

Influência da interação entre o oócito e as células da granulosa nos resultados dos procedimentos de reprodução assistida

The influence of interaction between oocyte and granulosa cells on the results of procedures in assisted reproduction

Carolina Oliveira Campos¹
Alessandra Aparecida Vireque²
Jacira Ribeiro Campos³
Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva⁴

Palavras-chave

Células da granulosa
Cumulus cells
Oócitos
Técnicas reprodutivas assistidas

Keywords

Granulosa cells
Cumulus cells
Oocytes
Reproductive techniques, assisted

Resumo

A interação oócito-células da granulosa *in vivo* e *in vitro* e sua influência na qualidade oocitária e embrionária tem sido alvo de inúmeros estudos, mas muitas questões ainda necessitam ser esclarecidas. O objetivo deste trabalho foi revisar a importância dessa comunicação, estabelecendo uma relação com a questão da maturação *in vitro* de oócitos imaturos humanos aplicando esses conhecimentos para definir possíveis marcadores moleculares que poderiam melhorar a seleção de oócitos e, conseqüentemente, selecionar embriões de boa qualidade para posterior transferência e sucesso de gravidez de pacientes submetidas ao tratamento da infertilidade conjugal. As células da granulosa têm um importante papel na maturação oocitária *in vitro* e os benefícios da presença dessas células durante essa etapa podem ser atribuídos à formação de um microambiente favorável (bioquímico e metabólico) ao redor do oócito. Foram identificados nesta revisão vários marcadores em potencial nas células do *cumulus* de oócitos competentes, incluindo vários genes que poderiam ser usados como preditores da competência oocitária, o que pode contribuir para a formulação de critérios mais objetivos e confiáveis para a seleção de oócitos e embriões, e conseqüente aprimoramento e otimização das técnicas em reprodução humana assistida que são aplicadas nos procedimentos clínicos atuais de fertilização *in vitro*.

Abstract

The interaction of oocyte-granulosa cells *in vivo* and *in vitro* and its influence on oocyte and embryo quality has been the subject of numerous studies, but many issues still need to be clarified. The objective of this study was to promote a review about the importance of this communication establishing a connection with the issue of *in vitro* maturation of immature human oocytes by applying this knowledge to define potential molecular markers that could improve the selection of oocytes and consequently select good quality embryos for later transfer and success of pregnancy in patients undergoing treatment of infertility. The granulosa cells also have an important role in oocyte maturation *in vitro* and the benefits from the presence of these cells during this process can be attributed to the formation of a favorable micro-environment (biochemical and metabolic) around the oocyte. In this review, we identified several potential markers in the *cumulus* cells of competent oocytes, including several genes that could be used as predictors of oocyte competence, which contributes for more objective and reliable criteria for the selection of oocytes and embryos, thus improving and optimizing techniques in assisted human reproduction that are applied in current clinical *in vitro* fertilization.

Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

¹ Aluna de Mestrado do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

² PhD; Pós-doutoranda do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

³ Aluna de Doutorado do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁴ Docente do Setor de Endocrinologia Ginecológica e Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva – Avenida dos Bandeirantes, 3.900 – 8º andar – Campus Universitário – CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto (SP), Brasil – Tel. (16) 3602-2583 – Fax: (16) 3633-0946 – E-mail: anasars@fmrp.usp.br

Introdução

O folículo ovariano é a unidade funcional do ovário na qual o componente somático (células tecais e granulosa) e germinativo (oócito) são intimamente associados e interdependentes. O ovário é responsável pelo desenvolvimento dos folículos e pela ovulação, bem como pela produção de hormônios sexuais que agem no trato reprodutivo. A secreção destes hormônios, por sua vez, está sob o controle das gonadotrofinas adenoipofisárias, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), os quais obedecem à ação estimuladora do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) produzido no hipotálamo. A secreção do GnRH é realizada em pulsos, o que determina também a pulsatilidade na secreção dos hormônios hipofisários¹(A).

Dois processos diferentes ocorrem paralelamente ao longo do desenvolvimento folicular: a *esteroidogênese* e a *gametogênese*. Portanto, o desenvolvimento coordenado do folículo constitui-se em um elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária, já que fornece o ambiente necessário para o crescimento, maturação do oócito e produção de hormônios²(A). Ao nascer, as fêmeas de mamíferos apresentam ovários contendo milhares de folículos primordiais. Durante a infância ocorre um decréscimo no número de folículos, e somente 300 a 500 desses oócitos vão se desenvolver em oócitos maduros. Esse declínio progressivo no número de oócitos ocorre devido ao processo de apoptose que comanda a atresia folicular³(A).

O ovário contém folículos em diferentes estádios de desenvolvimento e produz mínimas quantidades de estrógenos que são suficientes para manter a hipófise inibida durante a infância. A promoção da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-ovário no início da puberdade é controversa. A princípio, há uma imaturidade deste eixo e a secreção do GnRH tem pulsatilidade irregular, assim como as gonadotrofinas, por isso não existe uma capacidade de promover um desenvolvimento folicular completo e conseqüentemente os ciclos são anovulatórios. Conforme ocorre a maturação do eixo, os ciclos assumem um padrão ovulatório, com completa sincronia entre o GnRH, o FSH e o LH. Hoje já se sabe que não há somente uma interação entre as gonadotrofinas e as células somáticas foliculares, mas também um intercâmbio de substâncias entre estas células e os oócitos⁴(A).

A qualidade do oócito é um fator crucial para a fertilidade feminina, porém tem-se ainda um conhecimento limitado sobre o que realmente constitui a qualidade oocitária e os mecanismos que a regulam. Um dos grandes desafios que permanecem no campo da Biologia e Medicina Reprodutiva é entender a natureza dos processos celulares e moleculares que controlam a aquisição da competência oocitária.

O objetivo geral deste trabalho foi primeiramente compilar referências básicas que tratam do processo de desenvolvimento folicular e, num segundo momento, promover uma revisão conceitual sobre a importância da comunicação entre oócito e células da granulosa humanas, mais especificamente as do *cumulus*, estabelecendo uma relação com a questão da maturação *in vitro* de oócitos. A partir disso, o objetivo específico desta revisão foi listar possíveis marcadores moleculares que poderiam ser usados como indicadores da qualidade oocitária para seleção de melhores embriões a serem utilizados posteriormente em técnicas de reprodução assistida humana.

