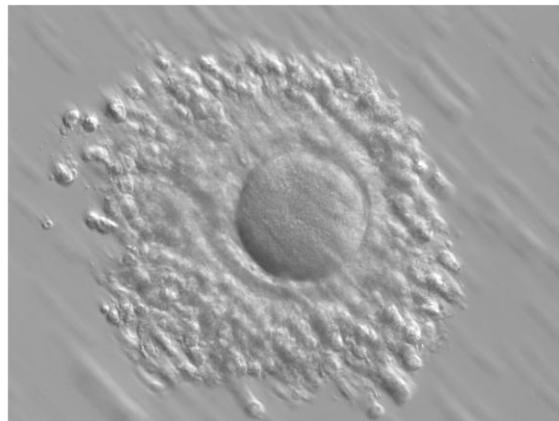




DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Seleção de Ovócitos para as Técnicas de Reprodução Assistida
com base no estudo das Células do *Cumulus*



Bárbara Sofia Leitão Pinhão Lourenço

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Seleção de Ovócitos para as Técnicas de Reprodução Assistida com base no estudo das Células do *Cumulus*

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Ramalho-Santos (Universidade de Coimbra) e sob a co-orientação da Doutora Ana Paula de Sousa (Hospitais da Universidade de Coimbra).

Bárbara Sofia Leitão Pinhão Lourenço

2012

*A verdade encontra-se sempre na simplicidade
e não na multiplicidade e confusão das coisas.*

Isaac Newton

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor João Ramalho Santos, por todo o apoio e toda a confiança que depositou em mim. Por me dar a oportunidade de trabalhar neste grupo de investigação fantástico, por me incentivar e ajudar nestes primeiros passos no mundo científico.

À pessoa que tem sempre razão, a Ana Paula. Por todos os dias ter algo para me ensinar, por me desafiar, por confiar, por me tirar da minha zona de conforto e por acreditar em mim e no meu trabalho, mesmo quando eu não acreditei. Acima de tudo, por ser capaz de conciliar tão bem o papel de “chefe” com o de amiga.

Ao Serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra, em especial à Professora Doutora Teresa Almeida Santos. Agradeço a grande oportunidade de desenvolver o meu trabalho neste serviço extraordinário. Agradeço também por aqui ter percebido que os beneficiários directos do nosso trabalho estão ali, à espera que o nosso sucesso se transforme também no deles.

Ao Serviço de Histocompatibilidade do Centro, particularmente ao Doutor Artur Paiva, agradeço por me ter acolhido e me ter dado a oportunidade de desenvolver uma parte do meu trabalho neste Serviço, sempre com grande amabilidade, simpatia e motivação. Um especial agradecimento à Susana Pedreiro por ter sido incansável em me receber e auxiliar em tudo o que precisei. Obrigada não só por me teres dado a conhecer a citometria de fluxo mas também pela tua boa-disposição e pelo teu apoio!

À Professora Doutora Teresa Gonçalves e à Doutora Chantal Fernandes pela gentileza na cedência da estaurosporina usada neste trabalho. À Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro e à Doutora Ana Cristina Gonçalves por me terem emprestado Anexina V para obter dados preliminares. À Doutora Luísa Cortes a gentileza de me ter iniciado na Microscopia Confocal de Fluorescência.

À Sofia, a pessoa que debita mais palavras por segundo. Obrigada não só por partilharmos uma bancada e uma secretária mas por partilharmos este ano, este momento. Obrigada pela ajuda em horas de aflição e pelas gargalhadas que ainda ecoam naquele Serviço! À Solange por aturar e assistir impávida e serena às nossas palhaçadas, obrigada!

A todo o grupo de Biologia da Reprodução e Células Estaminais por me ter recebido, por ter acompanhado o meu trabalho e pelas ideias trocadas. Em especial, à Sandra, à Paula, à

Xana, à Renata, à Marta, à Ana Sofia, ao Sandro, à Carla, à Tânia, ao Marcelo, à Maria Inês, à Andreia Gomes, à Sónia, à Andreia Silva e à Mónica.

Aos funcionários do Serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra, nomeadamente, às auxiliares, às secretárias, às enfermeiras e aos médicos. Em especial às funcionárias do laboratório de Citogenética Doutora Ana Isabel, Néné, Raquel, D. Fátima e Silvana. Obrigada por todos os momentos passados neste Serviço, que me ajudaram a crescer a nível profissional mas principalmente a nível pessoal. Obrigada por todos os momentos de descontração que ajudaram a combater os dias mais cinzentos! Principalmente obrigada por me acolherem de forma tão carinhosa e pela confiança depositada!

