oócito e as células do cumulus, essencial para os processos de oogênese e foliculogênese. A comunicação ocorre via sinalização parácrina (seta rosa) e pela troca por meio das junções *gap* (seta azul) (imagem adaptada de GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).

As junções *gap* são formadas por conexinas, as quais apresentam uma expressão célula-específica (GERSHON; PLAKS; DEKEL, 2008). A conexina 37 está interligando as células do cumulus ao oócito (SIMON et al., 1997), enquanto a conexina 43 está presente entre as células do cumulus, sendo que uma expressão adequada de conexina 43 é essencial para a maturação oocitária em bovinos (VOZZI et al., 2001).

Utilizando-se o modelo bovino, foi demonstrado que o oócito é um importante regulador do fenótipo e sobrevivência das células do cumulus, com efeitos acentuados nos processos de proliferação e morte celular (HUSSEIN et al., 2005; LI et al., 2000). Por sua vez, as células do cumulus estimulam a síntese de glutatona nos oócitos bovinos (DE MATOS; FURNUS; MOSES, 1997), previnem o dano induzido por estresse oxidativo durante a maturação *in vitro* (TATEMOTO; SAKURAI; MUTO, 2000) e contribuem para a maturação citoplasmática e manutenção do bloqueio meiótico (AKTAS; LEIBFRIED-RUTLEDGE; FIRST, 2003).

Dentre os principais fatores que são liberados pelo oócito e atuam sobre as células do cumulus, através da sinalização parácrina, estão o GDF9 (*growth differentiation factor 9*) e o BMP15 (*bone morphogenetic protein 15*), pertencentes à superfamília TGF β (*transforming growth factor-beta*) (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004; GILCHRIST et al., 2006). O GDF9 é sintetizado no oócito em todos os estágios da foliculogênese, desde o folículo primário. Ele induz a expansão das células do cumulus por meio da expressão gênica de HAS2 (*hyaluronic acid synthase 2*), PTGS2 (*cyclooxygenase 2*) e GREM1 (*gremlin*) (CALDER et al., 2001; ELVIN et al., 1999; PANGAS; JORGEZ; MATZUK, 2004), fatores

que foram associados à competência de desenvolvimento em oócitos humanos (MCKENZIE et al., 2004). BMP15 previne a apoptose das células do cumulus mantendo um gradiente local de fatores anti-apoptóticos (HUSSEIN et al., 2005). Tanto GDF9 como BMP15 melhoram a competência de desenvolvimento do oócito e evidenciam a importância da regulação dos fatores secretados pelo oócito no microambiente do COC (HUSSEIN; THOMPSON; GILCHRIST, 2006).

Dentre os fatores secretados pelas células somáticas que regulam a célula gamética estão o *kit ligand*, fator parácrino que promove o crescimento do oócito (PACKER et al., 1994), o MAS (*meiosis activating sterols*) que promove no oócito a retomada da meiose e os peptídeos semelhantes ao EGF (*epidermal growth factor*) (BINELLI; MURPHY, 2010). Um estudo mostrou que a superexpressão de GDF9 no oócito foi concomitante com a superexpressão de seu receptor BMP2 (*bone morphogenetic protein receptor 2*) em células do cumulus, demonstrando um processo típico de intercomunicação (ASSOU et al., 2006).

Foi demonstrado que a proximidade entre os gametas feminino e masculino e a monocamada de células do cumulus já é suficiente para restaurar parcialmente a taxa de fertilização de oócitos desnudos (sem células do cumulus). Entretanto, a completa restauração não foi observada, mostrando que a monocamada não pode substituir as junções *gap*. O contato direto entre o oócito e as células do cumulus deve ser necessário durante o período final da maturação e na fertilização de modo a fornecer ao oócito nutrientes de uma maneira muito bem orquestrada (TANGHE et al., 2003). Isso foi corroborado por outro experimento que mostrou que o contato físico entre as células do cumulus e o oócito é essencial, já que oócitos desnudos cultivados em meio de maturação contendo células do cumulus não apresentaram um perfil alterado de maturação, fertilização e desenvolvimento quando comparados com oócitos desnudos cultivados em meio de maturação sem as células do cumulus (HASHIMOTO et al., 1998).

Desta forma, em bovinos, ratos, suínos, ovinos e humanos, a ausência das células do cumulus pode afetar negativamente qualquer uma das fases do desenvolvimento: maturação, fertilização ou desenvolvimento embrionário pré-implantacional (CECCONI; D'AURIZIO; COLONNA, 1996; GOUD et al., 1998; HAWK; WALL, 1994; KA et al., 1997; STAIGMILLER; MOOR, 1984; ZHANG et al., 1995).

A comunicação existente entre as células do cumulus e o oócito é base de uma das classificações visuais de COCs coletados para a PIVE. Esses COCs são aspirados de folículos ovarianos com tamanho entre dois e oito milímetros, os quais possuem oócitos com

aproximadamente o mesmo diâmetro, em torno de 100 a 120µm (ARLOTTO et al., 1996; HYTTEL, 2011).

Após serem retirados dos ovários, os COCs são selecionados visualmente, analisando a quantidade de células do cumulus e a aparência do ooplasma. Eles podem ser classificados em quatro categorias, de acordo com a morfologia (adaptado de LEIBFRIED; FIRST, 1979). O COC de qualidade morfológica grau I (COCI) apresenta células do cumulus compactas, contendo mais de três camadas de células e ooplasma homogêneo. Grau II (COCII) apresenta de duas a três camadas de células do cumulus compactas e ooplasma homogêneo. Grau III (COCIII) possui menos de duas camadas de células do cumulus, com parte da zona pelúcida exposta e ooplasma homogêneo ou heterogêneo. O grau IV (COCIV) possui poucas células ou nenhuma célula do cumulus ao redor da zona pelúcida, citoplasma com muitas granulações, ou ainda com células do cumulus em estado apoptótico sendo, portanto, inviável de se desenvolver.

Um estudo que avaliou a penetração das terminações dos processos celulares das células do cumulus no ooplasma mostrou que essa varia de acordo com a categoria do COC, avaliado morfológicamente. COCs da categoria 1 possuem a maioria das terminações penetrando o córtex, enquanto nos COCs da categoria 4, a maioria das terminações não penetra. Nas categorias intermediárias, as duas formas de terminações ocorrem. Isso indica que COCs de categoria 1 possuem uma maior interação entre oócito e células do cumulus (DE LOOS et al., 1989).

Sob o ponto de vista funcional, a qualidade do oócito pode coincidir com sua competência de desenvolvimento. Foram descritos cinco níveis de competência de oócitos, isto é, a habilidade de continuar a meiose, de clivar após a fertilização, desenvolver até o estágio de blastocisto, induzir e trazer a gestação a termo e desenvolver o conceito em boa saúde. Estas habilidades podem originar de eventos separados e o sucesso nos primeiros eventos não garante o sucesso nos subsequentes (SIRARD et al., 2006).

2.3. Maturação oocitária

O crescimento do oócito ocorre juntamente com o desenvolvimento folicular até o folículo terciário, quando o oócito alcança em torno de 100-120µm. Nesse momento, toda a

maquinaria transcricional é inativada e o oócito deve ter armazenado todos os mRNAs necessários para a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário inicial, além de ser capaz de reassumir a meiose (Figura 04).

Figura 04. Esquema ilustrando os processos de transcrição, síntese de proteína e ultraestrutura do nucléolo durante o crescimento, maturação e fertilização do oócito e o desenvolvimento inicial em bovinos. Parte superior: mRNA materno (laranja) é sintetizado durante o crescimento do oócito, alguns mRNA são traduzidos imediatamente em proteínas (azul), enquanto outros são estocadas para a tradução posterior (rosa). Uma pequena ativação da transcrição de mRNA embrionários ocorre a partir do zigoto até sua ativação completa no estágio de oito células em bovinos. Parte mediana: rRNA materno (laranja) é sintetizado durante o crescimento do oócito, resultando na produção de ribossomos (azul). A síntese de rRNA embrionário é iniciada juntamente com a ativação completa da síntese de mRNA embrionário, contribuindo para a produção de ribossomos. Parte inferior: durante o crescimento oocitário, o nucléolo é ativado no folículo secundário sendo inativado ao fim do crescimento do oócito. A ativação do nucléolo no embrião ocorre em paralelo com a maior ativação da síntese de mRNA embrionário (imagem adaptada de HYTTEL, 2011).

O oócito crescido apresenta um espaço perivitelínico completamente formado, porém, as células dos cumulus continuam conectadas por longas projeções. As mitocôndrias e o complexo de Golgi estão localizados na periferia, juntamente com numerosos grupos de grânulos corticais, enquanto as gotículas de lipídeos estão distribuídas pelo ooplasma (HYTTEL, 2011).

Com o crescimento do folículo terciário, anterior ao surgimento do pico do LH, ocorrem pequenas modificações citoplasmáticas no oócito. O tamanho do complexo de Golgi diminui, o espaço perivitelínico aumenta, ocorre um aumento das gotículas de lipídeos e os grupos de grânulos corticais se deslocam para regiões mais superficiais enquanto alguns grânulos solitários migram para regiões ao longo do oolema. Algumas células do cumulus apresentam longos prolongamentos enquanto outras retraem seus prolongamentos para uma localização mais superficial no oolema (HYTTEL, 2011).

Assim que o pico do LH surge, inicia-se a maturação do oócito, a qual envolve a progressão da meiose e uma série de mudanças ultraestruturais e moleculares no ooplasma. As mudanças ultraestruturais envolvem uma reorganização das organelas e do citoesqueleto da célula gamética, sendo que o posicionamento das organelas é dependente das necessidades da célula em cada estágio de desenvolvimento (FERREIRA et al., 2009).

A continuidade da meiose envolve uma cascata de eventos que permite a progressão no ciclo celular, deixando o estágio de diplóteno da prófase I. Com o pico do LH, o fator promotor da maturação (MPF – do inglês *maturing promoting factor*), um complexo proteico formado pela associação da ciclina B1 com CDK1 (*cyclin-dependant kinase*) é ativado, reativando a maquinaria do ciclo celular, o que leva a extrusão do primeiro corpúsculo polar. O ciclo celular é novamente estagnado após a formação da segunda metáfase, sob a influência do fator citostático (CSF – do inglês *cytostatic factor*) (SIRARD et al., 2006). A mesma progressão ocorre quando os COCs são retirados de seu ambiente folicular inibitório, levando a uma retomada da meiose precoce, sendo que nem sempre os oócitos já completaram seu crescimento e estão preparados para a maturação oocitária, realizada *in vitro*.

Ao mesmo tempo em que a meiose é reassumida, ocorre um desacoplamento gradual das terminações das células do cumulus do oócito, o complexo de Golgi é reduzido, os ribossomos são redistribuídos no ooplasma e as mitocôndrias, produtoras de adenosina trifosfato (ATP), deixam a periferia e passam a se localizar juntamente às gotículas de lipídeos, e esses aglomerados se distribuem no ooplasma. Durante as últimas horas de

maturação, os aglomerados de mitocôndria e lipídeos se deslocam para a região central, área de alto consumo energético, enquanto os grânulos corticais, inicialmente distribuídos no ooplasma, deslocam-se para a periferia do oócito. O retículo endoplasmático rugoso forma grupos que se posicionam na região cortical (FERREIRA et al., 2009; HYTTEL, 2011; HYTTEL et al., 1997).

A maturação molecular envolve a estocagem e processamento dos mRNAs expressos por determinados genes, que serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos. A maior parte dos mRNAs sintetizados no oócito em crescimento não é utilizada para a tradução imediata, na verdade, eles estão dormentes ou “mascarados” e estocados para a tradução futura. Todo o mRNA estocado é ativado em diferentes momentos, dependendo da necessidade da célula durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário inicial (BACHVAROVA, 1992). O padrão de expressão é determinado pela sinalização de fatores de crescimento e seus receptores, hormônios e macromoléculas transmitidos ao oócito pelo seu microambiente, por meio de contato célula-célula ou pela transferência direta de moléculas das células somáticas para o oócito pelas junções *gap* (EICHENLAUB-RITTER; PESCHKE, 2002).

Os mRNAs produzidos são estocados de uma forma estável, porém transitoriamente inativos, evitando a degradação e permitindo que estes fiquem estocados até o momento certo de sua utilização. No geral, mRNA estocados possuem uma cauda poli-A menor, entre 15 e 90 adeninas e a ativação desses mRNA é acompanhada por uma poliadenilação citoplasmática, aumentando a cauda poli-A para 150 ou mais adeninas (BACHVAROVA, 1992).

Com a maturação oocitária, ocorre uma onda de deadenilação dos mRNA levando a uma estocagem destes. O processo de deadenilação citoplasmática dos mRNAs é um mecanismo conhecido de controle da expressão gênica na ausência da maquinaria transcricional (SIRARD, 2011). Alguns transcritos específicos sofrem poliadenilação após essa onda de deadenilação (TOMEK; TORNER; KANITZ, 2002), dependendo da sua sequência 3'UTR (*untranslated region*). Já outros mRNA não chegam a sofrer a deadenilação, como é o caso da ciclina B1, uma proteína que juntamente com a CDK1 forma o MPF, um complexo essencial para a retomada da meiose (LEQUARRE et al., 2004) (Figura 05).

Figura 05. Visão geral de alguns aspectos da regulação da expressão em oócitos. Coluna da direita, parte superior: durante o crescimento do oócito, os rRNA são transcritos, traduzidos e estocados na célula. Coluna da esquerda: os mRNA são transcritos, poliadenilados e traduzidos durante o crescimento do oócito. Coluna direita, parte mediana: com a inibição da maquinaria transcripcional, durante a maturação oocitária, os mRNA passam por processos de deadenilação e são estocados para utilização futura. Parte inferior: de acordo com as necessidades da célula, os mRNA estocados são recrutados e traduzidos (imagem adaptada de EICHENLAUB-RITTER; PESCHKE, 2002).

Dessa forma, todo o mRNA e rRNA necessários para a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário até o estágio de oito células, em bovinos, devem ser produzidos durante o crescimento oocitário, já que, após a retomada da meiose, não ocorre mais transcrição. Uma pequena ativação da transcrição de mRNA embrionários ocorre a partir do zigoto até sua ativação completa no estágio de oito células em bovinos (Figura 04).

A transição materno-embrionária é caracterizada por uma diminuição nos mRNAs de origem materna e um aumento nos mRNAs de origem embrionária. Além disso, para que o

desenvolvimento embrionário seja normal é preciso que haja um balanço entre a presença de mRNAs essenciais em quantidade suficiente e protegidos da degradação e a ausência de mRNAs inibitórios (SIRARD, 2011). A inability em manter o balanço entre os fatores de sobrevivência e morte pode levar ao início de uma cascata de apoptose, levando ao bloqueio embrionário e morte do embrião (MEIRELLES et al., 2004).

2.4. Metabolismo Energético

Para que o oócito progrida de forma adequada pela maturação oocitária, ele necessita de uma enorme quantidade de energia de vários substratos, incluindo glicose, aminoácidos e lipídeos (SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON, 2003). Para que essa energia esteja disponível para uso, várias organelas devem estar presentes, permitindo que as vias metabólicas estejam ativas. As mitocôndrias são importantes em várias funções celulares, incluindo obtenção de energia, regulação da apoptose e homeostase do Ca^{2+} . A mitocôndria fornece ATP para as células por meio da oxidação fosforilativa. Durante esse processo, elétrons de alta energia derivados da oxidação são carregados pelo NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide*) + H^+ e FADH_2 (*flavin adenine dinucleotide*) para a membrana interna da mitocôndria e transferidos através de uma cadeia de transporte de elétrons que converte elétron em ATP. Disfunções na mitocôndria já foram associadas com infertilidade (RAMALHO-SANTOS et al., 2009).

Essa organela também participa de vias apoptóticas. A mitocôndria consome aproximadamente 85% do oxigênio da célula, o que faz dessa organela a maior produtora de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). Produção excessiva de ROS pode causar dano ao DNA, oxidação de proteínas e lipídeos ou liberação do citocromo B no espaço extramitocondrial. A liberação de citocromo B no citoplasma leva a uma série de eventos que ativam enzimas proteolíticas, incluindo caspases 3, 6 e 7 que regulam a morte celular programada. Além disso, a célula depende da regulação do balanço redox na mitocôndria para manter sua viabilidade. Foi demonstrado que a glutathione (GSH) e as enzimas antioxidantes, incluindo GPX1 e GPX4 exercem funções importantes na manutenção do balanço redox da mitocôndria. Essas enzimas catalisam a redução do

peróxido de hidrogênio e peróxido lipídico em água com GSH atuando como doador de elétron (OTT et al., 2007).

O metabolismo de glicose é crucial para a maturação oocitária e desenvolvimento inicial em várias espécies de mamíferos (SUTTON-MCDOWALL; GILCHRIST; THOMPSON, 2010). A obtenção de glicose pelo oócito ocorre por meio de transportadores passivos de glicose (GLUT), entretanto, as células do cumulus possuem GLUT com mais afinidade pelo substrato e alta atividade da fosfofrutoquinase, que converte glicose em substratos prontos para serem utilizados, como piruvato e NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) que podem ser passados ao oócito (AUGUSTIN et al., 2001; SUTTON-MCDOWALL; GILCHRIST; THOMPSON, 2010).

O COC metaboliza glicose por meio de quatro diferentes vias: glicólise, via das pentoses-fosfato, hexosaminas e via do polioli, sendo que as duas primeiras vias interferem na maturação nuclear e citoplasmática. Na glicólise, a glicose é utilizada para produção de ATP, piruvato e lactato. Piruvato e lactato são transferidos ao oócito e metabolizados pela via dos ácidos tricarboxílicos seguida pela fosforilação oxidativa na mitocôndria, que produz ATP, essencial para o desenvolvimento do oócito. A via das pentoses-fosfato não produz ATP, mas gera NADPH que é essencial para a integridade do citoplasma e produção de GSH. Além disso, a via das pentoses-fosfato produz ribose-5-fosfato que é crucial para a síntese de DNA e RNA (SUTTON-MCDOWALL; GILCHRIST; THOMPSON, 2010). A inibição da via das pentoses-fosfato diminui a glicólise e a produção de GSH que compromete o potencial de desenvolvimento em suínos (HERRICK; BRAD; KRISHER, 2006). Além disso, oócitos possuem maior quantidade de glicose-6-fosfato desidrogenase que fosfofrutoquinase sugerindo que o gameta metaboliza preferencialmente glicose pela via das pentoses-fosfato do que pela glicólise (CETICA et al., 2002).

Os aminoácidos são substratos para a síntese de proteína e produção de energia. O oócito utiliza aminoácidos por meio das células do cumulus, que contém altas concentrações de duas enzimas essenciais para o metabolismo de aminoácido, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. Isso sugere que as células somáticas fornecem ao oócito aminoácidos e substratos oxidáveis (CETICA et al., 2003). Os aminoácidos cisteína, prolina e glutamina são precursores do GSH (SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON, 2003). A glutamina é um dos aminoácidos mais estudados, e além de estar envolvido na síntese de GSH, também está envolvido na tradução de proteínas e na gliconeogênese. Sugere-se que

esse aminoácido é essencial para promover o final da maturação nuclear em bovinos (RIEGER; LOSKUTOFF, 1994).

2.5. Expressão gênica em oócitos

Os estudos pioneiros que tentaram entender a distribuição espacial dos ácidos nucléicos em oócitos bovinos não maturados foram iniciados por HENRIET e colaboradores (1980). Em 1993, OLSZAŃSKA e BORGUL iniciaram os estudos com RNA quando quantificaram em $0,98 \pm 0,18 \text{ ng}$ o conteúdo dessa molécula nos oócitos bovinos não maturados. Estudando oócitos maturados *in vitro*, o conteúdo de RNA total foi estimado em $2,4 \pm 0,3 \text{ ng}$ por oócito (BILODEAU-GOESEELS; SCHULTZ, 1997).

Um estudo mais recente comparou a quantidade de RNA presente em oócitos bovinos não maturados e maturados, tanto de RNA total, quanto de rRNA e de mRNA. Foi demonstrado que a quantidade total de RNA de um oócito antes da maturação é de $1,9 \pm 0,2 \text{ ng}$ e $2,0 \pm 0,15 \text{ ng}$ após a maturação, ou seja, não houve nenhuma mudança significativa na quantidade total de RNA durante a maturação. O mesmo ocorreu para o rRNA, não evidenciando degradação deste durante a maturação. Ao analisar a quantidade de RNA com cauda poli-A, houve uma queda significativa ao longo da maturação, com valores de $53,0 \pm 4,0 \text{ pg}$ de RNA por oócito antes da maturação e $24,5 \pm 2,5 \text{ pg}$ após 24 horas de maturação (LEQUARRE et al., 2004). Ao comparar o conteúdo de poli-A RNA em COCs imaturos de diferentes qualidades morfológicas, foi possível verificar que os COCs com menos camadas de células do cumulus e ooplasma heterogêneo, possuem menos mRNA quando comparado com os COCs com mais camadas de células do cumulus e ooplasma homogêneo (BIASE et al., 2008).

Na última década, estudos da expressão gênica em larga escala têm caracterizado os transcritos presentes em oócitos (DALBIES-TRAN; MERMILLODD, 2003; KOCABAS et al., 2006; MISIRLIOGLU et al., 2006; ZENG; BALDWIN; SCHULTZ, 2004), e alguns desses transcritos têm sido associados à competência de desenvolvimento dos mesmos (DONNISON; PFEFFER, 2004; FAIR et al., 2004; MOUROT et al., 2006). Os resultados sustentam a hipótese de que mRNA específicos ou proteínas produzidas durante a oogênese sejam responsáveis pela competência de desenvolvimento do oócito (SIRARD et al., 2006).