Metodologia

Este trabalho consiste em uma revisão da literatura compreendida entre o ano de 2000 e 2009 enfocando o tema da foliculogênese, principalmente a interação entre o oócito e as células da granulosa e os fatores secretados por estas duas estruturas.

Para essa consulta foram utilizadas as seguintes palavras-chaves: “*granulosa cells*”, “*cumulus cells*”, “*oocytes*”, “*Reproductive Techniques, Assisted*” a partir do site de busca PubMed. As buscas foram limitadas ao intervalo decorrido de 2000 a 2009. Também foram incluídas algumas referências mais antigas, se pertinentes.

A busca feita por meio das palavras-chaves “*granulosa cells*” and “*cumulus cells*” and “*oocytes*” forneceu o resultado de 496 artigos. Foi realizada também a busca mais específica com a utilização dos termos “*granulosa cells*” and “*Reproductive Techniques, Assisted*”, resultando em 70 artigos. Os textos foram selecionados inicialmente pelo título e por meio da leitura inicial do resumo, selecionando-se, assim, aqueles que davam ênfase aos temas da interação oócito-células da granulosa, aos fatores secretados pelo oócito e à maturação oocitária. Os artigos que não atenderam a esses critérios de inclusão foram excluídos. Também foi feita a inclusão de alguns artigos a partir das referências bibliográficas dos inicialmente selecionados, por serem pertinentes e de muita importância para o tema dessa revisão. Após a escolha dos artigos de maior relevância, as informações foram compiladas e organizadas de forma coerente e estruturada, concluindo, portanto, os objetivos propostos pelo presente trabalho.

Muitas das informações foram obtidas de estudos com modelos animais e correlacionadas com situações de oócitos humanos, dadas as ressalvas pertinentes, devido ao pequeno número de artigos publicado, sendo, portanto, uma limitação do estudo.

Foliculogênese

Embora muitos dos processos envolvidos na reprodução feminina sejam cíclicos, o crescimento e a atresia dos folículos ocorrem de forma contínua desde a vida intrauterina até o final da vida reprodutiva.

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, começando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo de Graaf ou pré-ovulatório. O crescimento folicular envolve duas fases: (i) crescimento folicular precoce, do estágio de desenvolvimento primordial ao início da fase antral; (ii) desenvolvimento antral, do início da fase antral ao estágio pré-ovulatório. Os tipos de folículos ovarianos podem ser classificados em folículo primordial, folículo primário, folículo secundário ou pré-antral, folículo antral, folículo pré-ovulatório e corpo lúteo.

Folículo primordial

É composto por um oócito envolvido por uma camada de células fusiformes do estroma, que são precursoras das células da granulosa. O invólucro mais externo do folículo é a lâmina basal. O crescimento inicial do folículo parece não depender das gonadotrofinas, fato demonstrado pela presença de folículos pré-antrais em ratos *knockout* para FSH (FSHKO). Os estádios mais tardios da foliculogênese, como crescimento, diferenciação e seleção da coorte de folículos são extremamente dependentes da atividade do FSH. Duas fases importantes podem ser identificadas. A primeira é o *recrutamento inicial*, quando os folículos primordiais deixam o estado quiescente e iniciam o crescimento. Uma vez iniciado o crescimento, muitos folículos progridem até o estágio antral e, inevitavelmente sofrem atresia. A segunda é o *recrutamento cíclico*, quando, após a puberdade, com o suporte de gonadotrofinas, um pequeno número de folículos na fase antral pode continuar o seu crescimento. Normalmente, um folículo de Graaf é formado por mês em preparação para a ovulação.

Alguns fatores envolvidos na regulação dessa fase inicial de crescimento dos folículos ovarianos têm sido identificados, entre eles o kit ligante⁵(A). O hormônio anti-mülleriano (AMH) pertence à superfamília dos fatores de crescimento β (TGF- β) e o seu papel biológico na mulher ainda é pouco esclarecido, mas dados recentes levam a crer que desempenham um papel importante na função ovariana, e alguns dados experimentais da literatura sugerem que o AMH pode ser um marcador confiável da reserva ovariana e atue na modulação do recrutamento folicular⁶(A), atuando nas células pré-granulosas para limitar o número de unidades recrutáveis.

Durante essa fase inicial do desenvolvimento folicular, as células da granulosa compreendem uma população homogênea de células em proliferação que adquirem receptores para FSH e hormônios esteroides. Ao longo da foliculogênese, os folículos que falharam no processo de desenvolvimento sofrem um processo degenerativo. Apesar da grande população de folículos primordiais presentes no ovário mamífero, a maioria (99,9%) morre por atresia, via apoptose, e somente poucos folículos conseguem chegar à ovulação.

A apoptose é caracterizada por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células e pode ser deflagrada por estímulos externos por meio da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular (via extrínseca ou via receptor de morte celular), chamados receptores da morte, ou pelo estresse intracelular (via intrínseca ou mitocondrial). A apoptose nas células da granulosa pode ocorrer por essas duas vias: a via Fas-Fas L ou a via mitocondrial. Essas vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases executoras. O processo é regulado por inúmeros fatores inibidores e ativadores.

Folículo primário

Ocorre alteração do formato das células da granulosa, de fusiforme para cuboide, mas mantendo uma camada única ao redor do oócito que agora é maior. Há a formação da zona pelúcida, cuja estrutura compreende uma camada de mucopolissacarídeos produzidos pelas células da granulosa que adere ao oócito, envolvendo-o completamente.

O hormônio anti-mülleriano (AMH) é produzido pelos folículos em estágios precoces de desenvolvimento e atualmente demonstra-se como um marcador promissor na determinação da quantidade e da qualidade do patrimônio folicular ovariano⁶(A). Além disso, também desempenha um papel na transição para a fase folicular antral⁷(A).