À Joana, és a minha pessoa! As palavras não chegariam para te agradecer tudo. Obrigada por existires, por estares sempre presente e por tanto nos rirmos até doer a barriga como, por melhor que ninguém, consegues chamar-me à razão! Isto sem ti não era possível... ou melhor, até era mas não era a mesma coisa!

A todos os meus amigos. Principalmente, à Carla, à Cátia, à Cristiana, à Andreia e à Ludmila por me acompanharem há tantos anos. Por me conhecerem como ninguém e me desculparem e entenderem todos os momentos em que estive ausente. A verdadeira amizade perdura com os anos. À Ana Luísa e à Carolina pelo partilhar dos momentos da licenciatura, que me levaram até aqui! À Carina, ao João, à Patrícia, ao Ivan, à Cátia e à Joana Francisco, pessoas fantásticas que juntamente comigo partilharam a aventura que foi o mestrado!

A todos os meus familiares, em especial à Sara e ao Bernardo por serem fundamentais na minha vida e por estarem sempre ao meu lado. Aos meus pais que em todas as situações me apoiaram e suportaram, por serem incansáveis, pelo seu amor incondicional, por serem essenciais e indispensáveis no meu crescimento e na formação do meu carácter. Obrigada por aturarem tudo, até o mau feitio! Às minhas irmãs, Bia e Mariana, por serem tudo para mim, por serem a razão de eu querer ser melhor e um exemplo, por tornarem a vida muito mais divertida!

Por fim, ao Daniel, que tem sempre um sorriso aberto e um abraço forte. Por estar sempre presente e acima de tudo por ter a capacidade de me ouvir como ninguém. Obrigada por rires para mim, por rires comigo e por te rires de mim. Tornas tudo simples e bom!