Oócitos de fêmeas bovinas pré-púberes representam um modelo de baixa eficiência do oócito em desenvolver um blastocisto, pois quando comparados com oócitos de vacas adultas possuem mesma taxa de clivagem, mas menor taxa de desenvolvimento de blastocistos (REVEL et al., 1995). As diferenças existentes entre os oócitos de fêmeas pré-púberes e adultas já foram extensamente caracterizadas e podem ser atribuídas a alterações no microambiente folicular em que o oócito se localiza (KHATIR et al., 1996), diferenças nas atividades da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), MPF e IP3Rs (*inositol 1,4,5-trisphosphate receptors*) levando a uma falha ou incapacidade de completar a maturação ooplasmática (SALAMONE et al., 2001), metabolismo de glutamina, migração e redistribuição das organelas no ooplasma durante a maturação atrasada (DAMIANI et al., 1996; O'BRIEN et al., 1996) e um número mais baixo de comunicações cumulus-oócito dos oócitos pré-púberes comparados aos adultos (LEDDA et al., 2001). A abundância dos transcritos dos genes CTSB (*cathepsin B*), CTSS (*cathepsin S*) e CTSZ (*cathepsin Z*) está associada negativamente com a competência do oócito de novilhas pré-púberes (BETTEGOWDA et al., 2008). Outro estudo mostrou, ao analisar a classificação funcional, que os oócitos de fêmeas adultas tinham mais genes trabalhando para a regulação de secreção hormonal, biossíntese de moléculas e funcionando como ligantes de proteínas. Já entre os genes mais representados em oócitos de fêmeas pré-púberes, estavam os associados à localização intracelular (PATEL et al., 2007).

Durante a maturação oocitária, o oócito sofre modificações no seu conteúdo de ácidos nucléicos, devido à utilização de algumas moléculas e degradação de outras. Buscando quais eram essas diferenças, estudos compararam oócitos bovinos imaturos (vesícula germinativa) e maturados *in vitro* (metáfase II) (DALBIES-TRAN; MERMILLODD, 2003; FAIR et al., 2007). O mesmo foi feito para camundongos e para humanos. Em camundongos, a análise mostrou que genes associados a replicação do DNA, metabolismo de aminoácido, expressão de receptores acoplados a proteína-G e moléculas sinalizadoras são mais expressos em oócitos maturados (CUI et al., 2007). Em humanos, o estudo demonstrou que ocorre uma queda progressiva no número de genes expressos durante a maturação nuclear oocitária, com o menor número de genes sendo expresso em metáfase II, comparando com os estágios de vesícula germinativa e metáfase I (ASSOU et al., 2006).

Ainda comparando oócitos em vesícula germinativa e em metáfase II, transcritos envolvendo fosforilação oxidativa (produção de energia), como NADH-ubiquinona oxidoredutases e citocromo c oxidases, e transcritos envolvendo síntese de proteínas, como

componentes das subunidades ribossomais citoplasmáticas, são degradados durante a maturação, enquanto outros transcritos, necessários para manter o oócito estagnado em metáfase II, como as proteínas quinases, são estáveis (SU et al., 2007).

Outro estudo analisou o transcriptoma de oócitos em metáfase II após maturação *in vivo* e *in vitro*. Eles identificaram genes diferencialmente expressos durante a maturação, sendo que esses genes estavam relacionados com a regulação do ciclo celular, metabolismo de glicose, produção de ATP, osmorregulação e apoptose induzida por estresse, indicando padrões de transcrição distintos que refletiam a resposta do oócito ao seu ambiente (KATZ-JAFFE et al., 2009).

Buscando uma abordagem menos invasiva da competência do oócito, alguns estudos foram feitos analisando a expressão gênica das células do cumulus. Sabendo que a troca bidirecional existente entre as células do cumulus e o oócito é crucial para a total competência dos dois tipos celulares em suportar a embriogênese, espera-se que as mensagens armazenadas nas células do cumulus venham a ser indicadores indiretos da competência de desenvolvimento do oócito, por meio de um método não invasivo (TESFAYE et al., 2009). Nessa linha de raciocínio, foi verificado o perfil de expressão gênica das células do cumulus de oócitos em metáfase II, encontrando uma superexpressão de genes relacionados a sinalização célula-célula, incluindo TNFSF11/RANKL (*tumour necrosis factor (ligand) superfamily, member 11*), SEMA3A (*semaphorin 3A*), SEMA6A (*semaphorin 6A*) e SEMA6D (*semaphorin 6D*) e CD200 (*CD200 antigen*) (ASSOU et al., 2006).

O perfil de expressão das células do cumulus provenientes de COCs maturados *in vivo* e *in vitro* foi comparado. Eles encontraram maior quantidade de transcritos associados com a expansão do cumulus (TNFAIP6 - *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6*) e com a regulação na maturação oocitária (INHBA - *inhibin, beta A* e FST - *follicle-stimulating hormone receptor*) nas células maturadas *in vivo*, enquanto que nas células maturadas *in vitro* foi verificada uma maior quantidade de genes envolvidos na resposta ao estresse (HSPA5 - *heat shock 70kDa protein 5* e HSP90AB1 - *heat shock 90 kDa protein 1β*) (TESFAYE et al., 2009). Alguns genes das células do cumulus foram identificados como potenciais marcadores indiretos da competência do oócito, tais como genes que estão associados ao GDF9 (HAS2 - *hyaluronan synthase 2*, TNFAIP6, PTGS2 e GREM1), INHBA, EGFR (*epidermal growth factor receptor*), BTC (*betacellulin*) e a molécula CD44 (*CD44 antigen*).

Os esforços para estabelecer modelos que permitam estudar o transcriptoma associado à competência do oócito são efetivos na identificação de genes possivelmente ligados a essa característica. Isso propicia um melhor entendimento da biologia e dos eventos moleculares que ocorrem no oócito, bem como seus potenciais marcadores de competência. Sabendo-se que existem diferenças entre os COCs quanto à sua morfologia, será que também existem diferenças quanto ao conteúdo de ácidos nucleicos dos oócitos provenientes desses COCs.

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Geral

Tendo em vista a heterogeneidade dos COCs recuperados de ovários obtidos em frigorífico e a relação entre oócito e células do cumulus nos resultados da PIVE, esse trabalho visa a identificação de fatores moleculares que possam explicar as melhores taxas de blastocistos obtidas por COCs com mais de três camadas de células do cumulus compactas e ooplasma homogêneo quando comparados com COCs com menos de duas camadas de células do cumulus, com parte da zona pelúcida exposta e ooplasma homogêneo ou heterogêneo.

3.2. Específico

Estabelecer um perfil de expressão gênica global de oócitos bovinos de diferentes qualidades morfológicas, após a maturação *in vitro*, por meio da tecnologia de *microarray*.

Encontrar genes candidatos que indiquem a competência reduzida de oócitos com menos de duas camadas de células do cumulus, com parte da zona pelúcida exposta e ooplasma homogêneo ou heterogêneo, oferecendo informações adicionais sobre o evento da maturação oocitária *in vitro*.

Delineamento experimental

4. Delineamento experimental

Para a análise global dos mRNAs presentes em oócitos bovinos de diferentes qualidades morfológicas, COCI e COCIII foram submetidos à maturação *in vitro* separadamente. Após essa maturação, os COCs foram vortexados para separação das células do cumulus dos oócitos. Foram feitos *pools* de 50 oócitos, para cada grupo, em três repetições, que foram armazenados para extração de RNA. O RNA foi extraído e, em seguida, precipitado e purificado. Posteriormente, o RNA resultante foi quantificado e avaliado quanto a sua integridade. Amostras que estavam com quantidade e qualidade adequadas foram amplificadas em *anti-sense* RNA (aRNA), marcadas com biotina, fragmentadas e hibridizadas em *microarray*. Os *arrays* foram escaneados e os dados gerados analisados em busca de genes diferencialmente expressos entre OO-COCI (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I) e OO-COCIII (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III) (Figura 06).

Figura 06. Delineamento experimental.

Material e Métodos

5. Material e Métodos

5.1. Coleta, seleção e maturação *in vitro* dos COCs

Os ovários foram coletados de fêmeas adultas de bovinos, abatidas em frigorífico, e transportados para o laboratório em solução salina 0,9% estéril contendo antibióticos (penicilina (*Sigma-Aldrich Co.*), estreptomicina (*Sigma-Aldrich Co.*) e neomicina (*Sigma-Aldrich Co.*)) em recipiente térmico a 35°C. Ao chegar ao laboratório, os ovários foram lavados em solução salina 0,9% estéril contendo antibióticos já citados e acondicionados em banho-maria a 35°C. Em seguida, os folículos de diâmetro entre dois a oito milímetros foram aspirados utilizando-se seringa descartável de 10ml acoplada a uma agulha de 18G. O líquido folicular aspirado foi colocado em placas de Petri, dispostas sobre uma placa aquecedora a 35°C.

Posteriormente, os COCs foram analisados através de um estereomicroscópio, no aumento de 40 vezes, quanto sua aparência, tanto do ooplasma quanto das células do cumulus. Foram selecionados os COCI (células do cumulus compactas presentes, contendo mais de três camadas de células e ooplasma homogêneo) e COCIII (menos de duas camadas de células do cumulus, com parte da zona pelúcida exposta e ooplasma homogêneo ou heterogêneo) (LEIBFRIED; FIRST, 1979).

Assim que foram selecionados, foram feitos dois grupos: o primeiro com COCI e o segundo com COCIII, e cada grupo foi lavado duas vezes em meio de lavagem TCM199 (*Gibco*) com sais de Earles (*Sigma-Aldrich Co.*), glutamina (*Sigma-Aldrich Co.*), Hepes (*Sigma-Aldrich Co.*) e NaHCO_3 (*Sigma-Aldrich Co.*) com adição de 22µg/ml piruvato (*Sigma-Aldrich Co.*), 83µg/ml sulfato de amicacina (*Ariston*) e 10% soro fetal bovino (*Gibco*). Em seguida, cada grupo foi lavado duas vezes em meio de maturação TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO_3 com adição de 22µg/ml piruvato, 83µg/ml sulfato de amicacina e 10% soro fetal bovino, 0,5µg/ml FSH (*follicle-stimulating hormone* - *Bioniche Animal Health Canada Inc.*), 10µl/ml LH (*Intervet International B.V.*) e 1µg/ml estradiol (*Sigma-Aldrich Co.*). Após a lavagem, os COCs foram transferidos para micro gotas de 100µl de meio de maturação, cobertas com óleo mineral, em placas descartáveis de 35mm de diâmetro. Foram colocados no máximo 20 COCs em cada micro gota. A placa foi colocada

na incubadora a 38,8°C e 5% de CO₂ em ar e máxima umidade, durante 22 a 24 horas, o que permitiu a ocorrência da maturação oocitária.

5.2. Denudação dos COCs e armazenamento do oócitos

Após a maturação *in vitro*, os COCs foram lavados três vezes em TBS (*Tris buffered saline* - 0,8g NaCl (*Sigma-Aldrich Co.*), 0,02g KCl (*Sigma-Aldrich Co.*) e 0,3g Tris (*Invitrogen*)) para retirada do óleo presente nas placas. Em seguida, foram transferidos para um tubo contendo 4.10⁻⁵g/ml hialuronidase (*Sigma-Aldrich Co.*) dissolvida em solução de Hank's (*Sigma-Aldrich Co.*). O tubo foi vortexado por três minutos para a separação das células do cumulus dos oócitos. Os oócitos desnudos foram selecionados e lavados três vezes em TBS + 0,1% PVP (polivinilpirrolidona - *Electron Microscopy Sciences*) e, por último, foram lavados em uma gota contendo TBS + 0,1% PVP + 10U RNase OUT 40U/μl (*Invitrogen*). Utilizando uma pasteur estirada, 50 oócitos foram selecionados com a menor quantidade de líquido possível e imersos diretamente em um tubo contendo 1ml de Trizol (*Ambion*) gelado, permitindo a lise das células. O tubo foi vertido duas vezes e armazenado em -80°C até a sua utilização para extração de RNA.

5.3. Extração e purificação do RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol, no qual as células já estavam armazenadas. Os tubos contendo Trizol com os oócitos foram retirados do freezer - 80°C e colocados sobre o gelo até que descongelassem totalmente. Em seguida, para cada amostra, foram adicionados 200μl de clorofórmio (*Reagen*) gelado para separar a fase orgânica da inorgânica e 10μl de glicogênio gelado (20mg/ml - *Invitrogen*) para auxiliar na precipitação do RNA. Os tubos foram vertidos 15 vezes e incubados à temperatura ambiente por cinco minutos. Após decorrer o tempo, os tubos foram centrifugados a 4°C por 15 minutos na rotação de 10900rpm.

Ao retirar os tubos da centrífuga, foi possível observar três fases: fase superior e transparente, contendo o RNA; fase intermediária e esbranquiçada, contendo as proteínas e no fundo, a fase rosa, contendo o DNA. Foram retirados em torno de 600µl da fase superior de cada amostra que foram transferidos para um novo tubo. Foi adicionado o mesmo volume de álcool isopropílico (*Labsynth*) gelado, com o intuito de este substituir as ligações da água com o RNA, possibilitando a precipitação do RNA. As amostras foram guardadas em -80°C overnight para a precipitação do RNA.

No dia seguinte, as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas a 4°C por 15 minutos na rotação de 10900rpm. Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi retirado, sendo possível observar o pellet, e foi adicionado 1ml de etanol 70% (*Labsynth*) gelado para a lavagem do pellet. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos na rotação de 10900rpm. Em seguida, todo o etanol foi retirado e esperou até que o tubo não apresentasse resquícios de etanol e o pellet estivesse seco.

Com o *pellet* seco, foram adicionados 45µl de água livre de RNase e 5µl do mix para o tratamento de DNA (para cada amostra: 1µl de *Buffer* 10x DNaseI (*Invitrogen*), 0,5µl de DNase 1U/µl (*Invitrogen*), 0,12µl de RNase OUT 40U/µl, 3,38µl de água livre de RNase (*Invitrogen*)). As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente para a ação da DNase. Após esse tempo, foi adicionado 1µl de EDTA 25mM (*Invitrogen*) em cada amostra, as quais permaneceram incubadas a 60°C por 10 minutos, para auxiliar na eluição do RNA. Em seguida, foram guardadas em -80° até a etapa seguinte.

As amostras foram submetidas a um protocolo de precipitação e purificação do RNA, com o intuito de retirar as impurezas da amostra, principalmente provenientes do tratamento com DNase. Para cada amostra foi adicionado 100µl de fenol (*Merck*) : clorofórmio (*Merck*) : álcool isoamílico (*Sigma-Aldrich Co.*) (25:24:1) e os tubos foram vertidos delicadamente por 100 vezes, vortexados por 15 segundos e centrifugados a 4°C por 17 minutos na rotação de 20800g. Os tubos foram retirados da centrífuga e o sobrenadante transparente, em torno de 50µl, foi transferido para outro tubo. Foram adicionados 10% do volume da amostra de acetato de sódio (*Sigma-Aldrich Co.*) gelado (3M, pH 5,3) e 2,5 vezes o volume da amostra de etanol absoluto gelado. As amostras foram vortexadas e incubadas a -80°C overnight.

No dia seguinte, as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas a 4°C por 17 minutos na rotação de 20800g. O sobrenadante foi descartado, sendo possível observar o pellet e foi adicionado 500µl de etanol 70% gelado para lavá-lo. Os tubos foram centrifugados a 4°C por cinco minutos na rotação de 20800g. Repetiu-se o processo de

lavagem do pellet e após a centrifugação, o sobrenadante foi totalmente retirado e aguardou até que o pellet estivesse seco. O pellet foi ressuspenso em 6µl de água e incubado a 50°C por cinco minutos. Imediatamente, o tubo foi armazenado em -80°C até a etapa seguinte.

5.4. Quantificação e avaliação da integridade do RNA

Após a extração e purificação do RNA, as amostras foram avaliadas quanto a quantidade e qualidade utilizando o *NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific)* com medições feitas com 1µl de cada amostra. Para a quantificação dos ácidos nucleicos, é utilizada a equação de *Beer-Lambert*: $c = (A * \epsilon)/b$, onde c é a concentração do RNA em ng/µl, A é a absorbância em AU, ϵ é o coeficiente de extinção do comprimento de onda, 40ng-cm/µl para RNA e b é o caminho óptico em cm. Em relação a qualidade do RNA, são analisadas duas razões de absorbância. As razões 260/280nm~2,0 e 260/230~1,8-2,2 indicam um RNA puro. Se essa taxa for muito baixa, isso pode indicar uma contaminação por proteína, fenol e outros contaminantes.

Após a quantificação, as amostras foram avaliadas quanto à sua integridade utilizando-se o *RNA 6000 Pico Chip (Agilent Technologies)* juntamente com o *Bioanalyzer (Agilent Technologies)*. As amostras foram diluídas e denaturadas por dois minutos a 72°C e então inseridas no chip de acordo com instruções do fabricante. O chip possui um conjunto interconectado de micro canais que é utilizado para a separação dos fragmentos de ácidos nucleicos com base no seu tamanho na medida em que são conduzidos através dos micro canais por eletroforese. O resultado final fornece, para cada amostra, um gel e um eletroferograma.

O eletroferograma é dividido em múltiplas regiões. A pré-região precede o marcador (M) e corresponde aos RNAs menores que 25 nucleotídeos. A região 5S inclui rRNA 5S, tRNA (ácido ribonucleico transportador) e outros RNAs com tamanho menor que 200 nucleotídeos. Já a região-rápida inclui RNA de tamanho aproximadamente entre 200 e 1500 nucleotídeos. A região 18S inclui o rRNA 18S e outros entre 1600 e 1800 nucleotídeos, enquanto a região 28S inclui o rRNA 28S e outros RNAs de tamanho entre 3200 e 3600 nucleotídeos. Os RNAs com tamanho entre 1800 e 3200 nucleotídeos fazem parte da inter-região. A pós-região inclui RNAs de tamanho maior que 4500 nucleotídeos. O software do

Bioanalyzer gera uma razão rRNA que é calculada pela área abaixo do pico do 28S pela área abaixo do pico do 18S, e esse valor deve ser de no mínimo 1,5 para um RNA íntegro. O software também gera um número de integridade do RNA (RIN – do inglês *RNA Number Integrity*) que é um valor calculado com base em um algoritmo que considera todas as regiões do eletroferograma. O RIN varia de um, completamente degradado, até 10, indicando um RNA intacto (SCHROEDER et al., 2006) (Figura 07).

Figura 07. Regiões do eletroferograma gerado pelo software do *Bioanalyzer* e o respectivo gel. Regiões do eletroferograma (A) e marcador do *Pico LabChip* (B), que possibilita estimar o tamanho dos RNAs de cada região. A pré-região precede o marcador (M) e corresponde aos RNAs menores que 25 nucleotídeos; a região 5S inclui RNAs com tamanho menor que 200 nucleotídeos. Já a região-rápida inclui RNA de tamanho aproximadamente entre 200 e 1500 nucleotídeos. A região 18S inclui RNAs entre 1600 e 1800 nucleotídeos, enquanto a região 28S inclui RNAs de tamanho entre 3200 e 3600 nucleotídeos. Os RNAs com tamanho entre 1800 e 3200 nucleotídeos fazem parte da inter-região e a pós-região inclui RNAs de tamanho maior que 4500 nucleotídeos.

5.5. Amplificação, purificação e fragmentação do aRNA

As amostras de RNA que apresentavam mais de 33,5ng/μl e os melhores RINs foram amplificadas seguindo o protocolo do *GeneChip 3'IVT Express Kit (Affymetrix)*. Inicialmente, os RNAs foram diluídos para uma quantidade de 100ng em 3μl, foram adicionados 2μl de controle RNA poli-A e 5μl do mix para a síntese da primeira fita do cDNA (DNA complementar) utilizando um *primer T7 oligo(dT)* contendo uma sequência promotora T7. Essa mistura foi incubada a 42°C por duas horas no termociclador TC-5000 (*Techne*). Após esse tempo, foram adicionados 20μl do mix para a síntese da segunda fita do cDNA pela DNA polimerase e RNase H para degradação simultânea do RNA e as amostras foram incubadas a 16°C por 60 minutos seguidos por 10 minutos a 65°C. Assim que a reação terminou, foram adicionados 30μl do mix para a transcrição *in vitro*, contendo biotina para a marcação do ácido nucléico, e as amostras foram incubadas a 40°C por 16 horas. Esse é o passo de amplificação propriamente dito, ele produz uma quantidade exponencial de aRNA a partir do molde de cDNA.

No dia seguinte, o aRNA foi purificado para a remoção de enzimas, sais, nucleotídeos que não foram incorporados e fosfato inorgânico buscando melhorar a estabilidade do aRNA marcado. Na purificação, *beads* magnéticas foram adicionadas às amostras e capturadas com o auxílio de uma raque magnética (*Magnetic Stand 96 - Ambion*). Ao final do processo, o aRNA foi eluído em 50μl de uma solução de eluição de aRNA.

Após a purificação, esse aRNA foi quantificado no *NanoDrop* e avaliado no *Bioanalyzer*. O perfil esperado era uma distribuição de aRNA entre 250-5500 nucleotídeos, com a maior parte dos aRNA entre 600-1200 nucleotídeos. As amostras que alcançaram uma quantidade total de aRNA maior que 12000ng e obtiveram o perfil esperado no *Bioanalyzer* passaram para a fase seguinte de fragmentação do aRNA.

A fim de se obter a concentração necessária para a etapa de fragmentação do aRNA, as amostras foram secadas por 37 minutos, com dois intervalos para checar a quantidade de água que já tinha evaporado, no equipamento *SpeedVac VR-1 (Heto Lab. Equipment)* acoplado a uma bomba de vácuo CT110 (*Heto High Technology of Scandinavia*), com rotação única e sem aquecimento. Ao final do processo, as amostras tinham entre 26-28μl.

As amostras foram novamente quantificadas no *NanoDrop* e a partir dos valores obtidos foi feita uma diluição para 12000ng em 25,6μl. O mix de fragmentação foi

incorporado a essa diluição e as amostras foram incubadas a 94°C por 35 minutos. Em seguida, esse aRNA fragmentado foi analisado no *Bioanalyzer*, sendo o perfil esperado de uma distribuição entre 35-200 nucleotídeos e o pico de aRNA fragmentado aproximadamente entre 100-120 nucleotídeos. As amostras que estavam com o perfil adequado passaram para o passo seguinte.

5.6. Hibridização, lavagem e escaneamento dos arrays

Para a etapa de hibridização da amostra com o *GeneChip Bovine Genome Array* (Affymetrix), um mix de hibridização contendo controles de hibridização foi incorporado ao aRNA marcado e fragmentado. Essa solução foi inserida no *GeneChip Bovine Genome Array* e permaneceu hibridizando por 16 horas no *GeneChip Hybridization Oven 640* (Affymetrix) a 45°C com rotação de 60rpm.