Folículo secundário ou pré-antral

Ocorre proliferação das células da granulosa, constituindo-se múltiplas camadas, pontos de comunicação entre elas (*junções gap*) e acúmulo de líquido. Além disso, células mesenquimais estromais, de forma alongada, dispõem-se ao redor de toda a lâmina basal, constituindo a camada tecal. As células tecais mais próximas da lâmina basal tornam-se epitelioides e adquirem características secretoras, formando a teca interna. As mais distantes da lâmina basal formam a teca externa. A partir desse momento da formação do folículo pré-antral é que o FSH se torna importante. O desencadeante da dependência folicular às gonadotrofinas não é conhecido, mas parece se completar juntamente com o início da formação do antro. As únicas cé-

lulas que possuem receptores para o FSH são as da granulosa, que aumentam em número, promovendo um incremento de camadas ao redor do oócito.

Folículo antral

À medida que o folículo se desenvolve, os pequenos espaços entre as células da granulosa ocupados por líquidos coalescem, formando uma cavidade ou antro. A forma desse folículo se torna ovalada e o oócito é deslocado para um dos polos e se fixa à parede folicular através do *cumulus oophorus*. O líquido folicular se torna um ambiente rico em estrogênio e isto permite a continuação do desenvolvimento do folículo selecionado ovular, aumentando a proliferação das células da granulosa e o número de receptores de FSH. Com a formação do antro folicular, a teca interna se desenvolve plenamente, há um aumento da massa celular, aumento da vascularização e formação de vacúolos citoplasmáticos ricos em lipídios no interior das células da teca. À medida que o folículo se expande, as células circunjacentes do estroma são comprimidas e chamadas de teca externa.

A transição para o estágio antral também é acompanhada pela formação de 2 subpopulações de células da granulosa que diferem quanto à localização folicular e aspectos morfofuncionais. Essas diferentes subpopulações de células da granulosa são: 1. Células murais que estão próximas da membrana basal; 2. Células do *cumulus* que circundam o oócito. As células do *cumulus* têm maior capacidade de proliferação que as murais, talvez por ação de substâncias parácrinas liberadas pelo oócito. Nos estádios mais avançados do desenvolvimento folicular, as células da granulosa murais adquirem propriedades funcionais e morfológicas distintas: as localizadas na periferia, adjacentes à membrana basal se alongam e formam um epitélio pseudoestratificado; as células localizadas nas camadas mais internas que contornam o antro folicular, denominadas células da granulosa antrais, juntamente com as células do *cumulus* permanecem poliédricas-arredondadas e continuam a proliferar.

Diferentemente das células do *cumulus*, as células murais apresentam número progressivamente maior de receptores para o LH ao longo do desenvolvimento folicular, a expressão destes receptores e a produção de fluido folicular para preencher o antro ocorrem em resposta à ação do FSH. A lâmina basal que envolve as camadas das células murais estimula a expressão do gene LHCGR (*luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor*), que codifica os receptores para o LH, mas experimentos *in vitro* demonstraram que a presença do oócito inibe a expressão deste gene e que a ausência do mesmo pode permitir o desenvolvimento da expressão deste gene nas células do *cumulus*, indicando que provavelmente o oócito esteja envolvido na diferenciação dos tipos

de células da granulosa de acordo com a função que exercerão, e este processo parece ser mediado pelo GDF-9⁸(A).

As células da granulosa mostram grandes mudanças morfológicas e ultraestruturais, com distintos graus de diferenciação de acordo com sua localização folicular, estágio de desenvolvimento do folículo ovariano e também de acordo com a fase do ciclo menstrual. Existem também evidências de diferenças morfológicas e funcionais entre células da granulosa antrais e murais em relação à expressão de receptores de FSH e taxa de mitose⁴(A). As células da granulosa antrais e murais também parecem diferir quanto à capacidade esteroidogênica *in vivo* e *in vitro*; as células da granulosa antrais bovinas secretam significativamente mais esteroides *in vitro* que as células da granulosa murais⁹(A).

Segundo estudo de Li e colaboradores as células do *cumulus* (CC) e as células da granulosa murais (CGM) diferem entre si em vários aspectos: as CC produzem ácido hialurônico e sofrem o processo de expansão do *cumulus* em resposta ao FSH, enquanto as CGM, não. As CGM possuem maior atividade esteroidogênica do que as CC como indicado por níveis mais elevados de expressão de RNAm para as enzimas esteroidogênicas, como P450 ssc e P450 aromatase nas CC de rato. Os níveis de expressão de RNAm de vários fatores de crescimento e receptores de hormônios também diferem entre esses dois tipos celulares; por exemplo, as CC expressam níveis menores de RNAm para receptor de LH, kit ligante e ativador de plasminogênio e níveis mais elevados para IGF-I quando comparadas com as CGM. Além disso, elas desempenham funções distintas ao longo de toda a foliculogênese: as CC possuem um papel essencial durante o crescimento e desenvolvimento do oócito, enquanto as CGM têm uma função endócrina, dando suporte ao crescimento do folículo¹⁰(A).

Folículo pré-ovulatório (Graaf)

Folículo dominante que produz grandes quantidades de estrógeno. É cavitado (antro), com várias camadas de células da granulosa ao redor, com mais de 15 mm de diâmetro. As células da granulosa e o oócito são separados das outras camadas foliculares pela membrana basal, acima da qual se encontram as tecas interna e externa. A seleção do folículo fadado a ovular ocorre pela dominância do ambiente folicular estrogênico, o que o diferencia dos demais folículos em desenvolvimento. O elevado nível de estrógeno produz um feedback negativo na secreção de FSH pela hipófise. Conforme o folículo é estimulado com FSH, ocorre a secreção de enzimas necessárias para a produção de estrógeno e progesterona, essenciais para o desenvolvimento endometrial e modulação da secreção de gonadotrofinas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

As células da granulosa aumentam a quantidade de seus receptores para FSH, estimuladas pelo mesmo, e induzem a formação de receptores para LH na superfície. Este último evento protege o folículo dominante da privação de FSH. No período pré-ovulatório, a produção de estrógeno pelos ovários está elevada, atingindo seu pico cerca de 24 a 36 horas antes da ovulação. O LH é o responsável pelo controle dos receptores de progesterona nas células da granulosa. Ele faz com que haja a expressão destes receptores, para que as células da granulosa (luteinizadas) aumentem a produção de progesterona. O início da elevação do LH ocorre cerca de 34 a 36 horas antes da ruptura folicular, e seu pico, cerca de 10 a 12 horas antes desta extrusão. Este pico promoverá a retomada da meiose pelo oócito, provavelmente devido à ação do AMPc (adenosina monofosfato cíclico) que anula a ação inibitória do inibidor de maturação oocitária, maturação esta que será mais detalhadamente descrita no decorrer do trabalho.