Lista de Abreviaturas

ADN- ácido desoxirribonucleico

AMPc- adenosina monofosfato cíclico

ARN- ácido ribonucleico

AREG- anfiregulina

AT- atrésico

ATP- adenosina trifosfato

BCL2L11- *B-cell lymphoma 2-like protein 11*

BDNF- factor neurotrófico derivado do cérebro

BMP-15- proteína morfogenética do osso 15

Ca²⁺- cálcio

CC- células do *cumulus*

Cx- conexina

Cx43- conexina 43

COX2 ou **PTGS2**- ciclooxigenase 2

DAPI- 4,6-diamino-2-phenylindole

DEG- degenerado

FF-MAS- esteroide do líquido folicular ativador da meiose

FITC- isocianato de fluoresceína

FIV- fecundação *in vitro*

FSH- hormona folículo-estimulante

GDF-9- factor de diferenciação do crescimento-9

GDF-9B- factor de diferenciação do crescimento-9B

GREM1- gremlin

GSH- glutationa

GSSG- glutationa oxidada

HAS2- sintetase do ácido hialurónico 2

HUC- Hospitais da Universidade de Coimbra

ICSI- injeção intracitoplasmática de um espermatozóide

IU- inseminação artificial ou intra-uterina

LH- hormona luteinizante

MI- metafase I

MII- metafase II

mPR- receptor de progesterona membranar

mPR α - receptor de progesterona membranar subtipo α

mPR β - receptor de progesterona membranar subtipo β

mPR γ - receptor de progesterona membranar subtipo γ

NADPH- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reduzida

NFIB- *nuclear factor 1 B-type*

nPR- receptor de progesterona genómico

nPR-A- receptor de progesterona genómico isoforma A

nPR-B- receptor de progesterona genómico isoforma B

PBS- solução salina tamponizada com fosfato

PCK1- fosfoenolpiruvato carboxicinase 1

PCR- reacção em cadeia da polimerase

PE-Texas Red- ficoeritrina-Texas Red

PGRMC1- componente 1 do receptor de progesterona membranar

PGRMC2- componente 2 do receptor de progesterona membranar

PPP- via das Pentoses-Fosfato

PRPP- fosforibosilpirofosfato

PTX-3- pentraxina 3

ROS- espécies reactivas de oxigénio

SCD1 e SCD5- *estearoil-Coenzima A desaturase 1 e 5*

STAR- proteína reguladora da esteroidogénese aguda

rTNF- receptores de factores de necrose tumoral

RT-PCR- reacção em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

Ta- temperatura ambiente

TGFβ1- factor de crescimento transformador β1

VG- vesícula germinal

ZP- zona pelúcida

Resumo

As técnicas de reprodução assistida, criadas para ultrapassar o problema da infertilidade humana que afecta cerca de 13% a 15% dos casais em idade reprodutiva em todo o Mundo, encontram-se associadas a taxas de sucesso reduzidas (cerca de 30%). Um dos passos cruciais nestas técnicas é a escolha dos gâmetas a utilizar, assim como, dos embriões a transferir para o útero da mulher. Actualmente, a escolha dos melhores ovócitos recai em aspectos meramente morfológicos e, por isso, muito subjectivos.

No ovário ao longo do desenvolvimento folicular, os ovócitos maturam e desenvolvem-se com uma estreita relação com as suas células circundantes, as células do *cumulus*. Estas células somáticas são essenciais no desenvolvimento do ovócito visto que auxiliam a maturação do ovócito, a sua condução no oviducto e participam nos mecanismos que controlam o acesso do espermatozóide ao ovócito.

Dado que não se pode estudar e avaliar o ovócito a sua utilizar nas técnicas de reprodução assistida, pois iria destruir-se a célula, pretendeu-se avaliar diversos parâmetros nas células do *cumulus* e determinar se esses parâmetros se relacionam com o estado do ovócito, assim como, com parâmetros clinicamente relevantes. Assim neste trabalho, avaliaram-se parâmetros como a densidade das células do *cumulus* por ovócito, a expressão de receptores de progesterona (hormona que desempenha um papel importante na reprodução feminina), a expressão de conexina 43 (proteína integrante das junções *gap*, que são essenciais na comunicação entre as células do *cumulus* e o ovócito) e apoptose nas células do *cumulus*.

Com este trabalho foi possível estabelecer que um ovócito humano é rodeado, em média, por 17216 ± 24227 células do *cumulus*. Além disso, a densidade das células do *cumulus* é dependente do grau de maturidade do ovócito, estando ovócitos em metafase II associados a mais células do *cumulus* do que os ovócitos em metafase I. Adicionalmente, descrevemos também que os ovócitos que dão origem a embriões de melhor qualidade são aqueles que são

rodeados por células do *cumulus* num número mais elevado e com tendência a possuir menor incidência de apoptose. Os ovócitos maduros apresentaram células do *cumulus* com diferentes níveis de expressão de receptores de progesterona, sendo o receptor genómico nPR-A/B expresso em mais células do que o não genómico PGRMC1. O estabelecimento de gravidez parece estar relacionado com uma expressão mais alta de conexina 43 nas células do *cumulus*.

No futuro, após a validação destes parâmetros com a análise de um maior número de amostras, espera-se poder seleccionar os ovócitos e/ou embriões a utilizar nas técnicas de reprodução assistida com base na avaliação das células do *cumulus*. Porém, ainda há muitos aspectos por estudar nestas células a fim de se estabelecer totalmente a relação das células do *cumulus* com o ovócito. Contudo, pode-se concluir que as células do *cumulus* apresentam um grande potencial como biomarcadores da qualidade do ovócito e do embrião. Idealmente, espera-se que o estudo e análise das células do *cumulus* levem a um aumento nas taxas de gravidez, aumentando o sucesso das técnicas de reprodução assistida.

Palavras-Chave: Células do *Cumulus*; Qualidade Ovocitária; Biomarcadores Ovocitários; Biomarcadores Embrionários; Fertilidade Feminina.

Abstract

The assisted reproductive technologies, created to overcome the human infertility issue that affects about 13-15% of couples in reproductive age worldwide, are associated to low success rates (about 30%). One of the crucial steps on these techniques is the selection of the gametes, as well as, embryos for transfer to women uterus. Actually, the selection of the better oocytes resides only on morphological aspects and, consequently, it is very subjective.

In the ovary, during the follicular development, oocytes mature and develop with a strait relationship with their surrounding cells, the *cumulus* cells. These somatic cells are essential in the oocyte development because they facilitate the oocyte maturation, the oocyte conduction in the oviduct, as well as, the sperm access to the oocyte.