O *GeneChip Bovine Genome Array* é um array com design de 11 micron e contém 11 pares de sonda para cada conjunto de sonda. O design do array é baseado no conteúdo de *Bovine UniGene Build 57* (24 março de 2004) e *GenBank mRNAs*. Ele foi desenvolvido por meio do *GeneChip Consortia Program* e contém 24027 conjuntos de sonda que representam mais de 23000 transcritos e incluem aproximadamente 19000 *UniGene clusters*.

No dia seguinte, a solução de hibridização foi retirada do *GeneChip Bovine Genome Array* e substituída por um tampão de lavagem. Os *GeneChip Bovine Genome Array* foram colocados no *GeneChip Fluidics Station 450* (Affymetrix), ligado ao *GeneChip Command Console Fluidics Control Software* (Affymetrix) para a lavagem completa dos arrays. Após esse procedimento, os *GeneChip Bovine Genome Array* foram, individualmente, escaneados no *GeneChip Scanner 3000 7G* (Affymetrix) conectado ao *GeneChip Command Console Scan Control Software* (Affymetrix) e ao *Expression Console Software* (Affymetrix). Com todas as amostras escaneadas, os controles de hibridização foram checados no *Expression Console Software* (Affymetrix).

5.7. Análise dos dados de transcriptoma

Os valores de expressão foram obtidos usando os três passos do método de pré-processamento RMA (*Robust Multi-array Average*, IRIZARRY et al., 2003)¹. Aplicou-se o método *ComBat* para a remoção de efeitos de *batch* (JOHNSON; LI; RABINOVIC, 2007). Em seguida, foi aplicado um filtro IQR (*Inter-Quartile-Range*), que excluiu todos os genes com variação menor que um valor de corte ($IQR < 0,3$). Todos estes métodos estão disponíveis no programa *R/Bioconductor*².

O método SAM (*Significance Analysis of Microarrays*, TUSHER; TIBSHIRANI; CHU, 2001) e RP (*Rank Products*, BREITLING et al., 2004), foram usados para a seleção dos genes diferencialmente expressos (DEG, do inglês *Differentially Expressed Genes*), ambos com valor de $p < 0,05$ corrigidos por FDR (*False Discovery Rate*, BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). O método HCL (*Hierarchical Clustering*) foi utilizado para o agrupamento dos dados com o método de ligação completa para o cálculo da distância entre grupos. O algoritmo está disponível no programa *Expander*³ (SHAMIR et al., 2005).

A análise funcional *in silico* dos DEGs encontrados foi realizada com a ferramenta IPA⁴ (*Ingenuity Pathway Analysis*). Foram utilizados os parâmetros *default* "Molecules per Network=35, Networks per Analysis=25" e somente consideradas as ligações diretas entre os genes nas redes hipotéticas.

¹ <http://www.bu.edu/jlab/wp-assets/ComBat/Abstract.html>

² <http://www.bioconductor.org/>

³ <http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/index.html>

⁴ <http://www.ingenuity.com/>

Resultados

6. Resultados

Os experimentos foram realizados em triplicata biológica com uma amostra de cada grupo experimental (*pool* de OO-COCI e OO-COCIII) para cada repetição. As amostras foram numeradas, sendo as amostras 120, 121 e 126 pertencentes ao grupo de OO-COCI e as amostras 123, 124 e 129 ao grupo de OO-COCIII.

6.1. Quantificação e integridade do RNA

Após a extração, precipitação e purificação do RNA a partir de *pools* de OO-COCI e OO-COCIII, as amostras foram avaliadas quanto a sua concentração e qualidade no *NanoDrop* (Tabela 01) e integridade *Bioanalyzer* (Figura 08).

Tabela 01. Resultados das quantificações e razões 260/280 e 260/230 medidas no *NanoDrop* das amostras de RNA. OO-COCI: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I, OO-COCIII: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau.

	Amostra	ng/ μ l	ng totais	260/280	260/230
OO-COCI	120	52,10	321,60	1,72	0,68
	121	51,50	309,00	1,74	0,66
	126	48,40	290,40	1,72	0,79
OO-COCIII	123	45,00	270,00	1,74	0,67
	124	49,30	295,80	1,71	0,66
	129	47,20	283,20	1,72	0,75

Figura 08. Imagem dos gráficos gerados das amostras de RNA submetidas à análise de integridade no *Bioanalyzer*. É possível observar em cada gráfico o pico do marcador, os picos dos rRNA 18S e 28S, o RIN (*RNA Number Integrity*) e a razão rRNA gerado para cada amostra.

As seis amostras obtiveram valores de concentração média de 295,00ng por *pool* de oócitos, o que equivale a uma concentração média de 5,9ng de RNA por oócito, valor acima dos encontrados na literatura para oócitos maturados (BILODEAU-GOESELS; SCHULTZ, 1997; LEQUARRE et al., 2004). Essa diferença na concentração de RNA pode ser devido aos diferentes métodos utilizados na quantificação.

A razão 260/280 por volta de 1,72 está próxima do valor esperado de 2,0, indicando que a amostra não possui contaminação por proteínas. Já a razão 260/230 encontra-se abaixo do esperado, indicando que a amostra pode estar contaminada com fenol e solventes. Ao longo da padronização da extração de RNA, vários testes foram feitos a fim de se obter um RNA puro e íntegro (dados não mostrados). O protocolo utilizado nesse trabalho foi o que resultou nas melhores razões 260/230, bem como nos melhores valores de RIN. Apesar dos resultados de RIN estarem abaixo de 7,0, indicando degradação parcial, isso já era esperado

visto que, durante a maturação, o oócito passa por um processo de degradação parcial dos mRNA estocados (BETTEGOWDA et al., 2006; LEQUARRE et al., 2004; SU et al., 2007).

Ao analisar os géis (Figura 08), é possível verificar que existe um pico na região entre 25 e 200 nucleotídeos de todas as amostras. Esse mesmo pico não é observado quando amostras de RNA extraídas por *RNeasy Micro Kit* (Qiagen) são analisadas (dados não mostrados). Isso provavelmente se deve ao uso do reagente *Trizol* na extração do RNA. Quando kits comerciais com extração de RNA baseada em coluna são utilizados, como por exemplo, o *RNeasy Micro Kit*, normalmente ocorre uma filtragem dos fragmentos pelo seu tamanho, sendo que fragmentos menores que 200 nucleotídeos passam pela membrana e são perdidos, estando ausentes no *pool* de RNA obtido após o procedimento.

Esse pico pode estar representando pequenos RNAs, entre eles rRNA 5S, tRNA, microRNAs e também fragmentos de RNA degradados, já que durante a maturação oocitária ocorre uma destruição extensiva de transcritos no oócito (BETTEGOWDA et al., 2006; LEQUARRE et al., 2004; SU et al., 2007). Interessantemente, esse pico na região 5S possui o mesmo perfil em todas as amostras analisadas. É possível observar também que o pico do 28S é menor que o pico do 18S, isso era esperado já que rRNA 28S é tipicamente degradado antes do rRNA 18S, o que leva um aumento na quantidade de RNAs na inter-região (SCHROEDER et al., 2006).

Quando comparado com célula do cumulus, os oócitos apresentam um RIN menor que as células do cumulus, que se assemelham mais a uma célula somática “normal” (PAYTON, 2009). Esse perfil obtido pelo oócito no *Bioanalyzer* já foi detectado em outros experimentos com essa célula gamética e é plausível aceitar que o oócito possui características únicas que são importantes para o desenvolvimento (ELIS et al., 2008; KOCABAS et al., 2006; PAYTON, 2009). Entretanto, a significância funcional da razão rRNA abaixo do esperado não está clara e necessita de mais estudos. Sugere-se que a razão rRNA baixa durante o período que o oócito não está ativo transcritionalmente, dependendo de fatores maternos estocados, seja algum tipo de controle traducional (PAYTON, 2009).

Mesmo que um RIN abaixo de sete e uma razão rRNA baixa indiquem algum nível de degradação no oócito, fisiologicamente relevante ou não, quando este RNA é utilizado para amplificação do mRNA, o perfil observado de distribuição de nucleotídeos é igual ao esperado, indicando que o mRNA possui integridade suficiente para seguir nas etapas seguintes (ELIS et al., 2008; PAYTON, 2009).

6.2. Quantificação, integridade e fragmentação do aRNA

Todo o processo de preparação da amostra do RNA até o aRNA fragmentado foi acompanhado por amostras controle de RNA de células *HeLa*, não havendo nenhum relato de problemas no protocolo. Além desse controle, em cada amostra, foram incorporados controles de RNA poli-A. Esses controles são RNAs de genes de *Bacillus subtilis* (*lys*, *phe*, *thr* e *dap*) que estão ausentes nos eucariotos e para os quais existem sondas no *GeneChip Bovine Genome Array*.

Após a extração do RNA, esse foi transcrito *in vitro* e amplificado em aRNA para produzir quantidade suficiente de moléculas marcadas com biotina para hibridizar no *array*. O aRNA foi analisado no *NanoDrop* (Tabela 02) e *Bioanalyzer* (Figura 09), para checar sua concentração e qualidade após o processo de amplificação.

Tabela 02. Resultados das quantificações e razões 260/280 e 260/230 medidas no *NanoDrop* das amostras de aRNA. OO-COCI: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I, OO-COCIII: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III.

	Amostra	ng/ μ l	ng totais	260/280	260/230
OO-COCI	120	299,50	14975,00	2,09	2,20
	121	403,40	20170,00	2,08	1,84
	126	440,30	22015,00	2,09	2,18
	123	383,70	19185,00	2,08	2,17
OO-COCIII	124	312,50	15625,00	2,05	2,02
	129	453,50	22675,00	2,07	1,92

Figura 09. Imagem dos gráficos gerados das amostras de aRNA submetidas a análise do perfil de distribuição dos fragmentos no *Bioanalyzer*. É possível observar que a maior parte dos aRNA estão distribuídos entre 600-1200 nucleotídeos, o que era esperado após o passo de amplificação de todo o conteúdo de mRNA do oócito.

Os resultados de quantificação mostram que todas as amostras apresentaram quantidade total de RNA maior que 12000ng, como exigido para o passo seguinte do protocolo. As razões 260/280 e 260/230 estão acima de 1,8, indicando um aRNA puro. A maior parte dos aRNAs está distribuída na faixa de 600 e 1200 nucleotídeos, o que era esperado após o passo de amplificação de todo o conteúdo de mRNA do oócito. Nessa análise pelo *Bioanalyzer*, o número RIN gerado não é interessante, já que não se avalia mais a relação entre os picos de rRNA 18S e 28S. Avalia apenas o perfil de distribuição das moléculas de aRNA.

Após a quantificação e avaliação do perfil de distribuição do aRNA, foi necessário concentrar as amostras em *SpeedVac*. Apesar de todas as amostras possuírem mais de 12000ng, como exigido para o passo seguinte, as amostras deveriam ter essa quantidade de aRNA em 25,6µl, e elas possuíam essa quantidade em 50µl. Após serem concentradas, as amostras foram quantificadas em *NanoDrop* (Tabela 03). Como as amostras apresentaram as

razões 260/280 e 260/230 adequadas, elas seguiram para o passo seguinte sem uma nova avaliação da integridade desse aRNA no *Bioanalyzer*.

Tabela 03. Resultados das quantificações e razões 260/280 e 260/230 medidas no *NanoDrop* das amostras de aRNA após diminuição do volume no *SpeedVac*. OO-COCI: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I, OO-COCIII: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III.

	Amostra	ng/μl	ng totais	260/280	260/230
OO-COCI	120	497,80	12942,80	2,04	2,17
	121	710,70	18478,20	2,03	1,84
	126	788,00	20488,00	2,04	2,18
	123	590,30	15347,80	2,06	2,22
OO-COCIII	124	550,80	14320,80	2,01	2,03
	129	835,40	21720,40	2,04	1,90

Após obter a concentração mínima de 468,75ng/μl e a partir dos valores de concentração obtidos pelo *Nanodrop*, as amostras de aRNA foram diluídas para 12000ng em 25,6μl. Com a concentração padronizada, as amostras foram fragmentadas e analisadas quanto ao perfil de distribuição das moléculas de aRNA fragmentado no *Bioanalyzer* (Figura 10). A maior parte dos aRNAs está distribuída na faixa de 100 - 120 nucleotídeos, o que era esperado após o passo de fragmentação de todo o conteúdo de aRNA. Nessa análise pelo *Bioanalyzer*, assim como na análise do aRNA, o número RIN gerado não é interessante, já que não se avalia mais a relação entre os picos de rRNA 18S e 28S. Avalia apenas o perfil de distribuição das moléculas de aRNA fragmentado.

Figura 10. Imagem dos gráficos gerados das amostras de aRNA fragmentadas submetidas a análise do perfil de distribuição dos fragmentos no *Bioanalyzer*. É possível observar que o pico de aRNA fragmentado está aproximadamente entre 100-120 nucleotídeos, o que era esperado após o passo de fragmentação de todo o conteúdo de aRNA.

6.3. Hibridização do aRNA fragmentado e escaneamento dos *arrays*

O aRNA marcado com biotina e fragmentado foi misturado com um mix de hibridização contendo controles de hibridização, que são adicionados para monitorar o processo de hibridização, lavagem e leitura dos *arrays*. Os controles de hibridização são compostos por uma mistura de aRNA marcado e fragmentado de *bioB*, *bioC* e *bioD* de *Escherichia coli* e *cre* do bacteriófago P1. Esses genes possuem sondas no *array* que direcionam a leitura deste no *scanner* e podem ser identificados na imagem logo após essa ser escaneada.

Cada uma das seis amostras foi hibridizada com um *GeneChip Bovine Genome Array* e posteriormente escaneada. Após escanear, os controles de hibridização foram checados na própria imagem gerada pelo *software*, por meio de uma análise visual, sendo visualizados em

quatro pontos diferentes: ao redor de todo o *array*, no canto superior esquerdo, formando o nome do *array* (*GeneChip Bovine*) e em dois quadrados na área central, o superior com os controles negativos e o inferior com os controles positivos (Figura 11). Foi possível observar em todos os seis *arrays* escaneados que os controles de hibridização estavam como esperado (Figura 12).

Figura 11. Imagem gerada pelo *software* após escaneamento do *array*. Os controles de hibridização podem ser visualizados em quatro pontos diferentes: ao redor de toda a imagem, os pontos brancos que delimitam o *array*; no canto superior esquerdo, formando o nome do *array* (*GeneChip Bovine*); dois quadrados na área central, o superior com os controles negativos e o inferior com os controles positivos.

Figura 12. Imagem dos seis *arrays* gerados pelo *software*. O arrays 120, 121 e 126 pertencem ao grupo de oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I e os arrays 123, 124 e 129 pertencem ao grupo de oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III.

6.4. Análise dos dados do transcriptoma

6.4.1. Normalização dos dados e identificação dos genes diferencialmente expressos

A partir dos *arrays* das amostras 120, 121 e 126 pertencentes ao grupo de OO-COCI e das amostras 123, 124 e 129 pertencentes ao grupo de OO-COCIII foram gerados dados acerca da expressão gênica dos controles poli-A, de hibridização e dos mRNA específicos dos oócitos.

Assim que os dados foram gerados, esses foram analisados visualmente por meio de um *boxplot* que mostra a diferença entre os seis *arrays* sem fazer nenhuma suposição prévia. É possível visualizar os dados numéricos de cada amostra divididos entre a menor observação, o quartil inferior, a mediana, o quartil superior e a maior observação. Diante da imagem encontrada, os dados foram normalizados pelo método RMA (Figura 13).

Figura 13. *Boxplot* das seis amostras antes da normalização (A) e após a normalização pelo método RMA (*Robust Multi-array Average*) (B). OO-COCI: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I, OO-COCIII: oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III.

Após a normalização, os efeitos de *batch* foram removidos. Os efeitos de *batch* são as variações técnicas, não biológicas, que ocorrem no experimento, decorrente principalmente da estrutura do experimento. Na extração de RNA e no processo de hibridização, os *arrays* 120, 121, 123 e 124 foram feitos em um primeiro lote, enquanto os *arrays* 126 e 129 foram

feitos em um segundo lote. Na etapa de amplificação do RNA, a amostra 120 foi feita em um lote, as amostras 121, 123 e 124 em um segundo lote e por último as amostras 126 e 129. Em considerações logísticas que restringem o tamanho da amostra ou em estudos que exigem a hibridização sequencial de *arrays*, como ocorreu nesse caso, a habilidade em combinar dados de *microarray* é vantajosa, pois aumenta o poder estatístico para detecção de fenômenos biológicos (JOHNSON; LI; RABINOVIC, 2007).

Esta estrutura do experimento provavelmente acrescentou variáveis que "aproximaram" os *arrays* 121, 123 e 124 e os *arrays* 126 e 129 como se fossem grupos, prejudicando a separação por grau de qualidade morfológica. Como pode ser visto nos gráficos de correlação de Spearman (Figura 14 (A)) e no gráfico de componentes principais (Figura 15 (A)) a correlação intra-grupo entre os *arrays* de OO-COCI e entre os *arrays* de OO-COCIII é pequena e a diferença entre-grupos também é pequena, o que prejudica o processo de detecção de genes diferencialmente expressos entre estes dois grupos. Após a remoção dessas variáveis indesejadas, o perfil observado é outro (Figura 14 (C) e Figura 15 (C)). No gráfico de componentes principais (Figura 15 (C)) existe um perfil claro de separação entre os grupos, de modo que as amostras OO-COCI apresentam um perfil muito mais claro de similaridade entre si do que com os OO-COCIII, e o mesmo ocorre para OO-COCIII em relação aos OO-COCI.

O filtro de IQR foi aplicado após a remoção das variáveis não biológicas. O filtro selecionou apenas os genes com maior variação de expressão, retirando assim todos os genes que apresentavam expressão basal. Dos 24128 transcritos presentes no *array*, incluindo os controles poli-A e de hibridização, 8365 foram selecionados pelo IQR.

Figura 14. Gráfico mostrando os resultados da correlação de Spearman antes da normalização (A), após normalização pelo método RMA (*Robust Multi-array Average*) (B) e após correção do *batch* e filtro IQR (*Inter-Quartile-Range*) (C). Os arrays 120, 121 e 126 pertencem ao grupo OO-COCI (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I) e os arrays 123, 124 e 129 pertencem ao grupo OO-COCIII (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III). Em C, a correlação entre as amostras de OO-COCI e entre as amostras de OO-COCIII ficaram maiores e a diferença entre os dois grupos também ficou mais evidente. A escala de cores nos gráficos varia do branco ao vermelho, sendo o branco correspondente à menor correlação e o vermelho à maior.

Figura 15. Gráfico mostrando os resultados da análise por componentes principais antes da normalização (A), após normalização pelo método RMA (*Robust Multi-array Average*) (B) e após correção do *batch* e filtro IQR (*Inter-Quartile-Range*) (C), quando uma melhor separação entre os dois grupos pode ser observada. Os arrays 120, 121 e 126, representadas pelos pontos azuis, pertencem ao grupo OO-COCI (óócitos advindos de complexos cumulus-óócito de qualidade morfológica grau I) e os arrays 123, 124 e 129, representados pelos pontos verdes, pertencem ao grupo OO-COCIII (óócitos advindos de complexos cumulus-óócito de qualidade morfológica grau III).

Os métodos estatísticos melhoram o seu desempenho quando analisam uma menor quantidade de genes (BOURGON; GENTLEMAN; HUBER, 2010). Com base nisso, apenas os 8365 genes selecionados pelo IQR com maior variação de expressão foram utilizados para identificação dos DEGs. Usando o método SAM, foram identificados 424 DEGs todos com expressão diminuída nos OO-COCIII com relação aos OO-COCI. A fim de aprofundar e validar a investigação pelo método SAM, um segundo método foi aplicado em busca de DEGs. O método RP identificou um total de 222 DEGs, sendo 200 deles diminuídos e 22 aumentados nos OO-COCIII em relação aos OO-COCI. Os 200 diminuídos estavam todos entre os 424 identificados pelo SAM, mostrando a similaridade entre os dois métodos e a validação dos resultados.

Dessa forma, no total, foram identificados 446 DEGs, sendo 424 com expressão diminuída (ANEXO A) e 24 com expressão aumentada (ANEXO B) nos OO-COCIII. Dentre esses DEGs, 24 deles (C9H12orf49, CDKN2AIPNL, CNIH4, COG2, COMMD4, COX6A1, DPCD, DUS3L, GIT2, HSPA5, LENG1, MRPS14, NOL12, NOL7, NYREN18, POLR1E, PTGR2, RNF8, ROBLD3, SQRDL, TIMM22, TM2D3, TMEM11, ZNF304) possuem mais de um transcrito no *microarray*. O termo “gene” foi utilizado como sinônimo de transcrito por uma questão de simplicidade.

Dentre os 446 DEGs, existem alguns identificados como ---, LOCxxxxxx ou CxHxxorfx. Os genes identificados como --- são transcritos existentes no *array* e existentes nos dados públicos, mas que ainda não foram anotados e, portanto, não se sabe maiores informações sobre esse transcrito. Genes que foram identificados com LOCxxxxxx são genes que ainda não possuem símbolo publicado e foram identificados por LOC + número do GeneID. Genes identificados por CxHxxorfx são genes que ainda não foram estudados, mas que possuem homólogos em outro genoma. Por exemplo, C19H17orf85 é um gene localizado no cromossomo 19 homólogo a *open reading frame* 85 presente no cromossomo 17 de humanos.

Todas as análises subsequentes foram desenvolvidas utilizando os DEGs. Nenhuma seleção dos DEGs foi realizada em relação ao *fold-change*. O *fold-change* é a medida que diz quantas vezes o valor de expressão do gene X é maior ou menor nos OO-COCIII em relação aos OO-COCI. Nesse trabalho, os OO-COCI foram definidos como controle, sendo as análises feitas com os OO-COCIII comparados com os OO-COCI. Quando os OO-COCIII apresentam valores de expressão maiores que os OO-COCI, o *fold-change* é obtido pela razão “valor expressão OO-COCIII / valor expressão OO-COCI”, gerando um número positivo. Quando os OO-COCIII apresentam valores de expressão menores que os OO-COCI, o *fold-change* é obtido pelo inverso negativo da razão “valor expressão OO-COCIII / valor expressão OO-COCI”, gerando um número negativo. Nos genes com expressão diminuída o *fold-change* variou de -6,25 a -1,64, e nos genes com expressão aumentada o *fold-change* variou entre 1,61 a 2,34 (ANEXOS A e B).