Corpo lúteo

Normalmente, o ovário humano produz um único folículo dominante que resulta em uma única ovulação a cada ciclo menstrual. Imediatamente após a ovulação ocorrem profundas alterações na organização celular. Após a ovulação o folículo se transforma em uma glândula endócrina, o corpo lúteo. Ele secreta quantidades consideráveis de progesterona e estradiol. Entender os mecanismos responsáveis pelo controle do folículo dominante e do desenvolvimento do corpo lúteo é um objetivo crucial na pesquisa em reprodução. É nesse momento, pela primeira vez, que as células da granulosa tornam-se acentuadamente luteinizadas pela incorporação de vacúolos ricos em lipídios dentro do citoplasma. O hormônio luteinizante é o principal responsável pela ovulação e formação do corpo lúteo, considerando que o FSH é essencial para o desenvolvimento folicular ovariano.

Cross-talk oócito-células da granulosa e maturação oocitária

Pesquisas têm sido realizadas com objetivo de melhorar a eficiência e o potencial de maturação de oócitos *in vitro*. Todas as informações referentes aos oócitos humanos disponíveis na literatura são obtidas a partir de amostras de pacientes submetidas a procedimentos de reprodução assistida para tratamento de infertilidade conjugal, no qual são utilizadas altas doses de gonadotrofinas, com a finalidade de provocar superovulação. Assim sendo, as conclusões relacionadas à fisiologia dos folículos humanos é limitada a esta situação específica, não podendo ser

extrapolada para situações fisiológicas normais. De qualquer maneira, estas informações são extremamente úteis para nortear condutas e propor novas opções terapêuticas relacionadas à indução de ovulação. Entre as novas opções terapêuticas recentemente em voga está a maturação *in vitro* de oócitos, procedimento no qual, por razões diferentes, se obtém oócitos imaturos e produz-se sua maturidade já fora do folículo. Entretanto, os resultados obtidos com esta técnica em humanos ainda permanecem piores do que os encontrados para outras espécies animais, e certamente muito aquém do desejado.

As células da granulosa e do *cumulus* se comunicam com o oócito por meio de uma rede extensiva de canais transmembrana conhecidos como *junções gap*. As funções fisiológicas das *junções gap* no folículo são diversas, fornecendo suporte nutricional, transmitindo sinais elétricos e transportando moléculas mensageiras das células foliculares ao oócito. Estas moléculas mensageiras podem passar através das *junções gap* para as células vizinhas, propagando sinais induzidos por estimulação hormonal. Desta maneira, a presença de células foliculares no oócito é imprescindível para a obtenção de bons resultados na produção *in vitro* de embriões (PIV). A utilização de oócitos desnudos na PIV poderá comprometer todos estes processos, pois estes frequentemente não terão competência para se desenvolver em um embrião viável depois da fecundação. A presença das células do *cumulus* é benéfica para a obtenção de embriões bovinos após FIV, pois a eliminação destas células antes do processo de maturação diminui a taxa de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Atuam também na atração e seleção de espermatozoides, facilitam a capacitação espermática, reação acrossomal e penetração e previnem o endurecimento precoce da zona pelúcida, sendo, portanto, importantes na fecundação. Provavelmente a secreção de produtos metabólicos do *cumulus* ao redor do oócito cria um microambiente complexo benéfico ao processo de fecundação¹¹(A).

A comunicação entre as células da granulosa e o oócito é essencial para a foliculogênese, o crescimento e maturação oocitária¹²(A). Os benefícios da presença dessas células durante a maturação *in vitro* podem ser atribuídos à formação de um microambiente favorável (bioquímico e metabólico) ao redor do oócito¹³(A). Essas células são obtidas no momento da captação oocitária nos procedimentos de reprodução assistida, quando já sofreram a ação do hormônio luteinizante (LH) ou da gonadotrofina coriônica humana (hCG) administrados ao final da indução. Estes hormônios estimulam a conversão das células da granulosa em células luteinizadas, com a finalidade de posteriormente compor o corpo lúteo para a produção de progesterona. Este evento tem sido descrito como uma transformação de célula

secretora de proteínas para célula secretora de esteroides, que se opõe à proliferação e induz diferenciação¹⁴(A). Pelo fato do hCG apresentar um período de ação maior do que o LH e interagir com receptores específicos de LH nas células da teca e da granulosa, sua utilização tem a finalidade de favorecer a produção e ativação de enzimas que atuam no processo de maturação. Ao longo do processo de crescimento e desenvolvimento de oócitos *in vivo*, as células foliculares que rodeiam o oócito secretam várias substâncias, algumas das quais podem afetar as características oocitárias. O desenvolvimento de oócitos até a fase embrionária de blastocisto, que alcançaram o estágio de MII *in vitro*, geralmente é pior do que aqueles maturados *in vivo*. Isso é frequentemente atribuído à falta de fatores fisiológicos na maturação *in vitro* que regulam a aquisição de competência pelos oócitos a fim de se desenvolverem durante esse período. Além desse, outros fatores oriundos do ambiente artificial de cultivo também influenciam no processo de maturação *in vitro* e nos seus resultados, tais como: efeito do tempo de cultivo, temperatura, atmosfera gasosa, stress osmótico, o meio de cultura utilizado, entre outros. Vários fatores de crescimento contidos no fluido folicular foram listados como fatores que melhoram a competência oocitária tais como: fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento e transformação alfa (TGF- α), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), ativina A, inibina A, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator neurotrópico (NF) e midkine (MK)¹⁵(A), entre outros.