As the study and evaluation of the oocyte that will be used for assisted reproductive technologies is not possible because we would destroy it, we pretend to evaluate several parameters in the *cumulus* cells and determine if those are related to the oocyte status, as well as, to relevant clinical parameters. In this work, we evaluate parameters like *cumulus* cells density per oocyte, expression of progesterone receptors (hormone that has an important role in female reproduction), expression of connexin 43 (gap junction protein, that is essential to *cumulus* cells and oocyte communication) and apoptosis in *cumulus* cells.

With this work, we were able to establish that a human oocyte is surrounded by, on average, 17216 ± 24227 *cumulus* cells. Furthermore, the density of *cumulus* cells is reliable with the oocyte maturity, where metaphase II oocytes are associated to more *cumulus* cells than metaphase I oocytes. Additionally, we describe that oocytes which originate better quality embryos are those surrounded by more numerous *cumulus* cells that tend to present minor apoptosis incidence. Mature oocytes are enclosed by *cumulus* cells that present different levels of progesterone receptors expression, where genomic receptor nPR-A/B is expressed in more *cumulus* cells than the non-genomic PGRMC1. The establishment of a pregnancy seems to be related with a higher connexin 43 expression in *cumulus* cells.

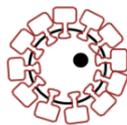
In the future, after the validation of these parameters using a higher number of samples, we hope to be able to select the oocytes and/or embryos to use in assisted reproductive technologies based on the evaluation of the *cumulus* cells. However, there are many aspects to study in these cells to totally establish the *cumulus* cells-oocyte relationship. Although, we can conclude that *cumulus* cells present a huge potential as a biomarker for oocyte and embryo quality. Ideally, we expect that the study and analysis of *cumulus* cells lead to an improvement in pregnancy rates, increasing the success of the assisted reproductive technologies.

Keywords: *Cumulus* Cells; Oocyte Quality; Oocyte Biomarkers; Embryonic Biomarkers; Female Fertility.

Índice

Agradecimentos	I
Lista de Abreviaturas	II
Resumo	VI
Abstract	VIII
Índice	X
Capítulo I: Introdução	1
1.1. Infertilidade Humana e Técnicas de Reprodução Assistida.....	2
1.2. A Formação da Célula Feminina - O Ovócito Secundário.....	6
1.2.1. A Ovogénese.....	6
1.2.2. A Folículoogénese.....	9
1.3. As Células do <i>Cumulus</i>	14
1.3.1. Comunicação entre o Ovócito e as Células do <i>Cumulus</i>	14
1.3.2. Funções das Células do <i>Cumulus</i>	17
1.3.2.1. Antes da Ovulação.....	17
1.3.2.2. Durante a Ovulação.....	21
1.3.2.3. Após a Ovulação.....	21
1.4. Características das Células do <i>Cumulus</i> e a sua Relação com o Ovócito.....	25
1.4.1. Receptores de Progesterona.....	25
1.4.2. Junções <i>gap</i> e Conexinas.....	27
1.4.3. Apoptose.....	28
1.4.4. Genómica e Proteómica.....	31
1.5. Objectivos.....	32
Capítulo II: Materiais e Métodos	33
2.1. Materiais e Reagentes.....	34
2.2. Material Biológico.....	34

2.2.1. Obtenção e Preparação das Células do <i>Cumulus</i>	34
2.3. Testes Laboratoriais.....	35
2.3.1. Quantificação do Número de Células do <i>Cumulus</i> por Ovócito.....	35
2.3.2. Teste do Azul de Tripano.....	36
2.3.3. Imunocitoquímica, Microscopia de Epifluorescência, Microscopia Confocal de Fluorescência e Citometria de Fluxo.....	36
2.3.4. Teste de Detecção da Actividade das Caspases-3/7.....	38
2.4. Análise Estatística.....	39
Capítulo III: Resultados	41
3.1. Número de Células do <i>Cumulus</i> por Ovócito e Viabilidade das Células do <i>Cumulus</i>	42
3.2. Receptores de Progesterona- Presença, Localização e Expressão.....	45
3.3. Conexina 43- Presença, Localização e Expressão.....	51
3.4. Actividade das Caspases-3/7.....	54
Capítulo IV: Discussão	57
Capítulo V: Conclusões	73
Capítulo VI: Bibliografia	76



Capítulo I: Introdução

Seleção de Ovócitos para as Técnicas de Reprodução Assistida com base no estudo das Células do *Cumulus*