6.4.2. Análise funcional *in silico* dos DEGs

A análise *in silico* dos DEGs foi realizada com o uso da ferramenta IPA, resultando na obtenção das funções e vias biológicas enriquecidas com os DEGs. Também foram obtidas as redes biológicas significativamente enriquecidas com os DEGs. As vias biológicas ou canônicas são estruturas bem estabelecidas, bioquimicamente estudadas, enquanto as redes biológicas ou hipotéticas ilustram as relações hipotéticas entre genes, criadas de acordo com informações disponíveis na literatura.

Dos 446 DEGs, apenas 87,22% foram identificados pelo IPA e classificados quanto a sua funcionalidade (Figura 16) e localização (Figura 17). Deste montante, observa-se que a maior parte dos genes com expressão alterada pertence à classe das enzimas e estão localizados no citoplasma.

Figura 16. Os 389 DEGs reconhecidos pelo IPA foram classificados quanto a função da molécula na célula.

Genes classificados espacialmente

Figura 17. Os 389 DEGs reconhecidos pelo IPA foram classificados quanto a localização da molécula na célula.

O grupo de DEGs foi associado a 75 funções biológicas diferentes. Dentre elas, 22 foram selecionadas, por estarem relacionadas à competência de desenvolvimento do oócito, foco do nosso trabalho. Essas funções selecionadas envolvem 108 DEGs que podem estar associados a uma ou mais funções (Figura 18).

Figura 18. Funções biológicas enriquecidas com os genes diferencialmente expressos que foram selecionadas por estarem relacionadas a competência de desenvolvimento do oócito. Para cada função é apresentado o número de genes com expressão aumentada e o número de genes com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III quando comparados com oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I.

Utilizando os 108 DEGs relacionados às funções biológicas descritas acima, foi desenvolvida uma análise de agrupamento hierárquico que separa claramente as amostras em dois grupos baseado no grau de qualidade morfológica. No eixo dos genes, observam-se dois grupos, o primeiro contendo 104 genes menos expressos nos OO-COCIII e o segundo grupo contendo quatro genes mais expressos nos OO-COCIII (Figura 19).

Figura 19. Análise de agrupamento hierárquico dos 108 DEGs. As amostras estão claramente separadas em dois grupos: os *arrays* 120, 121 e 126 pertencem ao grupo OO-COCI (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I) e os *arrays* 123, 124 e 129 pertencem ao grupo OO-COCIII (oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III). No eixo dos genes, observam-se dois grupos, o primeiro contendo 104 genes menos expressos nos OO-COCIII e o segundo grupo contendo quatro genes mais expressos nos OO-COCIII.

Os 389 DEGs identificados pelo IPA foram associados a 137 vias biológicas, sendo que nem todos os genes foram associados a uma via biológica, enquanto outros genes foram associados a mais de uma via biológica. As 10 vias mais significativas foram: “disfunção mitocondrial”, “sinalização EIF2”, “via das pentoses-fosfato”, “via reparo excisão de nucleotídeo”, “biossíntese cisteína III (Mammalia)”, “reparo de malpareamento em eucariotos”, “sinalização de Parkinson”, “sinalização receptor de estrogênio”, “sinalização câncer de mama hereditário” e “complexo da RNA polimerase II”, todos com valor- $p < 0,05$ (Figura 20).

Figura 20. As 10 vias biológicas mais significativas que foram enriquecidas com os DEGs. Para cada via biológica é apresentado o $-\log(\text{valor-p})$.

As funções biológicas foram subdivididas entre “doenças e desordens”, “funções moleculares e celulares” e “desenvolvimento e função do sistema fisiológico”. As cinco funções mais significativas relacionadas à subdivisão “funções moleculares e celulares” foram confrontadas com as 10 vias biológicas mais significativas (Tabela 04). Apenas 12 genes foram identificados nessa análise, sendo que o gene MAPK1 foi representado seis vezes, indicando a potencialidade desse gene.

Durante a maturação oocitária, o oócito se prepara para uma modificação dramática do seu citoplasma e metabolismo energético que antecede a ovulação e fertilização. Uma falha no metabolismo do oócito pode comprometer a maturação nuclear e citoplasmática do gameta (KRISHER, 2004). Dentre as funções biológicas mais significativas está o “metabolismo de carboidrato” e “metabolismo de ácido nucléico”, envolvendo a via das

pentoses-fosfato, que juntamente com a via “disfunção mitocondrial” são as duas vias com maior número de representantes, com sete genes cada.

Tabela 04. As cinco funções biológicas mais significativas da subdivisão “funções moleculares e celulares” foram confrontadas com as 10 vias biológicas mais significativas, levando a identificação de 12 genes comuns a essas funções/vias biológicas.

	Metabolismo carboidrato	Metabolismo ácido nucléico	Bioquímica pequenas moléculas	Morfologia Celular	Organização celular
Disfunção mitocondrial	PSEN1	-	PSEN1, PARK7, GPX4	NDUFS6	PSEN1, NDUFS6
Sinalização EIF2	-	MAPK1	MAPK1	-	-
Via das pentoses- fosfato	TKT, TALDO1, PGLS	TKT, TALDO1, PGLS	-	TALDO1	-
Via reparo excisão de nucleotídeo	-	-	-	-	-
Biossíntese cisteína III (Mammalia)	-	CBS, AHCY	CBS, AHCY	CBS	-
Reparo de mal- pareamento eucariotos	-	-	-	-	-
Sinalização de Parkinson	-	MAPK1	MAPK1, PARK7, MAPK14	-	-
Sinalização receptor de estrogênio	-	MAPK1	MAPK1	-	-
Sinalização câncer de mama hereditário	-	-	-	DDB2	-
Complexo da RNA polimerase II	-	-	-	-	-

Para cada uma das vias biológicas foi gerada uma imagem representando os DEGs envolvidos e sua interação com as demais moléculas da via biológica. As três vias biológicas mais significativas estão representadas abaixo (Figuras 21, 22 e 23).

O foco da via biológica “disfunção mitocondrial” (Figura 21) está na cadeia de transporte de elétrons na membrana interna da mitocôndria relacionada com a obtenção de energia pela fosforilação oxidativa. A energia obtida na forma de ATP é essencial para o funcionamento celular, por outro lado, essa forma de obtenção de energia gera radicais livres, que quando não controlados, podem prejudicar a célula. Os genes que estão alterados nessa via são: COX17, COX7A2, COX6A1, COX6C, COX4I1, COX5B, NDUFS7, NDUFA2, NDUFA5, NDUFS5, NDUFB9, NDUFA11, NDUFS6, NDUFA7, NDUFB2, NDUFA8, PARK7, UQCRCF1, GPX4 e PSEN1.

Figura 21. A via biológica mais significativa relacionada a “disfunção mitocondrial”, com valor-p 0,00000000116. As figuras geométricas margeadas por laranja e preenchidas de verde referem-se aos genes que estão com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I. Legenda de todas as formas geométricas e interações entre genes consta no ANEXO C.

A via biológica “sinalização EIF2” (Figura 22) está intimamente relacionada ao processo de tradução, que gera proteínas a partir de mRNA. A tradução é um processo essencial na célula, em especial no oócito, já que este possui uma grande quantidade de mRNA materno estocado aguardando para ser traduzido quando a proteína for necessária para a célula. Os genes envolvidos nessa via são: MAPK1, FAU, EIF3F, EIF2B3, EIF3G, RPL7L1, RPL26, RPL10A, RPL7, RPS3A, RPL38, RPL18 e RPL13.

EIF2 Signaling

Figura 22. Via biológica relacionada a “sinalização EIF2”, com valor-p 0,00225. As figuras geométricas margeadas por laranja e preenchidas de verde referem-se aos genes que estão com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I. Legenda de todas as formas geométricas e interações entre genes consta no ANEXO C.

A “via das pentoses-fosfato” (Figura 23) é uma via alternativa à glicólise para metabolismo da glicose. Assim como a via da “disfunção mitocondrial”, está relacionada com a obtenção de energia pela célula. Está relacionada também com o controle da meiose (DOWNS; HUMPHERSON; LEESE, 1998). Uma falha no metabolismo do oócito ou na retomada da meiose pode levar a uma competência reduzida deste em seguir na fertilização e no desenvolvimento embrionário. Os genes envolvidos nessa via são: TKT, PGLS e TALDO1.

Pentose Phosphate Pathway

Adapted from HumanCyc. © 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 23. Via biológica relacionada a “via das pentoses-fosfato”, com valor-p 0,00287. As figuras geométricas margeadas por laranja e preenchidas de verde referem-se aos genes que estão com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I. Legenda de todas as formas geométricas e interações entre genes consta no ANEXO C.

Foram encontradas 18 redes hipotéticas, ranqueadas de acordo com o número de moléculas interagindo. A rede biológica envolvendo “organização celular, manutenção e funcionamento celular e morfologia celular” foi a primeira do ranking, com o score mais alto (Figura 24). Os genes envolvidos nessa via tem grande potencial de estarem relacionados com a competência do oócito, já que envolve funções básicas da célula, como organização, manutenção, funcionamento e morfologia.

Network 1 : 446DEGs_IPA - 2013-02-10 09:59 PM : 446DEGs_IPA.xls : 446DEGs_IPA - 2013-02-10 09:59 PM

© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 24. Rede biológica envolvendo “organização celular, manutenção e funcionamento celular e morfologia celular”. Essa foi a rede biológica com maior score e maior número de DEGs envolvidos. As figuras geométricas preenchidas de verde referem-se aos genes que estão com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I, enquanto as figuras preenchidas de vermelho referem-se aos genes com expressão aumentada. Legenda de todas as formas geométricas e interações entre genes consta no ANEXO C.

Dos 389 DEGs analisados pelo IPA, estes foram ranqueados quanto ao seu *fold-change*. Os 10 genes com expressão aumentada em OO-COCIII (Tabela 05) e os 10 genes com expressão diminuída em OO-COCIII (Tabela 06) foram descritos quanto a suas funções mais conhecidas.

Dentre os genes com expressão aumentada, é possível observar que a maior parte dos genes está relacionada com alguma atividade de regulação, mostrando que pode existir um desbalanço na célula. Já entre os genes com expressão diminuída, não existe uma função que esteja mais representada. É possível observar que os genes estão envolvidos com diferentes processos celulares, como transcrição, tradução e reparo do DNA.

Tabela 05. Os 10 genes, com maiores *fold-change*, com expressão aumentada em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I.

Símbolo gene	Nome gene	Funções primárias	<i>Fold Change</i>
C1D	<i>C1D nuclear receptor co-repressor</i>	Induz apoptose e interage com o DNA	2,34
AEBP2	<i>AE binding protein 2</i>	Repressor da transcrição que interage com o DNA	1,84
LYPLA1	<i>lysophospholipase I</i>	Enzima que regula os lisofosfolipídeos, hidrolisando lisofosfatidilcolina	1,80
ANXA3	<i>annexin A3</i>	Regulação do crescimento celular e sinalização em vias de tradução	1,78
HSF2	<i>heat shock transcription factor 2</i>	Ativa a resposta ao estresse térmico, induzindo a expressão das HSPs	1,76
ABL1	<i>c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>	Proteína tirosina quinase envolvida em processos de diferenciação celular, divisão celular, adesão celular e resposta ao estresse	1,74
RNF11	<i>RING finger protein 11</i>	Envolvido em interações proteína-proteína	1,69
RAB11FIP2	<i>RAB11 family interacting protein 2 (class I)</i>	Regulação do transporte de vesículas do compartimento de reciclagem do endossoma para a membrana plasmática	1,67
SYT4	<i>synaptotagmin IV</i>	Proteína integral de membrana de vesículas sinápticas e sensor de Ca ²⁺ no processo de transporte vesicular	1,63
LAMA2 // LOC100138434	<i>laminin, alpha 2 // similar to laminin, alpha 2 (merosin, congenital muscular dystrophy)</i>	Proteína extracelular constituinte da membrana basal	1,63

Tabela 06. Os 10 genes, com maiores *fold-change*, com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I.

Símbolo gene	Nome gene	Funções primárias	<i>Fold Change</i>
DDX39	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39</i>	RNA helicase ligada ao crescimento, envolvida no processamento e transporte do pré-mRNA	-5,08
HSPA5	<i>heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)</i>	Envolvido no enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático	-4,21
NDUFA5	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5, 13kDa</i>	Parte do complexo I da cadeia respiratória da mitocôndria	-3,82
MFSD2A	<i>major facilitator superfamily domain containing 2A</i>	Atua na termogênese	-3,65
PTPN2	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2</i>	Proteína tirosina fosfatase, essencial na atividade catalítica	-3,56
FAM162A //LOC617104	<i>growth and transformation-dependent protein</i>	Supõe que esteja envolvida na regulação da apoptose	-3,55
PAIP2	<i>poly(A) binding protein interacting protein 2</i>	Repressor da regulação do início da tradução	-3,50
EXOSC1	<i>exosome component 1</i>	Componente do exossomo, requerido para degradação de elementos contendo RNA ricos em AU	-3,50
APTX	<i>Aprataxin</i>	Envolvido no reparo de fita simples do DNA	-3,36
SSBP1	<i>single-stranded DNA binding protein 1</i>	Envolvido na biogênese da mitocôndria e na manutenção da estabilidade genômica	-3,31

Devido a comunicação bidirecional existente entre as células do cumulus e o oócito, os genes associados a função biológica sinalização e interação célula-célula foram analisados quanto às suas funções primárias (Tabela 07). A menor expressão de algum desses genes, MAPK1, MAPK14, MERTK, PARK7, PSEN1, RALBP1, SLC6A4, pode estar causando uma falha na comunicação no COC e assim prejudicando o desenvolvimento do oócito ou das células do cumulus. É possível observar que, dentre os genes, dois estão envolvidos com doenças e um com o sistema nervoso. Três deles são proteínas quinases e um atua como proteína multifuncional.

Tabela 07. Os genes envolvidos na função biológica “sinalização e interação célula-célula” foram ranqueados quanto ao seu *fold-change* e analisados quanto a sua função primária.

Símbolo gene	Nome gene	Funções primárias	<i>Fold change</i>
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	Codifica uma quinase relacionada a diversos processos celulares	-2,17
MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>	Codifica uma quinase relacionada a diversos processos celulares	-2,01
RALBP1	<i>ralA binding protein 1</i>	Codifica proteína multifuncional aparentemente relacionada com regulação da sinalização	-1,81
PSEN1	<i>presenilin 1</i>	Parte do complexo presenilina, envolvido na doença de Alzheimer	-1,76
PARK7	<i>Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7</i>	Protege neurônios do estresse oxidativo e morte celular, relacionado a doença de Parkinson	-1,75
SLC6A4	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4</i>	Codifica proteína integral de membrana que transporta o neurotransmissor serotonina	-1,73
MERTK	<i>c-mer proto-oncogene tyrosine kinase</i>	Receptor tirosina quinase que transmite sinais da matriz extracelular para o citoplasma	1,62

Discussão

7. Discussão

A comunicação bidirecional existente entre o oócito e as células do cumulus leva a uma maturação oocitária adequada que torna o oócito competente para a fertilização e desenvolvimento embrionário. Estudos mostram que COCs maturados com poucas camadas de células do cumulus ao seu redor levam a taxas de produção de blastocistos *in vitro* reduzidas quando comparados com aqueles maturados com maior número de camadas de células do cumulus. Com isso, hipotetizou-se que o número reduzido de células do cumulus durante a maturação oocitária pode afetar a maturação molecular e nuclear dos oócitos.

7.1. Quinases e Fosfatases

A família das MAPKs mediam respostas celulares a uma gama de estímulos extracelulares como fatores de crescimento, hormônios, citocinas e estresse, regulando diversos processos, tais como, crescimento e diferenciação celular, sobrevivência celular e resposta imune. A fosforilação de outras proteínas pelas MAPKs pode afetar muitos aspectos da função dessas proteínas, incluindo ligação ao DNA, estabilidade da proteína, localização celular, interação proteína-proteína e outras modificações pós-transcricionais (YANG; SHARROCK; WHITMARSH, 2013). Estudo comparando oócitos de vacas com oócitos de novilhas mostrou que a atividade da MAPK é mais baixa em oócitos de novilhas, que possuem menor competência de desenvolvimento (SALAMONE et al., 2001).

Entretanto, assim como a fosforilação, a desfosforilação também é crucial para a célula. O balanço entre as quinases e as fosfatases exerce uma função importante durante a maturação oocitária, controlando muitas atividades celulares. Devido a esse grande número de alvos, sugere-se que a expressão diminuída dos genes ACP1, MAPK1, MAPK14, PTPN2 e UCK2 e a expressão aumentada de ABL1 e MERTK em OO-COCIII esteja levando a um desbalanço celular, o que abre um leque muito amplo de alternativas quanto a menor competência de desenvolvimento destes.

7.2. Desenvolvimento complexo cumulus-oócito

Na interação existente entre oócito e células do cumulus, existem muitas trocas. Dentre os fatores secretados pelo oócito, que atuam sobre as células do cumulus, está o GDF9, um fator de crescimento crucial na fertilidade, evidenciado pelo fato de que ratas fêmeas com *knockout* homozigótico de GDF9 são estéreis devido a ausência de foliculogênese desde o folículo primário (DONG et al., 1996). O GDF9 é sintetizado no oócito em todos os estágios da foliculogênese, desde o folículo primário. Ele induz a expansão das células do cumulus por meio da expressão gênica de HAS2, PTGS2 e GREM1 (CALDER et al., 2001; ELVIN et al., 1999; PANGAS; JORGEZ; MATZUK, 2004), fatores que foram associados à competência de desenvolvimento em oócitos humanos (MCKENZIE et al., 2004).

O GDF9 não regula apenas o desenvolvimento das células do cumulus, ele atua também sobre o próprio oócito por meio da secreção de fatores parácrinos, contribuindo para os processos de maturação e aquisição de competência (HUSSEIN; THOMPSON; GILCHRIST, 2006). Ainda não é muito esclarecido o modo como as células do cumulus atuam sobre a competência de desenvolvimento do oócito. Sabe-se que o GDF9, juntamente com outros fatores, regula a obtenção de aminoácido e energia pelas células do cumulus e esses são transportados para serem utilizados no oócito (SUGIURA; EPPIG, 2005).

Ao comparar oócitos de folículos grandes com oócitos de folículos pequenos, observou-se o GDF9 teve uma expressão aumentada em oócitos provenientes de folículos grandes, indicando que a expressão desse gene está associada com competência de desenvolvimento (DONNISON; PFEFFER, 2004). Quando adicionado em meio de maturação *in vitro*, GDF9 melhorou a competência de desenvolvimento do oócito (HUSSEIN; THOMPSON; GILCHRIST, 2006).

Os nossos resultados estão em concordância com esses estudos. A expressão diminuída de GDF9 em OO-COCIII pode estar levando a uma menor competência de desenvolvimento destes, já que afeta tanto as células do cumulus quanto o próprio oócito. A adição de GDF9 no meio de maturação *in vitro* de COCIII pode levar a uma melhora na competência desses oócitos e consequentemente uma maior taxa de produção de blastocisto.

7.3. Metabolismo energético

A maturação oocitária tem uma natureza rápida e dinâmica que exige componentes como ácidos graxos, aminoácidos, eletrólitos, purinas, pirimidinas e metabólitos que podem ser obtidos por diversas vias (SUTTON-MCDOWALL; GILCHRIST; THOMPSON, 2010). A regulação do metabolismo é controlada em diversos níveis, incluindo disponibilidade de substrato, sistemas de transporte na membrana plasmática e regulação e atividade das enzimas (KRISHER, 2004).

Dentre os metabólitos, a glicose é uma das principais fontes de energia, podendo ser utilizada em diferentes vias metabólicas, tais como glicólise e via das pentoses-fosfato. Por meio da glicólise, a glicose é convertida em piruvato, e pela via das pentoses-fosfato ela é convertida em ribulose-5-fosfato.

A via das pentoses-fosfato produz, além de ribulose-5-fosfato, NADPH utilizada na biossíntese de lipídeos e esteroides, na integridade do citoplasma e no estado reduzido por meio da redução da glutatona (SUTTON-MCDOWALL; GILCHRIST; THOMPSON, 2010). PGLS (3.1.1.31), TKT (2.2.1.1) e TALDO1 (2.2.1.2) são três enzimas que participam da via das pentoses-fosfato (Figura 23). No início da via, a glicose-6-fosfato é convertida em 6-fosfogluconolactona, que é hidrolisada em 6-fosfogluconato pela PGLS (3.1.1.31), que é então transformada em ribulose-5-fosfato. Até esse ponto, temos a fase oxidativa da via das pentoses-fosfato. A partir de então, na fase não-oxidativa, a ribulose-5-fosfato, com a atuação das enzimas TKT (2.2.1.1) e TALDO1 (2.2.1.2) é transformada em intermediários da glicólise: frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Por outro lado, a xilulose-5-fosfato, um dos intermediários dessa fase não-oxidativa, pode ser convertida em fosforibosil-pirofosfato (PRPP), que entra na via da síntese de novo de purina (Figura 25).

Figura 25. Esquema geral da via das pentoses-fosfato, envolvendo a fase oxidativa e a fase não oxidativa (NELSON; COX, 2011a).

A expressão diminuída dos genes PGLS (3.1.1.31), TKT (2.2.1.1) e TALDO1 (2.2.1.2) envolvidos na via das pentoses-fosfato em OO-COCIII pode levar a uma menor eficiência dessa via nesses oócitos. A via das pentoses-fosfato é uma importante via regulatória na indução da maturação meiótica, sendo um *link* vital entre a utilização do substrato energético e o metabolismo de purinas (DOWNS; HUMPHERSON; LEESE, 1998), podendo também estar envolvida na fertilização (URNER; SAKKAS, 2005). A progressão no ciclo celular meiótico requer a atividade de TKT (2.2.1.1) já que oócitos sem essa enzima estagnaram no estágio de metáfase II com anormalidades nos cromossomos e nos fusos (KIM et al., 2012).