Há diversas maneiras de se aspirar oócitos imaturos humanos e maturá-los *in vitro*. Bem como há grande diversidade dos meios de cultivo, não havendo um consenso sobre quais os melhores meios de cultivo ou sobre os nutrientes que devem ser adicionados a eles para garantir competência oocitária assim como seu desenvolvimento *in vitro*. Apesar de toda esta variedade de formas para se operacionalizar a maturação *in vitro* os resultados em humanos ainda são bastante pobres.

Aquisição da competência oocitária

Em condições naturais a maturação oocitária ocorre após um período de crescimento e desenvolvimento no interior do folículo. Neste período o oócito precisa adquirir a competência para garantir o desenvolvimento embrionário após a fertilização. A aquisição da competência oocitária está intimamente ligada ao fenômeno da foliculogênese. Quando falamos de competência oocitária estamos nos referindo ao processo de *maturação nuclear* e *maturação citoplasmática* do oócito. A maturação nuclear é o período no qual ocorre a dinâmica de separação dos cromossomos. Já a maturação citoplasmática pode ser dividida em três eventos

principais: mudanças na morfologia e redistribuição das organelas citoplasmáticas; dinâmica dos filamentos do citoesqueleto e maturação molecular.

A maturação molecular trata da transcrição, armazenamento e processamento dos RNAm transcritos que serão, posteriormente, traduzidos em proteínas pelos ribossomos. As proteínas derivadas desses RNAm estão envolvidas tanto na maturação quanto nos eventos celulares subsequentes: fertilização, formação de pronúcleos e embriogênese inicial, devendo, portanto, ser estocadas até sua utilização. Como o consumo desses transcritos será feito antes da ativação do genoma embrionário, o armazenamento correto deles no citoplasma do oócito é de fundamental importância. Após a retomada da meiose, não haverá mais expressão gênica e, portanto, tudo o que foi produzido durante a fase de crescimento deverá ser metabolizado no momento adequado. As maiores causas de falha na maturação oocitária são o armazenamento, processamento e recrutamento inapropriado do RNAm materno¹⁶(A).

Várias moléculas são sintetizadas e acumuladas no interior do oócito e são de fundamental importância para o desenvolvimento e progressão da maturação e embriogênese inicial. A glutatona tem sido um dos mais investigados marcadores de maturação citoplasmática. Seus níveis de concentração intracelular aumentam à medida que o oócito prossegue seu desenvolvimento do estágio de vesícula germinativa até a metáfase II. Além da glutatona, moléculas de ATP também têm sido utilizadas como marcadores. A quantidade dessas moléculas em oócitos morfologicamente competentes aumenta de 1,4-1,8 pmol antes da maturação *in vitro* para 2,3-2,5 pmol após a maturação, com reflexo positivo também no desenvolvimento embrionário inicial¹⁷(A).

É verificado que durante o processo de maturação oocitária em ratos, os oócitos envolvidos pelas células do *cumulus oophorus* sofrem quebra da vesícula germinativa, reiniciando o processo de meiose em sistema de cultivo contendo glicose como única fonte de energia. Isso sugere interação metabólica entre oócitos e células do *cumulus oophorus*, já que o oócito utiliza o piruvato metabolizado a partir da glicose pelas células do *cumulus*. Para o desenvolvimento do oócito e do folículo são necessárias comunicações parácrinas e *junções gap*, e nestas interações estão incluídos o fluido folicular, fatores esteroides ativadores da meiose, cAMP, purinas, pirimidinas, aminoácidos e fatores de crescimento¹³(A). A maturação oocitária parece necessitar muito de piruvato nos estágios de prófase I ou metáfase II, e a estimulação das células do *cumulus oophorus* pelo FSH aumenta o uso de glicose e a produção de piruvato. As células do *cumulus oophorus* metabolizam a glicose até piruvato ou ATP, e são transferidos para o oócito através das *junções gap*¹⁸(A). Além disso, a expansão do *cumulus*,

embora não seja consenso e haja diferenças espécie-específicas, é descrita como um processo crítico para o desenvolvimento, ovulação e fertilização de oócitos, já que oócitos cuja maturação não está associada com a expansão do *cumulus* têm potencial limitado para a implantação¹⁹(A).

Em alguns países, devido a limitações legais nem todos os oócitos obtidos podem ser fertilizados. Nessas situações, a predição da qualidade embrionária é um desafio ainda maior, porque o tempo em que a avaliação preditiva pode ser feita é limitado ao intervalo entre a obtenção do oócito e a fertilização. Esse fato propôs a procura por parâmetros adicionais que possam dar suporte às avaliações morfológicas e metabólicas de oócitos a fim de selecionar apropriadamente aqueles que possuem maiores chances de fertilização e desenvolvimento. Em relação a isso, a análise das células do *cumulus* é uma boa abordagem para fornecer essas informações suplementares. Essas células, de fato, são intimamente conectadas ao oócito através de redes de *junções gap* durante o desenvolvimento folicular e a ovulação, formando uma interconexão funcional recíproca¹²(A).

Com o mesmo propósito de selecionar melhores oócitos a partir de novos parâmetros, Zhang et al. demonstraram que a qualidade dos oócitos obtidos com a hiperestimulação ovariana controlada varia consideravelmente nas técnicas de reprodução assistida. Apenas metade desses oócitos fertilizados completa o desenvolvimento pré-implantacional, e poucos desses chegam a implantar. As mudanças na expressão de genes como o GDF-9 e BMP-15 nos oócitos, ou da pentraxina 3 nas células do *cumulus*, podem ser monitorados para uma seleção apropriada do oócito a ser fertilizado²⁰(A). O GDF-9, um membro da superfamília do TGF- β , foi o primeiro fator oócito-específico que mostrou causar a expansão do *cumulus*. Ele funciona como um fator de ação parácrina do oócito, que regula várias enzimas-chave das células da granulosa importantes na expansão das células do *cumulus* e cria um microambiente ótimo para a aquisição da competência de desenvolvimento do oócito²¹(A). Os autores pretendiam verificar se o nível de expressão dos genes-alvo do GDF-9 nas células do *cumulus* poderia ser correlacionado com a qualidade do oócito, a qual foi avaliada como competência para ser fertilizado e para clivar *in vitro*.