1.1. Infertilidade Humana e Técnicas de Reprodução Assistida

A infertilidade humana, definida como a ausência de procriação após um ano de relações sexuais sem contracepção (World Health Organization, 2012), é um problema a nível mundial e nos últimos anos tem-se verificado um grande aumento nas suas taxas (Skakkebaek *et al.*, 2006). Apesar de a sua causa se poder dever a factores masculinos, a factores femininos, a ambos os factores, ou a causas desconhecidas (as denominadas causas idiopáticas), a infertilidade é sempre considerada conjugal. Este problema afecta cerca de 13-15% dos casais em todo o Mundo (World Health Organization, 2012), sendo mais prevalente nos países desenvolvidos (Cates *et al.*, 1985).

A fertilidade feminina tem como base um normal desenvolvimento do ovócito que termina antes da ovulação (Jamnongjit e Hammes, 2005). A sobrevivência do embrião, o estabelecimento e a manutenção da gravidez, o desenvolvimento fetal e até doenças em adulto são condições afectadas pela qualidade do ovócito (Krisner, 2004). Na mulher os factores que podem levar a problemas de fertilidade são normalmente de natureza endócrina, vaginal, cervical, uterina, tubar ou pélvico-peritoneal (Pellati *et al.*, 2008).

De modo a ultrapassar os problemas de procriação, existe, hoje em dia, um conjunto de metodologias que possibilitam que casais inférteis possam ter filhos, denominadas técnicas de reprodução assistida. Com um sucesso de cerca de 30% a nível mundial, a escolha da técnica depende do tipo de problema de fertilidade que o casal possui. As técnicas de reprodução assistida mais utilizadas nos centros de procriação medicamente assistida em todo o Mundo são três: a inseminação artificial ou intra-uterina (IIU), a fecundação *in vitro* (FIV) e a injecção intra-citoplasmática de um espermatozóide (ICSI) (Malter e Cohen, 2002). Na IIU, há a deposição de espermatozoides na cavidade uterina e apenas tem de se proceder à recolha e selecção de espermatozoides e à posterior deposição no momento adequado do ciclo ovulatório feminino. Na FIV procede-se a estimulação hormonal da ovulação, recolha de

ovócitos por punção, recolha e selecção de espermatozóides, junção dos gâmetas e formação do embrião *in vitro* e, por último, transferência do embrião para o útero. A ICSI é das três a técnica mais invasiva, em que o espermatozóide seleccionado é injectado no citoplasma do ovócito (ooplasma), há formação do embrião *in vitro* e a posterior transferência do embrião para o útero (figura 1). Esta técnica de reprodução assistida é usada quando o problema de infertilidade é essencialmente masculino, ou seja, quando o homem tem uma qualidade seminal considerada média ou baixa (Malter e Cohen, 2002).



Figura 1- Imagem da técnica de ICSI (fotografia cedida pelo Serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC)).

Quando um casal se dirige a um centro de procriação medicamente assistida para a realização de FIV ou ICSI, a mulher é, na maior parte das vezes, submetida a um protocolo de estimulação hormonal da ovulação, que irá depois permitir a recolha dos seus ovócitos, através de punção folicular ecoguiada. No entanto, enquanto num ciclo menstrual normal se obtém um ovócito maduro aquando da ovulação, com este protocolo a que a mulher é submetida, obtêm-se, em geral, vários ovócitos que podem apresentar diferentes graus de maturidade e qualidade.

Como parece lógico, a probabilidade de obter embriões com boa qualidade é maior se se partir também de ovócitos com boa qualidade (Xia, 1997). Deste modo, haverá sempre uma necessidade de saber quais dos ovócitos recolhidos na punção folicular terão maior qualidade para poderem ser inseminados ou injectados e conseqüentemente, quais darão origem aos melhores embriões para serem transferidos.