O mRNA codificador de duas enzimas da via das pentoses-fosfato, PGD e TALDO1, são predominantemente expressos entre os transcritos maternos, enquanto que os genes envolvidos na glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos apresentam baixa expressão até a ativação do genoma embrionário. Isso mostra que a via das pentoses-fosfato é essencial no oócito e durante as primeiras clivagens do embrião, não para a produção de piruvato, e sim

para a biossíntese de nucleotídeos (ZHENG; VASSENA; LATHAM, 2007). Entretanto, para que a via das pentoses-fosfato esteja ativa, é preciso que tenha glicose na célula.

Muitos estudos mostram que o oócito possui baixa capacidade de utilizar glicose para a produção de piruvato, necessário para o desenvolvimento. A glicose é então metabolizada pelas células do cumulus e enviada ao oócito por meio das junções *gap* (SUTTON-MCDOWALL; GILCHRIST; THOMPSON, 2010). Um estudo propõe que, além de piruvato, as células do cumulus também enviam glicose para o oócito, pelas junções *gap* (WANG et al., 2012), e essa glicose é utilizada na via das pentoses-fosfato. Sendo assim, COCIII, que possuem menos células do cumulus, talvez sejam menos competentes em enviar quantidade adequada de glicose ao oócito, que juntamente com a expressão diminuída das enzimas, pode levar a uma menor ativação da via das pentoses-fosfato.

Para agravar a possível falta de glicose, OO-COCIII apresentam expressão diminuída de SLC2A8, um transportador de glicose passivo presente em embriões bovinos pré-implantacionais (AUGUSTIN et al., 2001). Oócitos de ratas SLC2A8^{-/-} apresentaram níveis de ATP 25% mais baixos, indicando um problema no metabolismo energético, possivelmente relacionado à diminuição de captação de glicose no COC (ADASTRA et al., 2012). Uma menor quantidade de SLC2A8 leva a uma possível menor capacidade de captação de glicose, garantindo menor quantidade de substrato para a via das pentoses-fosfato.

Por outro lado, também envolvida no metabolismo energético, está a mitocôndria. Considerada a principal organela relacionada com a obtenção de energia pela célula, estima-se que mais de 90% do ATP necessário aos diversos propósitos biológicos seja produzido pela mitocôndria (NASSEH et al., 2001). A cadeia respiratória é formada por cinco complexos que residem na membrana interna da mitocôndria: complexo I ou NADH-coenzima Q oxidorreductase, complexo II ou succinato-Q oxidorreductase, complexo III ou Q-citocromo c oxidorreductase, complexo IV ou citocromo c oxidase e o complexo V ou ATP-sintase (Figura 26). Todos os complexos estão relacionados ao transporte de elétrons que cria uma energia potencial sob a forma de um gradiente de pH e de potencial elétrico através da membrana, e essa energia é utilizada na biossíntese de ATP.

Figura 26. Representação dos complexos I, II, III, IV e V (F_0 e F_1) da mitocôndria. Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de carregadores assimetricamente arranjados na membrana interna. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana, produzindo tanto um gradiente químico quanto um gradiente elétrico. A força próton-motriz que direciona os prótons de volta para a matriz proporciona a energia para a síntese de ATP, catalisada pelo complexo V (NELSON; COX, 2011b).

Os genes *NDUFS7*, *NDUFA2*, *NDUFA5*, *NDUFS5*, *NDUFB9*, *NDUFA11*, *NDUFS6*, *NDUFA7*, *NDUFB2* e *NDUFA8* estão relacionados com o complexo I, o gene *UQCRC1* está relacionado com o complexo III, os genes *COX17*, *COX7A2*, *COX6A1*, *COX6C*, *COX4I1* e *COX5B* com o complexo IV e os genes *ATP5H* e *ATP5J2* estão relacionados com o complexo V (Figura 21). Todos esses DEGs estão com expressão diminuída em OO-COCIII, o que pode levar a uma possível alteração no funcionamento da cadeia respiratória e consequentemente uma deficiência na obtenção de energia pelo oócito. Uma falha na produção de ATP pelo oócito leva consequentemente a uma alteração nos processos celulares que dependem de energia, tais como síntese de macromoléculas, fosforilação de proteínas, transporte de íons, entre outros (SU et al., 2007).

O GPX4 exerce uma função central na detoxificação de peróxidos por meio da GSH (FUJII; IUCHI; OKADA, 2005). O *knockout* do GPX4 citosólico é letal no embrião, mostrando que ele não é apenas uma enzima antioxidante. Em adultos, o *knockout* do GPX4 citosólico leva a uma diminuição da função mitocondrial e aumento de apoptose em células do fígado (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2012). A expressão diminuída desse gene em OO-COCIII é um indicativo, juntamente com os genes relacionados aos complexos da cadeia respiratória, que as funções da mitocôndria podem estar alteradas, impossibilitando a liberação de uma quantidade de energia adequada, além de sinalizar uma via celular de

apoptose na célula. Com isso, OO-COCI teriam uma quantidade de energia adequada para os processos celulares enquanto os OO-COCIII teriam uma falha na aquisição dessa energia, o que poderia levar a uma dificuldade nos processos dependentes de energia.

Juntamente com as glutatonas peroxidases, as peroxirredoxinas, as superóxido dismutases e as catalases atuam na célula para protegê-la do estresse oxidativo. PRDX2, assim como GPX4 possui expressão diminuída nos OO-COCIII. Os genes dessa família estão envolvidos na defesa antioxidante e na sinalização intracelular. A expressão do transcrito do gene PRDX6 teve sua expressão aumentada durante a maturação *in vitro* (LEYENS; KNOOPS; DONNAY, 2004). Mais estudos são necessários para compreender tanto a atuação de PRDX2 quanto de PRDX6 na maturação *in vitro* e sua relação com oócitos competentes. A defesa antioxidante é essencial durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, e especialmente durante a fertilização devido a descondensação do espermatozoide que requer a redução da protamina pela glutatona.

7.4. Retomada da meiose

Durante a maturação oocitária, os oócitos deixam o estágio de prófase I e avançam no ciclo celular até o estágio de metáfase II, quando o ciclo celular é novamente estagnado. Vários fatores moleculares estão envolvidos nessa segunda paralização do ciclo celular, em especial o CSF que é responsável pela estabilização do complexo ciclina B/CDC2, conhecido como MPF. O CSF previne a transição para o estágio de anáfase até que a fertilização ocorra (MASUI, 2001).

Além disso, a transição metáfase-anáfase é controlada por eventos de fosforilação que influenciam na afinidade dos componentes do complexo promotor da anáfase (APC). FBXO5/EMI1 é um inibidor essencial do APC na metáfase. FBXO5/EMI1 é fosforilado por p90^{Rsk2}, que é ativado pela via Mos durante a maturação oocitária. Quando fosforilado, FBXO5/EMI1 aumenta sua afinidade por CDC20, prevenindo a ativação de APC, já que esta depende da presença de CDC20, permitindo que o ciclo celular fique estagnado em metáfase II (PARONETTO et al., 2004).

O bloqueio pelo CSF é mantido por um balanço fino entre as concentrações de FBXO5/EMI1 e CDC20 e a alteração desse balanço pode levar à transição metáfase-anáfase.

A expressão diminuída do gene FBXO5/EMI1 em OO-COCIII pode estar causando um desbalanço, que leva a uma maior quantidade, em proporção, do gene CDC20, levando a ativação de APC e um desenvolvimento partenogenético dos OO-COCIII.

7.5. Processamento do RNA

Durante o crescimento do oócito, este armazena mRNAs que serão utilizados durante o desenvolvimento embrionário inicial, até a ativação do genoma do embrião. A síntese de proteínas após a retomada da meiose é dependente dos estoques maternos de mRNA adquiridos durante o crescimento do oócito. Para isso, uma grande maquinaria na célula precisa ser recrutada para produzir esses RNAs e transformá-los em proteínas.

As RNA helicases DEAD-box são enzimas que podem desenrolar a fita dupla dos ácidos nucleicos de uma maneira dependente de energia e estão envolvidas em praticamente todas as etapas do metabolismo do RNA, incluindo transcrição, *splicing*, transporte do RNA para fora do núcleo, biogênese do ribossomo, início da transcrição ou degradação do mRNA (ROCAK; LINDER, 2004). Dentre as RNA helicases conhecidas, a DDX1 é uma proteína nuclear expressa em muitos tipos celulares na fase inicial do desenvolvimento, que se torna restrita após esse período, indicando uma atuação específica na diferenciação de células. Já a DDX39/URH49 é uma RNA helicase associada ao crescimento, envolvida no processamento e transporte do pré-mRNA (GUSTAFSON; WESSEL, 2010).

As duas RNA helicases citadas acima estão com expressão diminuída em OO-COCIII, sendo que DDX39/URH49 possui o segundo maior *fold-change*. Muitos estudos mostram que DDX39/URH49 é 90% idêntico a DDX39B/UAP56. Um estudo que avaliou o perfil de mRNA quando comparadas células *HeLa* tratadas com DDX39/URH49 siRNA ou DDX39B/UAP56 siRNA verificou que mais de 99% dos mRNA analisados foram igualmente afetados por cada um dos tratamentos, indicando que esses dois genes possuem os mesmos alvos. Entretanto, quando estimulada a crescer, o nível de DDX39/URH49 mRNA aumenta de três a cinco vezes na célula, enquanto o nível de DDX39B/UAP56 mRNA altera muito pouco, mostrando que a síntese do mRNA desses genes é diferente diante de um estímulo exterior (KAPADIA et al., 2006).

Os estudos sobre DDX39B/UAP56 estão mais avançados que os estudos sobre DDX39/URH49. Estudos mostram que DDX39B/UAP56 é essencial para exportar RNA poli-A do núcleo para o citoplasma. E a depleção desse gene nesses organismos leva a um acúmulo de RNA poli-A no núcleo, inibe o crescimento e leva a morte celular (GATFIELD et al., 2001; JENSEN et al., 2001; MACMORRIS; BROCKER; BLUMENTHAL, 2003; STRÄSSER; HURT, 2001). Mais estudos são necessários para compreender a exata função desse gene em oócitos, em especial, durante sua maturação.

Estando relacionado ao metabolismo de RNA e sabendo que oócitos armazenam grandes quantidades de mRNA para futura tradução durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial, o gene DDX39/URH49 pode estar exercendo alguma atividade essencial no metabolismo de RNA, e sua menor expressão em OO-COCIII pode estar causando uma deficiência quanto ao processamento do RNA. Por outro lado, diante do fato que esse gene possui maiores taxas de transcrição quando a célula recebe um estímulo de crescimento pode ser um indício que os sinais passados ao oócito pelas células do cumulus podem levar a um aumento da transcrição desse gene antes da retomada da meiose. Em COCI, um maior número de células do cumulus leva a um sinal mais intenso de crescimento, que consequentemente pode levar a maiores taxas de transcrição de DDX39/URH49 quando comparados com COCIII, com menor quantidade de células do cumulus.

7.6. Tradução e processamento das proteínas

Após a transcrição e processamento do RNA, a tradução é um dos mecanismos utilizados para controlar a expressão gênica em eucariotos, atuando no crescimento, proliferação e desenvolvimento celular. As taxas de tradução podem ser controladas em cada uma das três etapas: iniciação, elongação e finalização, sendo que a regulação ocorre predominantemente na iniciação, quando ribossomos e fatores de tradução são recrutados (GINGRAS; RAUGHT; SONENBERG, 1999). A falta de algum desses componentes pode vir a dificultar ou até impossibilitar o processo de tradução.

Os resultados mostraram que OO-COCIII possuem uma expressão diminuída dos genes EIF3F, EIF2B3, EIF3G, que são fatores de iniciação da tradução em eucariotos. Os genes RPL7, RPL7L1, RPL26, RPL10A, RPL38, RPL18 e RPL13 que codificam proteínas

ribossomais da subunidade 60S e os genes RPS3A e FAU da subunidade 40S também estão com expressão diminuída em OO-COCIII (Figura 22).

Para que o processo de tradução se inicie, são formados três complexos: o complexo EIF2/Met-tRNA, o complexo EIF3/40S e o complexo EIF4/mRNA. Esses complexos vão se agrupando e a subunidade 60S é incorporada, formando o ribossomo 80S. Portanto, uma falta dos EIFs e das proteínas que formam as subunidades 40S e 60S do ribossomo pode ser um indício que o processo de tradução nem sempre ocorre, o que pode indicar que alguns mRNAs não são traduzidos no momento em que a proteína é necessária para a célula, prejudicando o desenvolvimento desta. Essa possível falha na tradução pode vir a afetar tanto o oócito quanto o embrião em seu período inicial de desenvolvimento.

Por outro lado, o gene PAIP2 participa indiretamente do complexo EIF4/mRNA, atuando como repressor do PABP. O PABP se liga a um dos componentes do complexo EIF4 levando a circularização das extremidades 3' e 5' do mRNA, facilitando o recrutamento do complexo EIF3/40S. O PAIP1 atua como coativador de PABP, levando à tradução. Uma das formas de atuação de PAIP2 é competindo com o PAIP1 pela ligação ao PABP. Quando eles se ligam, supõe-se que PAIP2 leve a um rearranjo conformacional em PABP diminuindo sua afinidade pelo mRNA (KHALEGHPOUR et al., 2001; SIEMER et al., 2009). Seria esperado que PAIP2 tivesse uma expressão aumentada em OO-COCIII, já que ele inibe a tradução. Porém, observa-se que esse gene possui uma expressão diminuída em OO-COCIII. Mais estudos são necessários para compreender a atuação desse gene em oócitos bovinos.

Após serem traduzidas, as proteínas precisam ser levadas ao seu destino final. As *heat shock proteins* (HSPs) previnem o empacotamento inapropriado das proteínas e mediam o transporte de proteínas imaturas ou errôneas para organelas específicas para seu enovelamento final, degradação ou reparo (HARTL; HAYER-HARTL, 2002; WALTER; BUCHNER, 2002), além de proteger a célula diante de diferentes condições de estresse (NOLLEN; MORIMOTO, 2002). O fato das HSPs serem essenciais no enovelamento, estabilidade e localização das novas proteínas sintetizadas presume que essas proteínas são fundamentais na apoptose, diferenciação celular e regulação do ciclo celular (LANNEAU et al., 2007; LUFT; DIX, 1999), atuando também como receptor nuclear (PRATT et al., 2004).

A expressão de várias HSPs durante a embriogênese indica que essas levam a um número apropriado de células no embrião, o que depende do balanço entre proliferação, diferenciação e apoptose (RUPIK et al., 2011). A expressão das HSPs é regulada pelos HSFs (*heat shock transcription factors*), em especial a transcrição induzida por estresse.

Interessantemente, alguns tipos celulares, entre eles oócitos pré-ovulatórios e alguns estágios do desenvolvimento embrionário, não possuem a resposta ao estresse térmico, sendo hipersensíveis a hipertermia (AL-KATANANI; HANSEN, 2002; CURCI; BEVILACQUA; MANGIA, 1987; MORANGE et al., 1984). Mecanismos elaborados protegem a célula contra efeitos adversos ou iniciam um programa de morte celular quando a integridade do genoma do gameta não é mais garantida (CHRISTIANS et al., 2003).

As HSPs são divididas em diversas famílias, entre elas a HSP40, HSP70 e HSP90. O gene HSP90AA1 pertence a família HSP90 e foi proposto que seria um regulador da maturação folicular por meio de sua ação nas aromatases (DRIANCOURT et al., 1999). É bem estabelecido que a hidrólise de ATP é necessária para a atividade de HSP70 e que HSP40 estimula a atividade ATPase e estabiliza a interação de HSP70 com seu substrato (QIU et al., 2006). Os genes HSPA5 e HSPA1A pertencem a família HSP70 e o gene DNAJC6 pertence a família HSP40.

A expressão de HSPA5 foi maior em blastocistos quando comparados com embriões degenerados (ZHANG et al., 2011) e um estudo que adicionou anticorpos para HSP70 encontrou uma menor taxa de produção de embriões bovinos, indicando que a família HSP70 está envolvida no correto desenvolvimento embrionário (AL-KATANANI; HANSEN, 2002). Outro estudo mostrou que a presença do anticorpo para HSP70 reduziu significativamente as taxas de ligação do espermatozoide à zona pelúcida de oócitos bovinos e interrompeu a finalização da meiose II e formação do pronúcleo (MATWEE et al., 2001). A resposta do gene HSPA1A ao estresse oxidativo foi verificada em um estudo que comparou embriões cultivados *in vitro* e *in vivo*. Os embriões cultivados *in vitro* apresentaram maiores níveis de HSPA1A, refletindo um importante mecanismo de proteção contra o ambiente (LAZZARI et al., 2002).

Os genes HSPA5, HSP90AA1, HSPA1A e DNAJC6, citados anteriormente, possuem expressão diminuída em OO-COCIII, indicando que a expressão adequada desses genes e sua atuação sobre o enovelamento, estabilidade e localização das novas proteínas sintetizadas, e consequentemente, apoptose, diferenciação celular e regulação do ciclo celular podem ser importantes contribuintes do sucesso da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial em OO-COCI.

O gene HSF2 está ativo durante o desenvolvimento embrionário e espermatogênese, e foi proposto que exerce uma função regulatória na transcrição de alguns genes do cromossomo Y para a diferenciação espermática (AKERFELT et al., 2008). A deficiência de

HSF2 em embriões de ratos levou a um aumento na letalidade embrionária e os que sobreviveram apresentaram fertilidade reduzida nas fêmeas e defeitos na espermatogênese nos machos. Entretanto, esses defeitos não foram associados a uma expressão alterada dos genes HSPs (WANG et al., 2003). A expressão de HSF2 está aumentada em OO-COCIII, porém, mais estudos serão necessários para compreender a atuação desse gene em oócitos.

7.7. Apoptose

O oócito precisa de um sistema muito bem coordenado de atividades para conseguir manter a homeostase celular. Além de manter o metabolismo da célula adequado para prover energia, uma maquinaria de transcrição e tradução condizentes com a necessidade da célula, o oócito ainda precisa manter o equilíbrio entre os genes que promovem a sobrevivência e aqueles que levam a apoptose.

A apoptose é induzida por diferentes estímulos ambientais, como tratamentos com drogas, fatores apoptóticos, injúria celular, irradiação, infecção viral e privação de fatores de crescimento (ROTHBARTH et al., 1999). Qualquer um desses fatores pode levar a ativação de um programa genético que culmina na morte celular programada. O gene C1D codifica uma proteína de localização nuclear envolvida em vários processos celulares, tais como transcrição, processamento do RNA, reparo do DNA, morte celular e condensação do cromossomo (SJAKSTE et al., 2012). Apesar de sua presença na célula em níveis fisiológicos ser provavelmente essencial, quando presente em quantidades adicionais leva a morte celular. Entretanto, o nível de expressão é diferente para os diferentes tipos celulares, sendo que os níveis de necessidade e tolerância da proteína C1D podem variar (ROTHBARTH et al., 1999). Apesar de não constar na literatura trabalhos em oócitos, o C1D pode vir a estar relacionado com a apoptose nesse tipo celular. Sua expressão aumentada em OO-COCIII pode estar levando ao desencadeamento de uma morte celular devido à falta de fatores de crescimento transmitidos ao oócito pelas células do cumulus. Mais estudos são necessários para compreender a função desse gene em oócitos bovinos.

Conclusão

8. Conclusão

Nossos resultados sugerem que a competência de desenvolvimento do oócito pode ser uma característica quantitativa, ou seja, pequenas alterações no nível de mRNA de vários genes podem tornar o oócito menos competente (DONNISON; PFEFFER, 2004). No geral, um menor número de células do cumulus ao entorno do oócito durante a maturação *in vitro* afetou o perfil de expressão dos OO-COCIII como pode ser observado pelo número de genes (n=446) que obtiveram expressão alterada em relação ao OO-COCI. Alguns desses genes estão envolvidos em vários processos biológicos básicos que são pertinentes a retomada da meiose, metabolismo do oócito e maturação molecular, o que corrobora a ideia de que uma grande quantidade de células do cumulus interagindo com o oócito é crucial para a competência de desenvolvimento. Por outro lado, a maioria dos genes identificados não é caracterizada ou suas funções relacionadas ao desenvolvimento e maturação do oócito ainda são desconhecidas ou pouco estudadas, dificultando uma compreensão mais completa dos efeitos da interação entre oócito e células do cumulus.

Referências

Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASTRA, K. L. et al. Slc2a8 deficiency in mice results in reproductive and growth impairments. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 2, p. 49, ago. 2012.

AKERFELT, M. et al. Promoter ChIP-chip analysis in mouse testis reveals Y chromosome occupancy by HSF2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 32, p. 11224-9, 12 ago. 2008.

AKTAS, H.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; FIRST, N. L. Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. **Molecular reproduction and development**, v. 65, n. 3, p. 336-43, jul. 2003.

AL-KATANANI, Y. M.; HANSEN, P. J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Molecular reproduction and development**, v. 62, n. 2, p. 174-80, jun. 2002.

ARLOTTO, T. et al. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and developmental of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 943-956, 1996.

ASSOU, S. et al. The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. **Human reproduction**, v. 21, n. 7, p. 1705-19, jul. 2006.

AUGUSTIN, R. et al. Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 60, n. 3, p. 370-6, nov. 2001.

BACHVAROVA, R. F. A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. **Cell**, v. 69, n. 6, p. 895-7, 12 jun. 1992.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

BETTEGOWDA, A. et al. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogen. **Molecular reproduction and development**, v. 73, n. 3, p. 267-78, mar. 2006.

BETTEGOWDA, A. et al. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 2, p. 301-9, ago. 2008.

BIASE, F. H. et al. Global poly(A) mRNA expression profile measured in individual bovine oocytes and cleavage embryos. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 16, n. 1, p. 29-38, fev. 2008.