O GDF-9, o BMP-15 e o BMP-6 são expressos seletivamente pelo oócito em diferentes espécies, nos estádios iniciais da foliculogênese. Mutações e deleções nos genes GDF-9 e BMP-15 geram consequências no número de folículos dominantes e taxa ovulatória em camundongos e ovelhas, demonstrando a importância destas proteínas secretadas pelo oócito na função ovariana. Estudo realizado em ovelhas demonstrou que a mutação em heterozigose nesses genes causou a hiperovulação,

pois mesmo os níveis reduzidos de BMP-15 e GDF-9 eram suficientes para que as células da granulosa sofressem mitose, estimulando os folículos a progredirem além do estágio primário. Entretanto, diminuía a citodiferenciação induzida pelo FSH, o que levou ao aumento do número de folículos pré-ovulatórios a sofrerem maturação precoce e ovularem mesmo pequenos. Já ovelhas com mutação em homozigose eram inférteis e com defeito no desenvolvimento folicular devido a um bloqueio da foliculogênese no estágio primário. Alguns autores também têm investigado a correlação, no ovário humano, entre mutações nos genes GDF-9 e BMP-15 e patologias como a falência ovariana prematura (FOP) e a síndrome dos ovários policísticos (SOP)²²(A). O achado de RNAm do GDF-9 e BMP-15 em oócitos humanos normais prediz que esses fatores de crescimento podem ter função fundamental na foliculogênese e fertilidade nas mulheres²²(A).

Para identificar candidatos que se correlacionem positivamente com o potencial de desenvolvimento do oócito é importante incluir genes associados à esteroidogênese e genes com envolvimento na apoptose, mas não se limitar a eles²³(A). Van Montfoort et al. examinaram CC oriundas de oócitos que resultaram em embriões com clivagem precoce e de oócitos cujos embriões não clivaram precocemente, utilizando técnica de Microarray. Esse estudo revelou 8 genes com diferenças consistentes de expressão: CCND2 (cyclin D2), CXCR4 (chemokine C-X-C motif receptor 4), GPX3 (glutathione peroxidase 3, plasma), CTNND1 (catenin, cadherin associated protein, delta 1), DHCR7 (7 dehydrocholesterol reductase), DVL3 (dishevelled, dsh homologue 3), HSPB1 (heat shock 27 kDa protein 1) e TRIM28 (tripartite motif containing 28). A função desses genes sugere um estado de hipóxia no microambiente das células do *cumulus* (CXCR4, GPX3, DVL3, HSPB1) ou de maturação tardia dos oócitos (CCND2, TRIM28, DHCR7, CTNND1) nos embriões que não clivaram precocemente²⁴(A).

Sem dúvida, o oócito se beneficiará de um microambiente no qual as células do *cumulus* se mantêm apropriadamente viáveis. Hussein et al. demonstraram que o oócito é capaz de criar esse microambiente favorável utilizando as células somáticas que o cercam²⁵(A). A partir disso, o seguinte questionamento pode ser feito: os fatores secretados pelos oócitos podem ser aplicados *in vitro* para melhorar a qualidade oocitária?

Fatores secretados pelo oócito

Por um bom tempo acreditava-se que os oócitos de mamíferos eram passivos na relação com suas células somáticas foliculares. Entretanto, há alguns anos surgiu um novo paradigma na biologia

oocitária. Recentemente, tornou-se evidente que o oócito, na verdade, é o centro regulador de funções das células foliculares e que desempenha um papel importante na regulação da oogênese, das taxas de ovulação e fecundidade^{12,26(A)}. O oócito consegue fazer isso por meio da secreção de fatores de crescimento solúveis que atuam nas células foliculares vizinhas a ele, regulando assim as funções das mesmas.

Na década de 70, foi proposto o novo conceito, para a época, de que o oócito secretava fatores que preveniam a luteinização folicular, demonstrado através da luteinização prematura de folículos antrais *in vivo* de coelhas após aspiração do complexo *cumulus oophorus* e por meio do cultivo de células da granulosa na presença de oócitos, provando que elas tornavam-se menos luteinizadas comparadas com as cultivadas na ausência de oócitos^{27(A)}.

Gilchrist et al. desenvolveram um modelo de cultivo para determinar a atividade biológica dos fatores secretados pelo oócito por meio da análise de sua influência sobre o crescimento das células da granulosa, chamado de *Bioassays of native OSFs*. O fundamento desse modelo é cocultivar células da granulosa ovariana na presença de oócitos denudados (DOs) e comparar a resposta delas com a de células da granulosa que foram cultivadas na ausência de DOs. Foi observado que a presença dos DOs na cocultura alterou drasticamente as funções das células da granulosa murais e do *cumulus in vitro*, e como esses dois tipos celulares não estavam em contato físico um com o outro, demonstrou-se que esse efeito era mediado por fatores solúveis que foram secretados pelos DOs no meio de cultivo e conseqüentemente as afetaram^{28(A)}.

Concluiu-se, a partir de vários ensaios, que o oócito regula as funções das células da granulosa e do *cumulus* em relação à:

- Regulação do kit ligante das células da granulosa: o kit ligante é produzido pelas células da granulosa pré-antrais e promove o crescimento do oócito através do receptor localizado no oolema. Os fatores secretados pelo oócito, GDF-9 e BMP-15, desempenham um papel nessa regulação. O GDF-9 inibe a expressão do kit ligante pelas células da granulosa enquanto o BMP-15 estimula^{28(A)}.
- Estímulo de proliferação das células da granulosa e das do *cumulus*: os oócitos secretam substâncias que estimulam a mitose (*oocyte-secreted mitogens*) das células da granulosa e as do *cumulus*. Observou-se que quanto mais DOs eram colocados nos poços de cultivo, maior era a síntese de DNA pelas células da granulosa, ou seja, estavam se multiplicando devido a esses fatores secretados. Esse crescimento era analisado pela incorporação de timidina pelas células da granulosa, que é um marcador para síntese de DNA^{28(A)}.

- Prevenção de apoptose das células da granulosa: quando o oócito era microcirurgicamente retirado e deixava-se somente o complexo *cumulus oophorus* (OOX) no meio de cultivo, observava-se o aumento de apoptose das células do *cumulus*, porém quando foram expostas aos fatores secretados por oócitos, esse processo era revertido. Isso é possível porque o oócito promove a expressão de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e suprime proteínas pró-apoptose Bax nas células do *cumulus*; o efeito antiapoptótico dos fatores secretados pelo oócito protege essas células dos efeitos externos que poderiam matá-las. Esse estudo também provou que quanto maior a distância das células da granulosa em relação ao oócito, maior era o índice de apoptose dessas células, comprovando mais uma vez o papel protetor dos fatores secretados pelo oócito^{29(A)}.
- Prevenção da luteinização folicular: o marco da luteinização das células da granulosa é a sua produção esteroidogênica (de progesterona, em particular). As células do *cumulus oophorus*, adjacentes ao oócito, produzem baixos níveis de progesterona, comparadas com as células da granulosa murais do mesmo folículo. Quando se retirava o oócito (OOX) ocorria uma dramática luteinização; havia o aumento dos transcritos que codificam os marcadores de luteinização, tais como receptor de LH, LHCGR^{30(A)}, P450ssc (enzima da esteroidogênese), CYP11A1^{31(A)}, levando ao aumento de secreção de progesterona pelas células OOX murinas, bovinas e suínas. Os níveis desses marcadores foram restabelecidos aos mesmos níveis de produção das células do COC, quando os oócitos denudados foram cocultivados com as OOX, provando que o oócito previne a luteinização de suas CC via ação dos fatores solúveis.
- Regulação do metabolismo das células da granulosa: os compartimentos celulares do COC possuem diferenças consideráveis em relação às atividades e condições metabólicas. Inicialmente acreditava-se que o oócito do folículo pré-antral vivia, provavelmente, em um microambiente de hipóxia ou até mesmo de anóxia. Porém Hirshfield (1991) demonstrou que à medida que o folículo cresce, desenvolve-se um gradiente de oxigênio da teca para o oócito, e a formação do antro folicular é associada com a prevenção de condições de hipóxia^{32(A)}. A diferença entre as necessidades metabólicas de oócitos e das CC sugere que ocorra um fenômeno de regulação entre esses dois tipos celulares. Sugiura et al. observaram que a produção de várias enzimas glicolíticas pelas CC de folículos antrais de ratos era elevada quando comparada com a produção das células da granulosa murais do mesmo folículo. Tal fato foi confirmado por hibridização *in situ*. Além disso,

mostraram que as células do OOX (complexo cujo oócito foi retirado) apresentavam níveis de RNAm de enzimas glicolíticas e a atividade glicolítica diminuídos, contudo esse nível era restabelecido após o cocultivo das OOXs com oócitos, comprovando o papel dos fatores solúveis sobre o metabolismo celular das células da granulosa³³(A).

Perspectivas futuras e conclusões

Devido ao grande interesse em formular critérios mais objetivos e confiáveis para a seleção de oócitos e embriões, muitas pesquisas têm sido realizadas recentemente, com modelos animais e humanos, para avaliar o perfil da expressão gênica das células da granulosa como possíveis indicadores moleculares da competência oocitária^{20,34-37}(A), e também investigar o perfil da expressão gênica dos oócitos em relação a sua competência.

Por meio da utilização da hibridização subtrativa supressiva do cDNA e das técnicas de *Microarray*, o grupo Sirard identificou vários marcadores em potencial nas células do *cumulus* de oócitos competentes bovinos, incluindo vários genes GDF9-alvo, por exemplo HAS2, TNFAIP6, PTGS2 e GREM1. Outros candidatos identificados são Inibina A subunidade β (INHBA), receptor de crescimento epidermal (EGFR), betacelulina (BTC) e a molécula CD44³⁷(A).

Li et al. descobriram que a qualidade dos oócitos humanos também está relacionada à transcrição abundante de genes específicos GDF-9 alvo (HAS2, PTGS2 e GREM1) nas células do *cumulus*³⁴(A). Recentemente, Feuerstein et al. relataram que um grande número de genes está associado à maturação nuclear do oócito, e os níveis de seus transcritos tornam-se elevados após reassumirem a meiose³⁶(A). Técnicas de *Microarray* estão sendo aplicadas para definir o perfil de expressão gênica das células somáticas ovarianas humanas em relação ao desenvolvimento da competência oocitária^{23,24}(A).

Concluiu-se que é necessário identificar candidatos que se correlacionem positivamente com o potencial de desenvolvimento do oócito e que para isso deve-se incluir genes associados à esteroidogênese e genes com envolvimento na apoptose, mas não se limitar a eles²³(A). Porém encontramos algumas contradições entre os artigos revisados. O mesmo gene ora é descrito como pertinente e fornece resultados satisfatórios para ser utilizado como preditor da qualidade oocitária, ora é descrito como não sendo relevante e excluído da possível lista de marcadores.

Essa inconsistência na identificação de marcadores moleculares por esses estudos pode ser resultado da falta de um padrão para avaliar a competência e viabilidade do embrião (oócitos que clivaram a embrião *versus* gravidez confirmada), diferenças

de amostras (células do *cumulus* extraídas do complexo *cumulus oophorus* individualmente *versus* pool de células do *cumulus* ou células da granulosa murais) ou diferentes plataformas utilizadas para análises de *genome-wide*.

Cillo et al. apoiam a hipótese de que as células do *cumulus* são promissoras para prever a qualidade oocitária, indicando que a determinação dos níveis de transcritos, tais como o de HAS2 e GREM1, nessas células, podem nos fornecer informações úteis que somem conhecimento acerca da seleção morfológica dos oócitos com melhores chances de serem fertilizados e se desenvolverem *in vitro*³⁵(A). Portanto, mais estudos são necessários para avaliar o potencial desses vários genes reportados e que possam ser utilizados como candidatos a preditores da qualidade oocitária.