- BILODEAU-GOESEELS, S.; SCHULTZ, G. A. Changes in ribosomal ribonucleic acid content within in vitro-produced bovine embryos. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 5, p. 1323-9, maio. 1997.
- BINELLI, M.; MURPHY, B. D. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 1, p. 1-12, jan. 2010.
- BOURGON, R.; GENTLEMAN, R.; HUBER, W. Independent filtering increases detection power for high-throughput experiments. **PNAS**, v. 107, n. 21, p. 9546-9551, 2010.
- BREITLING, R. et al. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. **FEBS letters**, v. 573, n. 1-3, p. 83-92, 27 ago. 2004.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et biophysica acta**, 29 nov. 2012.
- CALDER, M. D. et al. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2)(PGE(2)) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE(2) induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 1, p. 135-40, jul. 2001.
- CECCONI, S.; D'AURIZIO, R.; COLONNA, R. Role of antral follicle development and cumulus cells on in vitro fertilization of mouse oocytes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 107, n. 2, p. 207-14, jul. 1996.
- CETICA, P. et al. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**, v. 124, p. 675-681, 2002.
- CETICA, P. et al. Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**, v. 126, p. 753-763, 2003.
- CHRISTIANS, E. S. et al. Heat shock proteins in mammalian development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 14, n. 5, p. 283-290, out. 2003.
- CUI, X.-S. et al. Maternal gene transcription in mouse oocytes: genes implicated in oocyte maturation and fertilization. **The Journal of reproduction and development**, v. 53, n. 2, p. 405-18, abr. 2007.
- CURCI, A.; BEVILACQUA, A.; MANGIA, F. Lack of Heat-Shock Response in Preovulatory. **Developmental biology**, v. 123, p. 154-160, 1987.
- DALBIES-TRAN, R.; MERMILLODD, P. Use of Heterologous Complementary DNA Array Screening to Analyze Bovine Oocyte Transcriptome and Its Evolution During In Vitro Maturation. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 252-261, 14 out. 2003.
- DAMIANI, P. et al. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 45, n. 4, p. 521-34, dez. 1996.

- DE LOOS, F. et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, n. 2, p. 197-204, 1989.
- DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1420-5, dez. 1997.
- DONG, J. et al. Growth differentiation factor-9 is require during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531-535, 1996.
- DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1813-21, dez. 2004.
- DOWNS, S. M.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 4, p. 1084-94, abr. 1998.
- DRIANCOURT, M. A. et al. Presence of an aromatase inhibitor, possibly heat shock protein 90 , in dominant follicles of cattle. **Journal of reproduction and fertility**, v. 115, p. 45-58, 1999.
- EICHENLAUB-RITTER, U.; PESCHKE, M. Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. **Human reproduction update**, v. 8, n. 1, p. 21-41, 2002.
- ELIS, S. et al. Search for the genes involved in oocyte maturation and early embryo development in the hen. **BMC genomics**, v. 9, p. 110-130, jan. 2008.
- ELVIN, J. A et al. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 13, n. 6, p. 1035-48, jun. 1999.
- EPPIG, J. J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 13, n. 11, p. 569-74, nov. 1991.
- EPPIG, J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmatic maturation in eutherian mammals. **Reprod Fertil Dev**, v. 8, n. 4, p. 485-9, 1996.
- FAIR, T. et al. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and embryology**, v. 195, n. 4, p. 327-36, abr. 1997.
- FAIR, T. et al. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 67, n. 2, p. 136-44, fev. 2004.
- FAIR, T. et al. Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S91-7, 1 set. 2007.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-48, 15 mar. 2009.

FUJII, J.; IUCHI, Y.; OKADA, F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 3, p. 43, jan. 2005.

GATFIELD, D. et al. The DExH / D box protein HEL / UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. **Current biology**, v. 11, p. 1716-1721, 2001.

GERSHON, E.; PLAKS, V.; DEKEL, N. Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 282, n. 1-2, p. 18-25, 30 jan. 2008.

GILBERT, S. F. A saga da linhagem germinativa (capítulo 22). In: **Biologia do Desenvolvimento**. 5^a. ed. Ribeirão Preto, SP: Funpec, 2003. p. 843-882.

GILCHRIST, R. B. et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of cell science**, v. 119, n. Pt 18, p. 3811-21, 15 set. 2006.

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

GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annual review of biochemistry**, v. 68, p. 913-63, jan. 1999.

GOUD, P. T. et al. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 13, n. 6, p. 1638-44, jun. 1998.

GUSTAFSON, E. A.; WESSEL, G. M. DEAD-box helicases: posttranslational regulation and function. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 395, n. 1, p. 1-6, 23 abr. 2010.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, p. 1852-8, 8 mar. 2002.

HASHIMOTO, S. et al. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 49, p. 1451-1463, 1998.

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

HENRIET, L. et al. Quantitative Distribution of DNA and RNA A Direct in the Bovine Method Ovocyte : A direct ultramicrospectrophotometric method. **Biology of reproduction**, v. 22, p. 879-885, 1980.

HERRICK, J. R.; BRAD, A. M.; KRISHER, R. L. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation in vitro. **Reproduction**, v. 131, p. 289-298, 2006.

HUSSEIN, T. S. et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 22, p. 5257-68, 15 nov. 2005.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental biology**, v. 296, n. 2, p. 514-21, 15 ago. 2006.

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

HYTTEL, P. Electron microscopy of mammalian oocyte developmental, maturation and fertilization. In: **Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event**. [S.l.: s.n.]. p. 1-37.

IRIZARRY, R. A. et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 4, p. e15, 15 fev. 2003.

JENSEN, T. H. et al. The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. **Current biology**, v. 11, p. 1711-5, 30 out. 2001.

JOHNSON, W. E.; LI, C.; RABINOVIC, A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. **Biostatistics (Oxford, England)**, v. 8, n. 1, p. 118-27, jan. 2007.

KA, H. H. et al. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. **Biol Reprod**, v. 57, n. 6, p. 1478-1483, 1997.

KAPADIA, F. et al. Nuclear localization of poly(A)⁺ mRNA following siRNA reduction of expression of the mammalian RNA helicases UAP56 and URH49. **Gene**, v. 384, p. 37-44, 15 dez. 2006.

KATZ-JAFFE, M. G. et al. Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 939-46, 1 abr. 2009.

KHALEGHPOUR, K. et al. Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. **Molecular cell**, v. 7, n. 1, p. 205-16, jan. 2001.

KHATIR, L. et al. Prepuberal bovine oocytes - a negative model for studying oocyte developmental competence. **Mol Reprod Dev**, v. 45, n. 2, p. 231-9, 1996.

KIM, Y. et al. Function of the pentose phosphate pathway and its key enzyme, transketolase, in the regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. **Clinical and experimental reproductive medicine**, v. 39, n. 2, p. 58-67, jun. 2012.

- KOCABAS, A. M. et al. The transcriptome of human oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 38, p. 14027-32, 19 set. 2006.
- KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journa**, v. 82, p. E14-23, 2004.
- LANNEAU, D. et al. Apoptosis Versus Cell Differentiation - Role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. **Prion**, v. 1, n. 1, p. 53-60, 2007.
- LAZZARI, G. et al. Cellular and Molecular Deviations in Bovine In Vitro-Produced Embryos Are Related to the Large Offspring Syndrome. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 3, p. 767-775, 1 set. 2002.
- LEDDA, S. et al. Cell coupling and maturation-promoting factor activity in in vitro-matured prepubertal and adult sheep oocytes. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 1, p. 247-52, jul. 2001.
- LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro. **J Anim Sci**, v. 48, p. 76-86, 1979.
- LEMES, R. C. **Efeito da qualidade morfológica do oócito bovino na cinética de desenvolvimento embrionário in vitro (Monografia)**. [S.l.] Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.
- LEQUARRE, A. S. et al. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 2, p. 425-31, ago. 2004.
- LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 69, n. 3, p. 243-51, nov. 2004.
- LI, R. et al. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 3, p. 839-45, set. 2000.
- LUFT, J. C.; DIX, D. J. Hsp70 during function expression and embryogenesis. **Cell Stress & Chaperones**, v. 4, n. 3, p. 162-170, 1999.
- MACMORRIS, M.; BROCKER, C.; BLUMENTHAL, T. UAP56 levels affect viability and mRNA export in *Caenorhabditis elegans*. **RNA**, v. 9, p. 847-857, 2003.
- MASUI, Y. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). **Differentiation**, v. 69, n. 1, p. 1-17, dez. 2001.
- MATWEE, C. et al. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. **Molecular human reproduction**, v. 7, n. 9, p. 829-37, set. 2001.

MATZUK, M. M.; LAMB, D. J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. **Nature medicine**, v. 14, n. 11, p. 1197-213, nov. 2008.

MCKENZIE, L. J. et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. **Human reproduction**, v. 19, n. 12, p. 2869-74, dez. 2004.

MEIRELLES, F. V et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 13-20, 2004.

MISIRLIOGLU, M. et al. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 50, p. 18905-10, 12 dez. 2006.

MORANGE, M. et al. Altered expression of heat shock proteins in embryonal carcinoma and mouse early embryonic cells. **Molecular and cellular biology**, v. 4, n. 4, p. 730-5, abr. 1984.

MOUROT, M. et al. The Influence of Follicle Size , FSH-Enriched Maturation Medium , and Early Cleavage on Bovine Oocyte Maternal mRNA Levels. **Molecular reproduction and development**, v. 73, p. 1367-1379, 2006.

NASSEH, I. E. et al. Doenças Mitocondriais. **Revista Neurociências**, v. 9, n. 2, p. 60-69, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Glicólise, Gliconeogênese e Via das Pentoses-Fosfato (capítulo 14). In: **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5^a. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2011a. p. 1304.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Fosforilação Oxidativa e Fotofosforilação (capítulo 19). In: **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5^a. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2011b. p. 1304.

NOLLEN, E. A A; MORIMOTO, R. I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. **Journal of cell science**, v. 115, p. 2809-16, 15 jul. 2002.

O'BRIEN, J. K. et al. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. **Reprod Fertil Dev**, v. 8, n. 7, p. 1029-37, 1996.

OLSZAŃSKA, B.; BORGUL, A. Maternal RNA content in oocytes of several mammalian and avian species. **The Journal of experimental zoology**, v. 265, n. 3, p. 317-20, 1 mar. 1993.

OTT, M. et al. Mitochondria , oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 913-922, 2007.

PACKER, A. I. et al. The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. **Developmental biology**, v. 161, p. 194-205, 1994.

- PANGAS, S. A; JORGEZ, C. J.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32281-6, 30 jul. 2004.
- PARONETTO, M. P. et al. Functional interaction between p90Rsk2 and Emi1 contributes to the metaphase arrest of mouse oocytes. **The EMBO journal**, v. 23, p. 4649-59, 24 nov. 2004.
- PATEL, O. V et al. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction**, v. 133, p. 95-106, jan. 2007.
- PAYTON, R. R. **Direct Effects of Heat Stress During Meiotic Maturation on Bovine Oocyte and Cumulus RNA (Thesis)**. [S.l.] University of Tennessee, Knoxville, 2009.
- POINTIS, G. et al. Gap junctional communication in the male reproductive system. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1719, n. 1-2, p. 102-16, 20 dez. 2005.
- PONTES, J. H. F. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690-7, 1 mar. 2009.
- PONTES, J. H. F. 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**, v. 75, n. 9, p. 1640-6, jun. 2011.
- PRATT, W. B. et al. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. **Essays Biochem**, v. 40, p. 41-58, 2004.
- QIU, X.-B. et al. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 63, n. 22, p. 2560-70, nov. 2006.
- RAMALHO-SANTOS, J. et al. Mitochondrial functionality in reproduction : from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. **Human reproduction update**, v. 15, n. 5, p. 553-572, 2009.
- REVEL, F. et al. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of reproduction and fertility**, v. 103, n. 1, p. 115-20, jan. 1995.
- REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Growth and developmental of the corpus luteum. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 54, p. 181-91, 1999.
- RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N. M. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. **Journal of reproduction and fertility**, v. 100, n. 1, p. 257-62, jan. 1994.
- ROCAK, S.; LINDER, P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 3, p. 232-41, mar. 2004.

- ROTHBARTH, K. et al. Induction of apoptosis by overexpression of the DNA-binding and DNA-PK-activating protein C1D. **Journal of cell science**, v. 112, p. 2223-32, jul. 1999.
- RUPIK, W. et al. The expression patterns of heat shock genes and proteins and their role during vertebrate's development. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 159, n. 4, p. 349-66, ago. 2011.
- SALAMONE, D. F. et al. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1761-8, jun. 2001.
- SANTOS, P. et al. Bovine oocyte quality in relation to ultrastructural characteristics of zona pellucida, polyspermic penetration and developmental competence. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 43, n. 6, p. 685-9, dez. 2008.
- SAVIO, J. D. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J Reprod Fertil**, v. 83, p. 663-671, 1988.
- SCHROEDER, A. et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC molecular biology**, v. 7, n. 3, jan. 2006.
- SELA-ABRAMOVICH, S. et al. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. **Endocrinology**, v. 147, n. 5, p. 2280-6, maio. 2006.
- SHAMIR, R. et al. EXPANDER - an integrative program suite for microarray data analysis. **BMC bioinformatics**, v. 6, p. 232, jan. 2005.
- SIEMER, C. et al. Analysis of mRNA associated factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development. **Molecular reproduction and development**, v. 76, n. 12, p. 1208-19, dez. 2009.
- SIMON, A. M. et al. Female infertility in mice lacking connexin 37. **Nature**, v. 385, p. 525-529, 1997.
- SIRARD, M. A. Genomic regulation through RNA in oocyte maturation of large mammals. In: **Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event**. [S.l: s.n.]. p. 71-79.
- SIRARD, M.-A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-36, 7 jan. 2006.
- SJAKSTE, N. et al. Tightly bound to DNA proteins: possible universal substrates for intranuclear processes. **Gene**, v. 492, n. 1, p. 54-64, 15 jan. 2012.
- STAIGMILLER, R. B.; MOOR, R. M. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. **Gamete Research**, v. 9, n. 2, p. 221-229, 1984.

STRÄSSER, K.; HURT, E. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. **Nature**, v. 413, n. 6856, p. 648-52, 11 out. 2001.

SU, Y. et al. Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. **Developmental biology**, v. 302, p. 104-117, 2007.

SUGIURA, K.; EPPIG, J. J. Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2005. Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. **Reproduction, fertility, and development**, v. 17, n. 7, p. 667-74, jan. 2005.

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**, v. 9, n. 1, p. 35-48, 1 jan. 2003.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, n. 4, p. 685-95, abr. 2010.

TANGHE, S. et al. Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 135-149, 2003.

TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 3, p. 805-10, set. 2000.

TESFAYE, D. et al. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. **Reproduction, fertility, and development**, v. 21, n. 3, p. 451-61, jan. 2009.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative Analysis of Protein Synthesis , Transcription and Cytoplasmic Polyadenylation of mRNA during Maturation of Bovine Oocytes in vitro. **Reprod Dom Anim**, v. 37, p. 86-91, 2002.

TUSHER, V. G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 9, p. 5116-21, 24 abr. 2001.

URNER, F.; SAKKAS, D. Involvement of the pentose phosphate pathway and redox regulation in fertilization in the mouse. **Molecular reproduction and development**, v. 70, n. 4, p. 494-503, abr. 2005.

VOZZI, C. et al. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 619-28, out. 2001.

WALTER, S.; BUCHNER, J. Molecular chaperones - cellular machines for protein folding. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 41, n. 7, p. 1098-113, 2 abr. 2002.

WANG, G. et al. Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. **Genesis**, v. 36, n. 1, p. 48-61, maio. 2003.

- WANG, Q. et al. An intercellular pathway for glucose transport into mouse oocytes. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 302, n. 12, p. E1511-8, 15 jun. 2012.
- YANG, S.-H.; SHARROCKS, A. D.; WHITMARSH, A. J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. **Gene**, v. 513, n. 1, p. 1-13, 15 jan. 2013.
- ZENG, F.; BALDWIN, D. A; SCHULTZ, R. M. Transcript profiling during preimplantation mouse development. **Developmental biology**, v. 272, n. 2, p. 483-96, 15 ago. 2004.
- ZHANG, B. et al. Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 8, p. 4174-82, ago. 2011.
- ZHANG, L. et al. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo developmental in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 40, n. 3, p. 338-44, 1995.
- ZHENG, P.; VASSENA, R.; LATHAM, K. E. Effects of in vitro oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos. **Molecular human reproduction**, v. 13, n. 6, p. 361-71, jun. 2007.

Anexos

ANEXO A

Lista de genes com expressão aumentada em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I. DEGs selecionados pelos métodos SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) e RP (*Rank Products*), ambos com $p\text{-value} < 0,05$ corrigidos por FDR (*False Discovery Rate*).

*A palavra gene foi utilizada com sinônimo de transcrito por questão de simplicidade. Os genes em questão apresentam mais de um transcrito diferencialmente expressos.

Genes que não foram utilizados na análise funcional *in silico* pelo *Ingenuity Pathway Analysis*

ProbeSet ID	Símbolo gene	Nome gene	Fold Change
Bt.25807.2.S1_at	ABL1	<i>c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>	1,74
Bt.401.1.S1_at	ACBD5	<i>acyl-Coenzyme A binding domain containing 5</i>	1,82
Bt.18038.1.A1_at	ADO	<i>2-aminoethanethiol (cysteamine) dioxygenase</i>	1,68
Bt.9715.1.S1_at	AEBP2	<i>AE binding protein 2</i>	1,84
Bt.6775.1.S1_at	ANXA3	<i>annexin A3</i>	1,78
Bt.16683.1.S1_at	C1D	<i>C1D nuclear receptor co-repressor</i>	2,34
Bt.16826.1.A1_s_at	CCNC	<i>cyclin C</i>	1,61
Bt.25171.1.A1_at	HSF2	<i>heat shock transcription factor 2</i>	1,76
Bt.14566.2.S1_at	ICK #	<i>intestinal cell (MAK-like) kinase</i>	1,67
Bt.18332.1.S1_at	LAMA2 // LOC100138434	<i>laminin, alpha 2 // similar to laminin, alpha 2 (merosin, congenital muscular dystrophy)</i>	1,63
Bt.13850.1.A1_at	LYPLA1	<i>lysophospholipase I</i>	1,80
Bt.22026.1.S1_at	MERTK	<i>c-mer proto-oncogene tyrosine kinase</i>	1,62
Bt.11832.2.A1_at	PPP2R5E #	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B', epsilon isoform</i>	1,72
Bt.18166.1.A1_at	RAB11FIP2	<i>RAB11 family interacting protein 2 (class I)</i>	1,67
Bt.6666.1.S1_at	RNF11	<i>RING finger protein 11</i>	1,69
Bt.22143.1.A1_at	SYT4	<i>synaptotagmin IV</i>	1,63
Bt.3589.1.S1_at	TLE1 #	<i>transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)</i>	1,62
Bt.28172.1.S1_at	VSIG1	<i>V-set and immunoglobulin domain containing 1</i>	1,83
Bt.11096.1.S1_at	--- #	---	1,61
Bt.17444.1.S1_at	--- #	---	1,64
Bt.27648.1.	--- #	---	1,63

A1_at			
Bt.7128.1.S	---	#	
l_at		---	1,65

ANEXO B

Lista de genes com expressão diminuída em oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau III comparado com os oócitos advindos de complexos cumulus-oócito de qualidade morfológica grau I. DEGs selecionados pelos métodos SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) e RP (*Rank Products*), ambos com $p\text{-value} < 0,05$ corrigidos por FDR (*False Discovery Rate*).

*A palavra gene foi utilizada com sinônimo de transcrito por questão de simplicidade. Os genes em questão apresentam mais de um transcrito diferencialmente expressos.