Estudo como o de Hussein et al. demonstrou o conceito e a validade dos fatores secretados pelo oócito como suplementos para meios de MIV para melhorar a qualidade oocitária e subsequente potencial de desenvolvimento embrionário e fetal²⁵(A). Os estudos também sustentam o aperfeiçoamento de marcadores diagnósticos do potencial de desenvolvimento oocitário baseado nas funções específicas das células do *cumulus* sob o controle dos fatores solúveis secretados pelo oócito. Tais marcadores podem ter também um inestimável papel em procedimentos clínicos atuais de fertilização *in vitro* (FIV), à medida que os laboratórios se esforçam para selecionar o melhor oócito para fazer a inseminação e qual embrião transferir em um ciclo de tratamento. Atualmente, a taxa relativamente baixa de sucesso de MIV em humanos (gerada pelo desenvolvimento embrionário ruim pós-FIV e pelas baixas taxas de gravidez, comparadas com a FIV convencional) é o principal fator limitante de sua implementação clínica em larga escala. É necessária a validação da eficácia da adição dos fatores solúveis secretados pelo oócito nos meios de MIV e, se isso também levar a um melhor potencial de desenvolvimento oocitário, poderia ter implicações importantes na aplicação em larga escala da MIV na prática clínica e no modo de tratamento da infertilidade humana.

Percebemos, portanto, que todo esse conhecimento acerca das células do *cumulus* e a comprovação da sua importância e influência sobre a qualidade oocitária e, conseqüentemente, a possibilidade desses oócitos gerarem um embrião de boa qualidade, levou inúmeros pesquisadores a olhar com outros olhos para essas células e, a partir delas, começar a tentar listar marcadores moleculares que poderiam ser usados como preditores da qualidade oocitária para selecionar, de maneira mais completa e segura, aqueles que gerariam melhores embriões para ser utilizados em procedimentos de reprodução assistida. É importante ressaltar, também, que o objeto de

estudo deste trabalho é muito recente, e ainda há muitos resultados contraditórios entre os vários artigos revisados, o que impossibilita afirmar de maneira concreta e segura quais os marcadores mais eficazes.

Assim como se tem dado importância à investigação de possíveis marcadores moleculares a partir das células do *cumulus*, é preciso também aprimorar a prática de cocultivo de oócitos com células da granulosa e estudar a influência dos fatores solúveis secretados por eles na determinação e regulação das funções dessas células. Comprovando-se a importância dos fatores secretados pelo oócito, poderemos utilizá-los como suplementação para meios de MIV,

pois a compreensão exata das necessidades metabólicas do oócito em sistemas de cultivo é fundamental para que seja estabelecida a condição ideal para que o maior número possível de oócitos maturados *in vitro* adquira a competência de desenvolvimento e tornem-se hábeis para sustentar o desenvolvimento inicial do embrião. Em contrapartida, mais estudos são necessários para que se possam determinar as concentrações necessárias desses fatores e estipular o tempo ideal de cultura. Com isso haverá a possibilidade de desenvolver um sistema de cultivo que crie condições ideais para simular o microambiente folicular natural de oócitos imaturos humanos.

Leituras suplementares

- Moenter SM, Brand RC, Karsch FJ. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology*. 1992;130(5):2978-84.
- Cortvrindt R, Smitz J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *Reprod Domest Anim*. 2001;36(1):3-9.
- Vaskivuo TE, Tapanainen JS. Apoptosis in the human ovary. *Reprod Biomed Online*. 2003;6(1):24-35.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 2008;14(2):159-77.
- Celestino JJH, Matos MHT, Saraiva MVA, Figueiredo JR. Regulation of ovarian folliculogenesis by Kit Ligand and the c-Kit system in mammals. *Anim Reprod*. 2009;6(3):4319.
- Themmen AP. Anti-Mullerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2005;34:18-21.
- Durlinger AL, Grujters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001;142(11):4891-9.
- Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Eppig JJ. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod*. 2000;63(6):1669-75.
- Rouillier P, Sirard MA, Matton P, Guilbault LA. Immunoneutralization of transforming growth factor alpha present in bovine follicular fluid prevents the suppression of the follicle-stimulating hormone-induced production of estradiol by bovine granulosa cells cultured in vitro. *Biol Reprod*. 1997;57(2):341-6.
- Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod* 2000;63(3):839-45.
- Ancioto KL, Vantini R, Garcia LM, Mingoti GZ. Influência das células do cumulus e do meio de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2004;32:118.
- Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*. 2004;82-83:431-46.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*. 2003;9(1):35-48.
- Figenschau Y, Sundsfjord JA, Yousef MI, Fuskevåg OM, Sveinbjörnsson B, Bertheussen K. A simplified serum-free method for preparation and cultivation of human granulosa-luteal cells. *Hum Reprod*. 1997;12(3):523-31.
- Ikeda S, Ichihara-Tanaka K, Azuma T, Muramatsu T, Yamada M. Effects of midkine during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence. *Biol Reprod*. 2000;63(4):1067-74.
- Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*. 2001;55(6):1241-54.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*. 2001;64(3):904-9.
- Downs SM, Humpherson PG, Leese HJ. Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. *Mol Reprod Dev*. 2002;62(1):113-23.
- Yeo CX, Gilchrist RB, Lane M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. *Biol Reprod*. 2009;80(5):1072-80.
- Zhang X, Jafari N, Barnes RB, Confino E, Milad M, Kazer RR. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil Steril*. 2005;83 Suppl 1:1169-79.
- Pangas SA, Matzuk MM. The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. *Biol Reprod*. 2005;73(4):582-5.
- Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttent F, Ritvos O, Aittomaki K, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 2006;154(5):739-44.
- Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod*. 2008;23(5):1118-27.
- Van Montfoort AP, Geraedts JP, Dumoulin JC, Stassen AP, Evers JL, Ayoubi TA. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(3):157-68.
- Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol*. 2006;296(2):514-21.
- Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*. 2007;67(1):6-15.
- El-Fouly MA, Cook B, Nekola M, Nalbandov AV. Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology*. 1970;87(2):286-93.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 2008;14(2):159-77.
- Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 22):5257-68.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod*. 1997;56(4):976-84.
- Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 8):1330-40.
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*. 1991;124:43-101.
- Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol*. 2005;279(1):20-30.
- McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod*. 2004;19(12):2869-74.
- Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction*. 2007;134(5):645-50.
- Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R, Royere D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod*. 2007;22(12):3069-77.
- Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriny O, Dielemann S, et al. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biol Reprod*. 2008;79(2):209-22.