Genes que não foram utilizados na análise funcional *in silico* pelo *Ingenuity Pathway Analysis*

ProbeSet ID	Símbolo gene	Nome gene	Fold Change
Bt.9298.1. S1_at	AARSD1	<i>alanyl-tRNA synthetase domain containing 1</i>	-2,16
Bt.2858.1. S1_at	ABHD6	<i>abhydrolase domain containing 6</i>	-1,91
Bt.2050.1. A1_at	ACAA1	<i>acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1</i>	-2,07
Bt.5210.1. S1_at	ACO2	<i>aconitase 2, mitochondrial</i>	-2,03
Bt.1417.1. S1_at	ACP1	<i>acid phosphatase 1, soluble</i>	-1,72
Bt.12322. 1.S1_at	AHCY	<i>adenosylhomocysteinase</i>	-1,83
Bt.4449.1. S1_at	AKR1A1	<i>aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)</i>	-1,85
Bt.9585.1. S1_at	ALAD	<i>aminolevulinate, delta-, dehydratase</i>	-2,72
Bt.10078. 2.S1_at	ALG11	<i>asparagine-linked glycosylation 11, alpha-1,2-mannosyltransferase homolog (yeast)</i>	-1,80
Bt.24501. 1.A1_at	ALX1	<i>ALX homeobox 1</i>	-1,72
Bt.247.1.S 1_at	ANXA5	<i>annexin A5</i>	-1,99
Bt.5591.1. S1_at	AP5S1 // C20orf29	<i>adaptor-related protein complex 5, sigma 1 subunit // chromosome 20 open reading frame 29</i>	-2,02
Bt.13847. 1.S1_at	APOPT1 // C14orf153	<i>apoptogenic 1, mitochondrial // hypothetical protein LOC617441</i>	-1,96
Bt.16472. 1.S1_at	APTX	<i>aprataxin</i>	-3,36
Bt.8254.1. S1_at	ARPC5	<i>actin related protein 2/3 complex, subunit 5, 16kDa</i>	-2,08
Bt.20275. 1.S1_at	ARPC5L	<i>actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like</i>	-1,94
Bt.17313. 1.A1_at	ATMIN	<i>ATM interactor</i>	-2,02
Bt.5631.1. S1_at	ATOX1	<i>ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)</i>	-2,02
Bt.22628. 1.S1_at	ATP11B	<i>ATPase, class VI, type 11B</i>	-1,74
Bt.5029.1. S1_at	ATP5H	<i>ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d</i>	-2,30
Bt.4203.1.	ATP5J2	<i>ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0</i>	-1,81

S1_at		<i>complex, subunit F2</i>	
Bt.1753.1.	ATP6V1E1	<i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit</i>	-2,82
S1_at		<i>E1</i>	
Bt.380.1.S	ATPIF1	<i>ATPase inhibitory factor 1</i>	-1,98
1_at			
Bt.24552.	B3GNT2	<i>UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-</i>	-2,54
1.S1_at		<i>acetylglucosaminyltransferase 2</i>	
Bt.21388.	BAHD1	<i>bromo adjacent homology domain containing 1</i>	-1,87
2.A1_at			
Bt.7670.1.	BCL6	<i>B-cell CLL/lymphoma 6</i>	-2,47
A1_at			
Bt.3024.1.	BLOC1S2	<i>biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 2</i>	-1,70
S1_at			
Bt.13966.	BOLA2B //	<i>bolA homolog 2B (E. coli) // similar to Bola-like protein 2</i>	-1,81
1.S1_at	LOC614731		
Bt.1721.1.	BPNT1	<i>3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1</i>	-2,49
S1_at			
Bt.3158.1.	BRD8	<i>bromodomain containing 8</i>	-3,01
S1_at			
Bt.1692.1.	C10H15orf24	<i>chromosome 15 open reading frame 24 ortholog</i>	-1,93
S1_at			
Bt.22054.	C13H20ORF7	<i>chromosome 20 open reading frame 7 ortholog</i>	-1,81
1.S1_at			
Bt.21720.	C15H11orf74	<i>chromosome 11 open reading frame 74 ortholog</i>	-1,85
1.S1_at			
Bt.22742.	C17H12ORF65	<i>chromosome 12 open reading frame 65 ortholog</i>	-2,17
1.A1_at			
Bt.13441.	C20orf111 //	<i>chromosome 20 open reading frame 111 // chromosome</i>	-1,83
1.S1_at	C13H20orf111	<i>13 open reading frame, human C20orf111</i>	
Bt.13875.	C24H18orf21	<i>chromosome 18 open reading frame 21 ortholog</i>	-2,93
1.S1_at			
Bt.6535.1.	C25H7ORF50	<i>chromosome 7 open reading frame 50 ortholog</i>	-2,28
A1_at			
Bt.26675.	C9H12orf49 *	<i>chromosome 12 open reading frame 49 ortholog</i>	-2,30
1.S1_at			
Bt.26675.	C9H12orf49 *	<i>chromosome 12 open reading frame 49 ortholog</i>	-2,23
2.S1_a_at			
Bt.13845.	C9H6ORF203	<i>chromosome 6 open reading frame 203 ortholog</i>	-2,52
1.S1_at			
Bt.20607.	CACYBP	<i>calcyclin binding protein</i>	-2,57
1.S1_at			
Bt.4831.1.	CALCOCO2	<i>calcium binding and coiled-coil domain 2</i>	-2,75
S1_at			
Bt.11208.	CALM3 #	<i>calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)</i>	-2,48
1.S1_at			
Bt.4730.1.	CAPZB	<i>capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta</i>	-2,10
S1_at			
Bt.22496.	CBR3	<i>carbonyl reductase 3</i>	-2,06
1.S1_at			
Bt.15688.	CBS	<i>cystathionine-beta-synthase</i>	-2,26
1.S1_at			
Bt.24265.	CCBL2	<i>cysteine conjugate-beta lyase 2</i>	-1,90
1.S1_a_at			
Bt.4405.1.	CCDC104	<i>coiled-coil domain containing 104</i>	-1,78

S1_s_at			
Bt.11082.1.S1_at	CCDC167 // C23H6orf129 // LOC100337207	<i>transmembrane and coiled-coil domain-containing protein C6orf129 homolog</i>	-1,81
Bt.16047.1.S1_at	CDCA5	<i>cell division cycle associated 5</i>	-2,00
Bt.8531.1.A1_at	CDKN2AIPNL *	<i>CDKN2A interacting protein N-terminal like</i>	-2,24
Bt.8531.2.S1_at	CDKN2AIPNL *	<i>CDKN2A interacting protein N-terminal like</i>	-1,75
Bt.27805.1.S1_at	CENPM	<i>centromere protein M</i>	-1,91
Bt.23859.1.S1_at	CEP350 #	<i>centrosomal protein 350kDa</i>	-2,57
Bt.9833.1.S1_a_at	CHCHD7	<i>coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7</i>	-2,01
Bt.3060.1.S1_a_at	CHIC2	<i>cysteine-rich hydrophobic domain 2</i>	-1,78
Bt.5624.1.S1_at	CHMP2A	<i>chromatin modifying protein 2A</i>	-2,66
Bt.20167.1.S1_at	CIDEA	<i>cell death-inducing DFFA-like effector a</i>	-2,06
Bt.2848.1.S1_at	CINP	<i>cyclin-dependent kinase 2 interacting protein</i>	-1,79
Bt.28419.1.S1_at	CISD2	<i>CDGSH iron sulfur domain 2</i>	-2,58
Bt.16297.1.S1_at	CLDND1	<i>claudin domain containing 1</i>	-2,00
Bt.16727.1.A1_at	CLN8	<i>ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 (epilepsy, progressive with mental retardation)</i>	-2,35
Bt.1617.2.S1_a_at	CLTA	<i>clathrin, light chain (Lca)</i>	-2,01
Bt.28706.1.S1_a_at	CNIH4 *	<i>cornichon homolog 4 (Drosophila)</i>	-1,82
Bt.28706.3.S1_a_at	CNIH4 *	<i>cornichon homolog 4 (Drosophila)</i>	-2,00
Bt.27267.1.S1_at	CNPY2	<i>canopy 2 homolog (zebrafish)</i>	-2,88
Bt.6096.1.S1_at	COG2 *	<i>component of oligomeric golgi complex 2</i>	-1,68
Bt.6096.2.A1_at	COG2 *	<i>component of oligomeric golgi complex 2</i>	-1,75
Bt.11039.1.S1_at	COL5A3 // QTRT1	<i>collagen, type V, alpha 3 // queuine tRNA-ribosyltransferase 1</i>	-2,45
Bt.25312.1.A1_at	COLEC12	<i>collectin sub-family member 12</i>	-1,92
Bt.9576.1.S1_a_at	COMMD4 *	<i>COMM domain containing 4</i>	-1,68
Bt.9576.2.S1_a_at	COMMD4 *	<i>COMM domain containing 4</i>	-1,83
Bt.22142.2.S1_a_at	COQ6	<i>coenzyme Q6 homolog, monooxygenase (S. cerevisiae)</i>	-2,02
Bt.656.1.S1_at	CORO1C	<i>coronin, actin binding protein, 1C</i>	-1,88

Bt.9457.1. S1_at	COX17	<i>COX17 cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae)</i>	-2,36
Bt.16025. 1.S1_at	COX4 // COX4I1	<i>cytochrome c oxydase subunit 4</i>	-1,68
Bt.1568.1. S1_at	COX5B	<i>cytochrome c oxidase subunit Vb</i>	-2,32
Bt.23002. 1.S1_s_at	COX6A1 *	<i>cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1</i>	-2,06
Bt.7193.1. S1_at	COX6A1 *	<i>cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1</i>	-1,72
Bt.1334.1. S1_at	COX6C // LOC100297131 // MGC148714	<i>cytochrome c oxidase subunit VIc // cytochrome c oxidase subunit VIc-like // cytochrome c oxidase subunit 6C</i>	-2,08
Bt.4970.1. S1_at	COX7A2	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)</i>	-1,87
Bt.13518. 1.A1_at	CRYZL1	<i>crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1</i>	-1,92
Bt.27313. 1.A1_at	CSPG5	<i>chondroitin sulfate proteoglycan 5 (neuroglycan C)</i>	-1,98
Bt.4150.1. S1_at	CTNNBL1	<i>catenin, beta like 1</i>	-1,81
Bt.12721. 1.A1_at	CYTH2	<i>cytohesin 2</i>	-2,97
Bt.10915. 1.A1_at	DAP3	<i>death associated protein 3</i>	-2,65
Bt.12392. 1.S1_at	DCTN3	<i>dynactin 3 (p22)</i>	-2,03
Bt.10852. 1.S1_at	DDB2	<i>damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa</i>	-1,96
Bt.1784.1. S1_at	DDX1	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1</i>	-1,93
Bt.5200.1. S1_at	DDX39	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39</i>	-5,08
Bt.23550. 1.S1_at	DGAT2	<i>diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse)</i>	-2,90
Bt.3902.1. S1_at	DHPS	<i>deoxyhypusine synthase</i>	-1,99
Bt.19993. 1.A1_at	DIMT1L	<i>DIM1 dimethyladenosine transferase 1-like (S. cerevisiae)</i>	-2,61
Bt.514.1.S 1_at	DNAJC6	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6</i>	-1,69
Bt.21224. 1.S1_at	DOCK10	<i>dedicator of cytokinesis 10</i>	-2,07
Bt.4232.2. S1_at	DOCK6	<i>dedicator of cytokinesis 6</i>	-2,24
Bt.24631. 1.S1_at	DPCD *	<i>deleted in primary ciliary dyskinesia homolog (mouse)</i>	-2,56
Bt.24631. 2.A1_at	DPCD *	<i>deleted in primary ciliary dyskinesia homolog (mouse)</i>	-2,40
Bt.26551. 1.S1_at	DRG1	<i>developmentally regulated GTP binding protein 1</i>	-1,81
Bt.15641. 1.S1_a_at	DUS3L *	<i>dihydrouridine synthase 3-like (S. cerevisiae)</i>	-1,97
Bt.15641. 2.A1_at	DUS3L *	<i>dihydrouridine synthase 3-like (S. cerevisiae)</i>	-2,81

Bt.7798.1. S1_at	DYNLRB1	<i>dynein light chain roadblock-type 1</i>	-2,94
Bt.5218.1. S1_at	ECHS1	<i>enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial</i>	-2,29
Bt.5243.1. S1_at	EEF1D	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)</i>	-1,99
Bt.7963.1. S1_at	EHD1	<i>EH-domain containing 1</i>	-1,89
Bt.1633.1. S1_at	EIF1AD	<i>eukaryotic translation initiation factor 1A domain containing</i>	-2,25
Bt.20153. 1.S1_a_at	EIF2B3	<i>eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3 gamma, 58kDa</i>	-1,82
Bt.21463. 1.S1_at	EIF3F	<i>eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F</i>	-2,01
Bt.7929.1. S1_at	EIF3G	<i>eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G</i>	-1,91
Bt.26573. 1.S1_at	EMG1	<i>EMG1 nucleolar protein homolog (S. cerevisiae)</i>	-2,97
Bt.28578. 1.S1_at	EXOSC1	<i>exosome component 1</i>	-3,50
Bt.16597. 1.S1_at	EXOSC4	<i>exosome component 4</i>	-2,35
Bt.2831.1. S1_at	EXOSC5	<i>exosome component 5</i>	-2,58
Bt.18090. 2.A1_at	EXOSC6 #	<i>exosome component 6</i>	-1,99
Bt.7023.1. S1_at	FAHD2A	<i>fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A</i>	-1,98
Bt.1066.2. S1_a_at	FAM50A	<i>family with sequence similarity 50, member A</i>	-1,75
Bt.22854. 2.S1_at	FASN	<i>fatty acid synthase</i>	-1,68
Bt.4618.1. S1_at	FAU	<i>Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed</i>	-2,14
Bt.15722. 1.S1_at	FBL	<i>fibrillarin</i>	-2,73
Bt.5021.1. S1_at	FBN1	<i>fibrillin 1</i>	-1,96
Bt.986.1.A 1_at	FBXO5 #	<i>F-box protein 5</i>	-6,25
Bt.20168. 3.A1_a_at	FIP1L1	<i>FIP1 like 1 (S. cerevisiae)</i>	-2,76
Bt.6680.1. S1_a_at	FKBP2	<i>FK506 binding protein 2, 13kDa</i>	-2,01
Bt.5681.1. S1_at	FLYWCH2	<i>FLYWCH family member 2</i>	-1,77
Bt.20021. 1.S1_at	FTSJ2	<i>FtsJ homolog 2 (E. coli)</i>	-1,88
Bt.4358.1. S1_at	FXR2	<i>fragile X mental retardation, autosomal homolog 2</i>	-2,12
Bt.23088. 1.S1_at	FZR1 #	<i>fizzy/cell division cycle 20 related 1 (Drosophila)</i>	-2,80
Bt.3211.1. S2_at	GABARAPL1	<i>GABA(A) receptor-associated protein like 1</i>	-1,92

Bt.7276.1. S1_at	GCDH	<i>glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase</i>	-2,23
Bt.11182. 2.S1_a_at	GCFC	<i>GC-rich sequence DNA-binding factor homolog</i>	-3,18
Bt.7047.1. S1_at	GDF9	<i>growth differentiation factor 9</i>	-1,79
Bt.1248.1. S1_at	GGA2 #	<i>golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2</i>	-2,27
Bt.12684. 1.S1_at	GIT2 *	<i>G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 2</i>	-1,93
Bt.12684. 2.S1_at	GIT2 *	<i>G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 2</i>	-2,51
Bt.3543.1. S1_at	GLRX3	<i>glutaredoxin 3</i>	-2,16
Bt.1429.3. A1_s_at	GLTSCR2	<i>glioma tumor suppressor candidate region gene 2</i>	-2,05
Bt.24285. 1.S1_at	GNL3	<i>guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)</i>	-2,45
Bt.26662. 1.S1_at	GOLGA4	<i>golgin A4</i>	-2,41
Bt.19493. 1.S1_at	GOSR1	<i>golgi SNAP receptor complex member 1</i>	-1,94
Bt.25295. 1.S1_at	GPR89 #	<i>G protein-coupled receptor 89</i>	-1,91
Bt.21454. 1.S1_at	GPRC5C	<i>G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C</i>	-2,16
Bt.4205.1. S1_at	GPX4	<i>glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)</i>	-2,23
Bt.5170.1. S1_at	GRHPR	<i>glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase</i>	-2,06
Bt.28358. 1.A1_at	GSDMC	<i>gasdermin C</i>	-2,15
Bt.6415.1. S1_at	GTF2H2	<i>general transcription factor IIH, polypeptide 2, 44kDa</i>	-2,28
Bt.21230. 1.S1_at	GTF2H5	<i>general transcription factor IIH, polypeptide 5</i>	-2,38
Bt.27571. 1.A1_at	GTSF1	<i>gametocyte specific factor 1</i>	-2,35
Bt.15712. 1.S1_at	GUSB	<i>glucuronidase, beta</i>	-1,96
Bt.20929. 2.A1_at	H1F0	<i>H1 histone family, member 0</i>	-1,91
Bt.20141. 1.S1_at	HAGH	<i>hydroxyacylglutathione hydrolase</i>	-1,96
Bt.2919.1. S1_a_at	HDAC7 // LOC509843	<i>histone deacetylase 7 // similar to histone deacetylase 7A</i>	-1,74
Bt.8591.1. S1_at	HDGF2 // HDGFRP2	<i>hepatoma-derived growth factor-related protein 2 // hepatoma-derived growth factor-related protein 2</i>	-2,23
Bt.18808. 1.S1_at	HES1	<i>hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)</i>	-1,87
Bt.13219. 1.S1_at	HEXIM2	<i>hexamethylene bis-acetamide inducible 2</i>	-1,83
Bt.13946. 2.A1_at	HINFP	<i>MBD2-interacting zinc finger</i>	-1,94

Bt.4505.1. S1_at	HINT1	<i>histidine triad nucleotide binding protein 1</i>	-1,91
Bt.4110.1. S1_at	HRH1	<i>histamine receptor H1</i>	-2,79
Bt.23179. 1.S2_at	HSP90AA1	<i>heat shock 90kD protein 1, alpha</i>	-1,98
Bt.23161. 2.A1_at	HSPA1A #	<i>heat shock 70kDa protein 1A</i>	-2,46
Bt.29939. 2.S1_at	HSPA5 *	<i>heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)</i>	-2,13
Bt.4273.1. S1_at	HSPA5 *	<i>heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)</i>	-4,21
Bt.18113. 1.S1_a_at	ILF2	<i>interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa</i>	-2,17
Bt.5241.1. S1_at	IMP4	<i>IMP4, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)</i>	-2,45
Bt.28326. 1.S1_at	INTS10	<i>integrator complex subunit 10</i>	-2,44
Bt.25551. 1.S1_at	ITGB1BP1	<i>integrin beta 1 binding protein 1</i>	-1,92
Bt.15714. 1.S1_at	KANSL2 // C5H12orf41	<i>KAT8 regulatory NSL complex subunit 2 // chromosome 12 open reading frame 41 ortholog</i>	-1,91
Bt.24626. 1.S1_at	KIAA0020	<i>KIAA0020</i>	-2,62
Bt.11593. 1.S1_at	KIAA0232 // LOC514704	<i>similar to KIAA0232 gene product</i>	-1,88
Bt.22120. 1.S1_at	KIF22	<i>kinesin family member 22</i>	-2,03
BtAffx.1.1 7.S1_at	KRIT1	<i>KRIT1, ankyrin repeat containing</i>	-2,19
Bt.7240.1. S1_at	LAP3	<i>leucine aminopeptidase 3</i>	-1,82
Bt.21838. 1.A1_at	LENG1 *	<i>leukocyte receptor cluster (LRC) member 1</i>	-2,37
Bt.21838. 2.S1_at	LENG1 *	<i>leukocyte receptor cluster (LRC) member 1</i>	-2,18
Bt.4519.1. S1_at	LIPT1	<i>lipoyltransferase 1</i>	-2,73
Bt.24351. 1.A1_at	LIX1	<i>Lix1 homolog (chicken)</i>	-2,06
Bt.8870.2. S1_at	LLPH	<i>LLP homolog, long-term synaptic facilitation (Aplysia)</i>	-1,78
Bt.12411. 1.S1_at	LMNA	<i>lamin A/C</i>	-1,84
Bt.22403. 1.S1_at	LOC100300875 #	<i>HEAT repeat-containing protein 2-like</i>	-2,00
Bt.23342. 1.S1_at	LOC100848544 #	<i>uncharacterized LOC100848544</i>	-3,62
Bt.8081.1. S1_a_at	LOC100848780 #	<i>uncharacterized LOC100848780</i>	-1,80
Bt.8501.1. A1_at	LOC510317 // C19H17orf85 #	<i>similar to Uncharacterized protein C17orf85 (Protein ELG) // chromosome 19 open reading frame, human C17orf85</i>	-2,30
Bt.27392. 1.A1_at	LOC510961 #	<i>hypothetical LOC510961</i>	-1,73

Bt.24721. 1.S1_at	LOC514234 // C28H1orf131	<i>hypothetical LOC514234 // chromosome 28 open reading frame, human C1orf131</i>	-1,92
Bt.20987. 2.S1_at	LOC515651 // C17H22orf39 #	<i>hypothetical LOC515651 // chromosome 17 open reading frame, human C22orf39</i>	-3,59
Bt.22518. 1.S1_a_at	LOC540962 // C7H19orf70	<i>similar to QIL1 protein // chromosome 7 open reading frame, human C19orf70</i>	-3,29
Bt.23596. 1.S1_at	LOC614800 // C7H19orf53 // LOC616568	<i>Leydig cell tumor 10 kDa protein homolog // chromosome 7 open reading frame, human C19orf53 // leydig cell tumor 10 kDa protein homolog pseudogene</i>	-1,83
Bt.10797. 2.S1_a_at	LOC615093	<i>hypothetical protein LOC615093</i>	-1,92
Bt.9210.1. S1_at	LOC617104	<i>growth and transformation-dependent protein</i>	-3,55
Bt.10616. 1.S1_a_at	LOC618944 #	<i>similar to chromosome 6 open reading frame 52</i>	-1,96
Bt.5888.1. S1_at	LOC782900	<i>similar to LOC440957 protein</i>	-1,86
Bt.21460. 1.S1_at	LOH12CR1	<i>loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1</i>	-1,92
Bt.15753. 1.S1_at	LSM2	<i>LSM2 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)</i>	-2,08
Bt.1122.1. A1_at	LYAR	<i>Ly1 antibody reactive homolog (mouse)</i>	-2,60
Bt.16343. 1.A1_at	LYRM5	<i>LYR motif containing 5</i>	-2,13
Bt.9205.1. A1_at	MALSU1 // MGC152190	<i>mitochondrial assembly of ribosomal large subunit 1 // hypothetical LOC509253</i>	-3,56
Bt.8482.1. A1_at	MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	-2,17
Bt.9698.1. S1_at	MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>	-2,01
Bt.20515. 1.S1_at	MAU2 // LOC528175	<i>MAU2 chromatid cohesion factor homolog (C. elegans) // similar to Uncharacterized protein KIAA0892</i>	-1,89
Bt.5173.1. A1_at	MCFD2 #	<i>multiple coagulation factor deficiency 2</i>	-1,94
Bt.11129. 1.S1_at	MCM3	<i>minichromosome maintenance complex component 3</i>	-1,74
Bt.9940.1. S1_at	MCTS1	<i>malignant T cell amplified sequence 1</i>	-1,82
Bt.5345.1. S1_at	MDH1	<i>malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)</i>	-3,13
Bt.7915.1. S1_at	MDH2 #	<i>malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)</i>	-2,11
Bt.15853. 1.S1_at	MECOM	<i>MDS1 and EVI1 complex locus</i>	-1,83
Bt.27848. 1.S1_at	MED18	<i>mediator complex subunit 18</i>	-1,92
Bt.24579. 1.S1_at	MED31	<i>mediator complex subunit 31</i>	-2,69
Bt.28120. 1.S1_at	MED8	<i>mediator complex subunit 8</i>	-2,17
Bt.3241.1. S1_at	MESDC2	<i>mesoderm development candidate 2</i>	-1,91
Bt.24275. 1.S1_at	METRNL	<i>meteorin, glial cell differentiation regulator-like</i>	-1,76

Bt.21597. 1.S1_at	METTL13	<i>methyltransferase like 13</i>	-2,11
Bt.22463. 1.A1_at	METTL18 // C16H1orf156	<i>methyltransferase like 18 // chromosome 1 open reading frame 156 ortholog</i>	-2,07
Bt.27274. 1.A1_at	MFSD2A	<i>major facilitator superfamily domain containing 2A</i>	-3,65
Bt.24708. 1.S1_at	MFSD7	<i>major facilitator superfamily domain containing 7</i>	-1,68
Bt.5939.1. S1_a_at	MGC133554	<i>similar to MAK31-like protein</i>	-2,38
Bt.19916. 1.S1_at	MGC159911	<i>UPF0636 protein C4orf41 homolog</i>	-2,06
Bt.5529.2. S1_a_at	MKKS #	<i>McKusick-Kaufman syndrome</i>	-2,73
Bt.5658.1. S1_s_at	MLH1	<i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)</i>	-1,94
Bt.11456. 1.S1_at	MMS19 #	<i>MMS19 nucleotide excision repair homolog (S. cerevisiae)</i>	-1,83
Bt.23496. 1.S1_at	MP68 // C21H14orf2	<i>6.8 kDa mitochondrial proteolipid // chromosome 21 open reading frame, human C14orf2</i>	-1,90
Bt.20102. 1.S1_at	MPV17L2 // LOC507471	<i>MPV17 mitochondrial membrane protein-like 2</i>	-1,88
Bt.1415.1. S1_at	MRPL11	<i>mitochondrial ribosomal protein L11</i>	-1,74
Bt.7192.1. S1_at	MRPL17	<i>mitochondrial ribosomal protein L17</i>	-1,99
Bt.9362.1. S1_at	MRPL2	<i>mitochondrial ribosomal protein L2</i>	-1,77
Bt.3038.1. S1_at	MRPL27	<i>mitochondrial ribosomal protein L27</i>	-2,37
Bt.9825.1. S1_at	MRPL35	<i>mitochondrial ribosomal protein L35</i>	-1,91
Bt.26953. 1.A1_at	MRPL36	<i>mitochondrial ribosomal protein L36</i>	-2,18
Bt.17778. 1.A1_at	MRPL40 // LOC100337461 #	<i>mitochondrial ribosomal protein L40</i>	-1,90
Bt.4652.1. S1_at	MRPL55 #	<i>mitochondrial ribosomal protein L55</i>	-2,75
Bt.19431. 1.S1_at	MRPS14 *	<i>mitochondrial ribosomal protein S14</i>	-2,57
Bt.19431. 1.S1_s_at	MRPS14 *	<i>mitochondrial ribosomal protein S14</i>	-2,83
Bt.27027. 1.S1_a_at	MRPS15	<i>mitochondrial ribosomal protein S15</i>	-2,06
Bt.9428.1. S1_at	MRPS6	<i>mitochondrial ribosomal protein S6</i>	-2,07
Bt.16213. 1.S1_at	MT3	<i>metallothionein 3</i>	-1,70
Bt.27139. 1.S1_at	MTCP1	<i>mature T-cell proliferation 1</i>	-2,24
Bt.22973. 1.S1_at	MYF6	<i>myogenic factor 6 (herculin)</i>	-1,98
Bt.10158. 1.A1_at	NDRG3 #	<i>NDRG family member 3</i>	-1,72

Bt.5723.1. S1_at	NDUFA11	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 11, 14.7kDa</i>	-1,81
Bt.65.1.S1 _at	NDUFA2	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2, 8kDa</i>	-2,36
Bt.4704.1. S1_at	NDUFA5	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5, 13kDa</i>	-3,82
Bt.20.1.S1 _at	NDUFA7	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7, 14.5kDa</i>	-2,19
Bt.59.1.S1 _at	NDUFA8	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa</i>	-2,73
Bt.60.1.S1 _at	NDUFB2	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2, 8kDa</i>	-2,28
Bt.3117.1. S1_at	NDUFB9	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9, 22kDa</i>	-2,15
Bt.57.1.S1 _at	NDUFS5	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5, 15kDa (NADH-coenzyme Q reductase)</i>	-1,95
Bt.56.1.S1 _at	NDUFS6	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa (NADH-coenzyme Q reductase)</i>	-1,90
Bt.315.1.S 1_at	NDUFS7	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase)</i>	-2,48
Bt.6157.1. S1_at	NET1	<i>neuroepithelial cell transforming gene 1</i>	-2,15
Bt.12966. 1.S1_at	NHP2	<i>NHP2 ribonucleoprotein homolog (yeast)</i>	-1,83
Bt.26741. 1.S1_at	NIF3L1	<i>NIF3 NGG1 interacting factor 3-like 1 (S. pombe)</i>	-1,86
Bt.23187. 2.S1_a_at	NOL12 *	<i>nucleolar protein 12</i>	-2,52
Bt.23187. 3.S1_a_at	NOL12 *	<i>nucleolar protein 12</i>	-2,35
Bt.4096.1. S1_at	NOL7 *	<i>nucleolar protein 7, 27kDa</i>	-1,93
Bt.4096.1. S1_s_at	NOL7 *	<i>nucleolar protein 7, 27kDa</i>	-4,34
Bt.1040.1. A1_at	NOP2	<i>NOP2 nucleolar protein homolog (yeast)</i>	-2,79
Bt.543.1.S 1_at	NR2F1	<i>nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1</i>	-2,07
Bt.1946.1. S1_at	NSFL1C	<i>NSFL1 (p97) cofactor (p47)</i>	-2,59
Bt.20950. 1.S1_at	NUDT16	<i>nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16</i>	-2,73
Bt.12732. 2.S1_at	NYREN18 #*	<i>NEDD8 ultimate buster-1</i>	-2,05
Bt.12732. 1.S1_at	NYREN18 // NUB1 *	<i>NEDD8 ultimate buster-1 // negative regulator of ubiquitin-like proteins 1</i>	-2,06
Bt.28384. 1.A1_at	OGFOD1	<i>2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain containing 1</i>	-1,94
Bt.27779. 1.S1_at	OMA1	<i>OMA1 homolog, zinc metallopeptidase (S. cerevisiae)</i>	-2,04
Bt.28821. 1.S1_at	OSGEPL1	<i>O-sialoglycoprotein endopeptidase-like 1</i>	-2,79
Bt.5006.1. S1_at	PAIP2	<i>poly(A) binding protein interacting protein 2</i>	-3,50

Bt.27041. 1.A1_at	PAPOLG	<i>poly(A) polymerase gamma</i>	-1,83
Bt.21745. 1.S1_at	PARK7	<i>Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7</i>	-1,75
Bt.23141. 1.A1_at	PDCD11	<i>programmed cell death 11</i>	-2,20
Bt.3736.1. A1_at	PDE4DIP #	<i>phosphodiesterase 4D interacting protein</i>	-2,37
Bt.7871.1. S1_at	PDLIM2	<i>PDZ and LIM domain 2 (mystique)</i>	-2,50
Bt.20042. 1.S1_at	PDZD11	<i>PDZ domain containing 11</i>	-1,85
Bt.12211. 1.S1_at	PECI // ECI2	<i>peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase // enoyl-CoA delta isomerase 2</i>	-2,00
Bt.15789. 1.S1_at	PFDN1	<i>prefoldin subunit 1</i>	-1,89
Bt.23084. 1.S1_at	PGLS	<i>6-phosphogluconolactonase</i>	-2,33
Bt.4466.1. A1_at	PHF2	<i>PHD finger protein 2</i>	-2,35
Bt.13431. 1.S1_a_at	PHRF1 // LOC100126170	<i>PHD and ring finger domains 1 // hypothetical protein LOC100126170</i>	-3,06
Bt.13940. 1.S1_at	PIGU	<i>phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class U</i>	-1,73
Bt.24650. 1.S1_a_at	PIN4 #	<i>protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA- interacting, 4 (parvulin)</i>	-2,79
Bt.22547. 1.A1_a_at	PITPNA	<i>phosphatidylinositol transfer protein, alpha</i>	-1,69
Bt.22589. 1.S1_at	PLA2G12A	<i>phospholipase A2, group XIIA</i>	-1,72
Bt.20518. 1.A1_at	PNMA2	<i>paraneoplastic antigen MA2</i>	-2,16
Bt.27905. 1.S1_at	POLE3	<i>polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)</i>	-2,13
Bt.23590. 1.S1_at	POLR1D	<i>polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa</i>	-1,70
Bt.10981. 1.A1_a_at	POLR1E *	<i>polymerase (RNA) I polypeptide E, 53kDa</i>	-2,85
Bt.10981. 1.A1_at	POLR1E *	<i>polymerase (RNA) I polypeptide E, 53kDa</i>	-2,35
Bt.10981. 2.S1_at	POLR1E *	<i>polymerase (RNA) I polypeptide E, 53kDa</i>	-2,50
Bt.9092.1. S1_at	POLR2G	<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G</i>	-2,66
Bt.2466.1. S1_at	POLR2I	<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I, 14.5kDa</i>	-2,34
Bt.13887. 1.S1_at	POLR2L	<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L, 7.6kDa</i>	-1,78
Bt.3593.1. S1_at	PPAN-P2RY11	<i>PPAN-P2RY11 readthrough</i>	-1,84
Bt.9277.1. S1_at	PPFIBP2 #	<i>PTPRF interacting protein, binding protein 2 (liprin beta 2)</i>	-2,07
Bt.1131.1. S1_at	PPIB	<i>peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)</i>	-2,68

Bt.3362.1. S1_at	PPL	<i>periplakin</i>	-2,00
Bt.28646. 1.S1_at	PPPDE2	<i>PPPDE peptidase domain containing 2</i>	-1,87
Bt.2689.1. S1_at	PRDX2	<i>peroxiredoxin 2</i>	-1,95
Bt.13588. 1.A1_at	PSAT1	<i>phosphoserine aminotransferase 1</i>	-1,73
Bt.3633.1. A1_at	PSEN1	<i>presenilin 1</i>	-1,76
Bt.8062.1. S1_at	PSMC5	<i>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5</i>	-1,94
Bt.3193.1. A1_at	PSMD6	<i>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6</i>	-2,24
Bt.3691.1. S1_at	PSMD7	<i>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7</i>	-2,28
Bt.17968. 1.S1_at	PSMD8 #	<i>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8</i>	-1,99
Bt.14040. 1.S1_at	PTGR2 *	<i>prostaglandin reductase 2</i>	-2,00
Bt.14040. 2.A1_at	PTGR2 *	<i>prostaglandin reductase 2</i>	-1,96
Bt.24652. 1.A1_at	PTPN2	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2</i>	-3,56
Bt.27009. 1.S1_at	PWWP2A #	<i>PWWP domain containing 2A</i>	-2,68
Bt.4123.1. S1_at	QPCTL	<i>glutaminy-peptide cyclotransferase-like</i>	-2,01
Bt.20202. 1.S1_at	RALBP1	<i>ralA binding protein 1</i>	-1,81
Bt.22038. 1.S1_a_at	RARS	<i>arginyl-tRNA synthetase</i>	-2,03
Bt.26792. 1.S1_at	RASGRP2	<i>RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)</i>	-1,92
Bt.11059. 1.S1_at	RBM5	<i>RNA binding motif protein 5</i>	-3,23
Bt.20535. 1.S1_at	RDBP	<i>RD RNA binding protein</i>	-1,83
Bt.4114.1. S1_at	RFC2	<i>replication factor C (activator 1) 2, 40kDa</i>	-2,13
Bt.4578.1. A1_at	RFC5	<i>replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa</i>	-2,34
Bt.28557. 1.S1_at	RG9MTD1	<i>RNA (guanine-9-) methyltransferase domain containing 1</i>	-2,07
Bt.8030.1. S1_at	RGS3	<i>regulator of G-protein signaling 3</i>	-1,85
Bt.27863. 1.S1_at	RMP // URI1	<i>RNA polymerase II, subunit 5-mediating protein // URI1, prefoldin-like chaperone</i>	-1,93
Bt.23606. 2.S1_at	RN45S #	<i>45S ribosomal RNA</i>	-1,92
Bt.7185.2. S1_a_at	RNASEH1	<i>ribonuclease H1</i>	-2,19
Bt.21603. 2.S1_at	RNF121	<i>ring finger protein 121</i>	-2,44

Bt.12878.1.S1_at	RNF4	<i>ring finger protein 4</i>	-2,00
Bt.6578.1.A1_a_at	RNF8 *	<i>ring finger protein 8</i>	-1,97
Bt.6578.3.S1_at	RNF8 *	<i>ring finger protein 8</i>	-1,94
Bt.868.1.S1_a_at	ROBLD3 *	<i>roadblock domain containing 3</i>	-2,63
Bt.868.1.S1_at	ROBLD3 *	<i>roadblock domain containing 3</i>	-2,04
Bt.4177.3.A1_at	ROBO2	<i>roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 (Drosophila)</i>	-1,81
Bt.23381.1.S1_at	RPL10A	<i>ribosomal protein L10a</i>	-1,76
Bt.23317.1.S1_at	RPL13	<i>ribosomal protein L13</i>	-1,67
Bt.4842.1.S1_at	RPL18	<i>ribosomal protein L18</i>	-1,87
Bt.12911.1.S1_at	RPL26	<i>ribosomal protein L26</i>	-1,77
Bt.23548.1.S1_at	RPL34 #	<i>ribosomal protein L34</i>	-2,05
Bt.3404.1.S1_at	RPL36A // RPL36A // RPL36AL	<i>ribosomal protein L36a-like // ribosomal protein L36a // ribosomal protein L36a-like</i>	-3,19
Bt.7658.1.S1_at	RPL38	<i>ribosomal protein L38</i>	-1,82
Bt.7781.1.S1_at	RPL7 // LOC782993 // LOC784388 // LOC788541	<i>ribosomal protein L7 // ribosomal protein L7a pseudogene // ribosomal protein L7 pseudogene // 60S ribosomal protein L7-like</i>	-1,91
Bt.3003.1.S1_at	RPL7L1	<i>ribosomal protein L7-like 1</i>	-2,22
Bt.4967.1.S1_at	RPS3A	<i>ribosomal protein S3A</i>	-2,50
Bt.20437.1.S1_at	RUVBL1	<i>RuvB-like 1 (E. coli)</i>	-1,87
Bt.20118.1.S1_at	SAR1A	<i>SAR1 homolog A (S. cerevisiae)</i>	-1,68
Bt.26302.1.A1_at	SCML1 #	<i>sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)</i>	-1,83
Bt.9562.1.S1_at	SCN5A	<i>sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit</i>	-2,41
Bt.20472.1.S1_at	SEC11C	<i>SEC11 homolog C (S. cerevisiae)</i>	-2,19
Bt.4222.1.S1_at	SERPINB6	<i>serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6</i>	-1,83
Bt.2215.1.S1_at	SH3GL2	<i>SH3-domain GRB2-like 2</i>	-1,75
Bt.7524.1.A1_at	SIX3	<i>SIX homeobox 3</i>	-1,94
Bt.9021.1.S1_at	SLC25A24	<i>solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24</i>	-1,75
Bt.12773.1.S1_at	SLC2A8	<i>solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 8</i>	-1,78

Bt.3856.1. S1_at	SLC35B1	<i>solute carrier family 35, member B1</i>	-2,41
Bt.24885. 1.A1_at	SLC4A1AP	<i>solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1, adaptor protein</i>	-2,22
Bt.4795.1. S1_at	SLC6A4	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4</i>	-1,73
Bt.16022. 1.S1_at	SMARCAL1	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a-like 1</i>	-2,80
Bt.16815. 1.S1_at	SNRNP25	<i>small nuclear ribonucleoprotein 25kDa (U11/U12)</i>	-2,65
Bt.26566. 1.S1_at	SNUPN	<i>snurportin 1</i>	-2,45
Bt.17048. 3.A1_a_at	SPATS1	<i>spermatogenesis associated, serine-rich 1</i>	-2,21
Bt.9517.1. S1_a_at	SPC24	<i>SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)</i>	-1,85
Bt.13780. 1.A1_at	SPRY1	<i>sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)</i>	-2,11
Bt.28761. 1.A1_s_at	SQRDL *	<i>sulfide quinone reductase-like (yeast)</i>	-1,81
Bt.5296.1. S1_at	SQRDL *	<i>sulfide quinone reductase-like (yeast)</i>	-1,76
Bt.21217. 1.S1_at	SSBP1	<i>single-stranded DNA binding protein 1</i>	-3,31
Bt.20204. 1.S1_at	SSSCA1	<i>Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1</i>	-2,84
Bt.28190. 1.S1_at	SYF2	<i>SYF2 homolog, RNA splicing factor (S. cerevisiae)</i>	-2,96
Bt.7283.1. S1_at	TALDO1	<i>transaldolase 1</i>	-1,72
Bt.6705.1. S1_at	TBC1D8	<i>TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)</i>	-1,77
Bt.27086. 1.A1_at	TERF2IP	<i>telomeric repeat binding factor 2, interacting protein</i>	-1,85
Bt.11260. 2.S1_at	TGOLN2	<i>trans-golgi network protein 2</i>	-2,02
Bt.21827. 1.A1_s_at	THOP1	<i>thimet oligopeptidase 1</i>	-1,97
Bt.3967.1. S1_a_at	THYN1 #	<i>thymocyte nuclear protein 1</i>	-1,83
Bt.8735.1. S1_at	TIMM22 *	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)</i>	-2,73
Bt.8735.2. S1_a_at	TIMM22 *	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)</i>	-1,88
Bt.11193. 1.S1_at	TIMM23	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast)</i>	-2,27
Bt.1175.1. S1_at	TIMM9	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog (yeast)</i>	-2,01
Bt.4750.1. S1_at	TKT	<i>transketolase</i>	-2,05
Bt.11925. 1.A1_at	TM2D3 #*	<i>TM2 domain containing 3</i>	-3,57
Bt.11925. 2.S1_a_at	TM2D3 #*	<i>TM2 domain containing 3</i>	-3,20

Bt.9492.1. S1_at	TMA16 // LOC506277	<i>translation machinery associated 16 homolog (S. cerevisiae) // hypothetical protein LOC506277</i>	-2,06
Bt.2156.1. S1_at	TMEM11 *	<i>transmembrane protein 11</i>	-3,57
Bt.2156.2. S1_a_at	TMEM11 *	<i>transmembrane protein 11</i>	-1,89
Bt.24931. 1.A1_at	TMEM126A	<i>transmembrane protein 126A</i>	-1,99
Bt.10312. 1.A1_at	TMEM184B	<i>transmembrane protein 184B</i>	-3,59
Bt.23600. 1.S1_at	TMEM93	<i>transmembrane protein 93</i>	-1,76
Bt.2798.1. S1_a_at	TMSB10 #	<i>thymosin beta 10</i>	-2,46
Bt.712.1.S 2_at	TOMM22	<i>translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)</i>	-2,40
Bt.1217.1. A1_a_at	TOMM70A	<i>translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A (S. cerevisiae)</i>	-1,82
Bt.6442.1. S1_at	TPM1 #	<i>tropomyosin 1 (alpha)</i>	-1,73
Bt.15903. 1.S1_at	TPMT	<i>thiopurine S-methyltransferase</i>	-1,88
Bt.18212. 1.S1_at	TPRKB	<i>TP53RK binding protein</i>	-2,65
Bt.17628. 1.A1_at	TRAK2	<i>trafficking protein, kinesin binding 2</i>	-1,90
Bt.8235.1. S1_at	TRAPPC5	<i>trafficking protein particle complex 5</i>	-1,80
Bt.703.1.S 1_at	TRIM26 #	<i>tripartite motif-containing 26</i>	-1,81
Bt.2667.1. S1_a_at	TRPT1	<i>tRNA phosphotransferase 1</i>	-1,73
Bt.7360.1. S1_at	TSN	<i>translin</i>	-2,08
Bt.5344.1. S1_at	TUFM	<i>Tu translation elongation factor, mitochondrial</i>	-2,31
Bt.20205. 1.S1_at	UBE2F	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2F (putative)</i>	-2,41
Bt.28506. 1.A1_at	UCK2	<i>uridine-cytidine kinase 2</i>	-2,12
Bt.11225. 1.S1_at	UFD1L #	<i>ubiquitin fusion degradation 1 like</i>	-2,10
Bt.27924. 1.S1_at	UIMC1	<i>ubiquitin interaction motif containing 1</i>	-2,49
Bt.1819.1. S1_at	UQCR10	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase complex 7.2 kDa protein</i>	-1,98
Bt.265.1.S 1_at	UQCRFS1	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1</i>	-1,69
Bt.26622. 1.S1_a_at	UROD	<i>uroporphyrinogen decarboxylase</i>	-2,19
Bt.24778. 1.S1_at	USP32	<i>ubiquitin specific peptidase 32</i>	-1,74
Bt.25537. 1.A1_at	UXS1	<i>UDP-glucuronate decarboxylase 1</i>	-2,03

Bt.26122. 2.S1_at	UXT	<i>ubiquitously-expressed transcript</i>	-1,97
Bt.282.1.S 1_at	VDAC1P5 // VDAC3	<i>voltage-dependent anion channel 1 pseudogene 5 //</i> <i>voltage-dependent anion channel 3</i>	-1,84
Bt.2175.1. S1_at	VTI1B	<i>vesicle transport through interaction with t-SNAREs</i> <i>homolog 1B (yeast)</i>	-1,91
Bt.17594. 1.S1_at	WDR5	<i>WD repeat domain 5</i>	-1,72
Bt.20351. 1.S1_at	WRAP53	<i>WD repeat containing, antisense to TP53</i>	-2,29
Bt.27918. 1.S1_at	WTIP	<i>Wilms tumor 1 interacting protein</i>	-1,86
Bt.9415.1. S1_at	XAB2	<i>XPA binding protein 2</i>	-1,92
Bt.3049.1. A1_at	XRCC5	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese</i> <i>hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)</i>	-1,86
Bt.1033.1. S1_at	ZBTB48	<i>zinc finger and BTB domain containing 48</i>	-2,06
Bt.4145.1. S1_at	ZDHHC4	<i>zinc finger, DHHC-type containing 4</i>	-1,64
Bt.17734. 1.A1_at	ZFAND2A	<i>zinc finger, AN1-type domain 2A</i>	-2,95
Bt.12902. 1.S1_at	ZNF304 *	<i>zinc finger protein 304</i>	-1,85
Bt.12902. 2.A1_at	ZNF304 *	<i>zinc finger protein 304</i>	-1,90
Bt.27106. 1.S1_at	ZNF34	<i>zinc finger protein 34</i>	-1,71
Bt.27276. 1.A1_at	ZNF830	<i>zinc finger protein 830</i>	-2,60
Bt.6676.1. S1_at	ZWILCH	<i>Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)</i>	-1,85
Bt.10073. 1.A1_at	---	---	-1,84
Bt.13350. 1.S1_at	---	---	-1,68
Bt.16078. 1.A1_s_at	---	---	-1,89
Bt.16721. 1.A1_at	---	---	-2,44
Bt.17041. 1.A1_at	---	---	-1,87
Bt.18780. 2.A1_at	---	---	-2,55
Bt.27373. 1.A1_at	---	---	-2,21
Bt.6552.1. S1_at	---	---	-1,81
Bt.8384.1. S1_at	---	---	-1,77
Bt.9674.1. S1_at	---	---	-2,16
Bt.9870.2. A1_at	---	---	-1,91

ANEXO C

Legenda das imagens geradas pelo *Ingenuity Pathway Analysis*.