O ovócito pode ser classificado quanto ao seu grau de maturação em ovócito em metafase II (MII), em metafase I (MI), em fase de vesícula germinal (VG), degenerado (DEG; em que o ovócito degenerou e apenas estão presentes as células do *cumulus* que o rodeiam e por vezes a zona pelúcida) ou atrésico (AT; em que esta célula sofreu atresia e está por isso inviável) (Almeida *et al.*, 2012). Para além desta classificação, existem técnicas usadas rotineiramente nos centros de procriação medicamente assistida para avaliar a qualidade dos ovócitos, como a expansão da matriz do *cumulus* que circunda o ovócito (usada para a avaliação da maturidade do ovócito quando se realiza FIV; figura 2; Veeck, 1990), mas também a morfologia do complexo *cumulus*-ovócito (nome dado ao conjunto do ovócito com as células do *cumulus* que o rodeiam), o diâmetro do ovócito ou a homogeneidade do ooplasma. Contudo, estas técnicas morfológicas que avaliam a qualidade do ovócito não se revelam muito fidedignas.

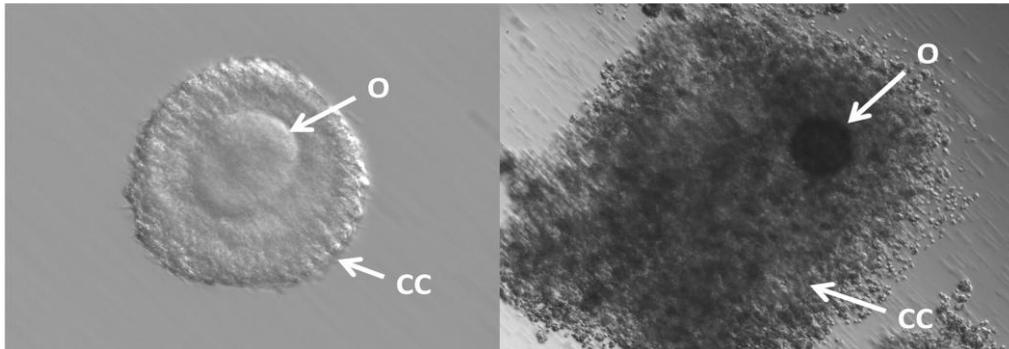


Figura 2 - Ovócitos humanos rodeados pelas células do *cumulus*. À esquerda, um ovócito imaturo com uma matriz do *cumulus* pouca expandida; à direita, um ovócito maturo com uma grande expansão das suas células do *cumulus* circundantes. CC (células do *cumulus*); O (ovócito) (fotografias cedidas pelo Serviço de Reprodução Humana dos HUC).

Esta necessidade de saber quais os ovócitos recolhidos na punção folicular que darão origem aos melhores embriões para serem transferidos prende-se também com o facto de não se poderem transferir para o útero da paciente todos os embriões obtidos das técnicas de reprodução assistida. Em Portugal por lei, apenas se podem transferir dois embriões e em caso

excepcionais e bem justificados poderá proceder-se à transferência de três embriões (alínea b) do n.º 2 do artigo 30.º da Lei n.º 32/2006, de 26 de Julho). Em Fevereiro de 2010 foi criado um documento com normas de orientação para a classificação morfológica da qualidade embrionária (*ALPHA Scientists in Reproductive Medicine* e *Special interest group of Embryology da ESHRE* - Consensos de Istambul, 2011; Almeida *et al.*, 2012). Neste, os embriões obtidos das técnicas de reprodução assistida são classificados de acordo com a dimensão dos blastómeros, presença ou ausência de multinucleação e grau de fragmentação celular (tabela 1).

Tabela 1 – Classificação Morfológica da Qualidade Embrionária (adaptado de Almeida *et al.*, 2012).

Grau	Classificação	Descrição	Embrião
1	Boa Qualidade	<ul style="list-style-type: none"> • <10% de fragmentação celular; • Tamanho das células específico do estadio celular; • Ausência de multinucleação. 	
2	Qualidade Razoável	<ul style="list-style-type: none"> • 10%-25% de fragmentação celular; • Tamanho das células específico do estadio celular para a maioria das células; • Ausência de multinucleação. 	
3	Má Qualidade	<ul style="list-style-type: none"> • >25% de fragmentação celular; • Tamanho das células não específico do estadio celular; • Presença de multinucleação. 	

Como o sucesso das técnicas de reprodução assistida é dependente da maximização da eficiência de cada passo do seu procedimento (Ebner *et al.*, 2003), nasce a necessidade de uma nova abordagem para a selecção dos melhores gâmetas femininos a usar nas técnicas de reprodução assistida ou então na selecção dos melhores embriões a transferir para o útero da paciente.

1.2. A Formação da Célula Feminina - O Ovócito Secundário

O sistema reprodutor feminino é constituído por duas gónadas, os ovários. É nestes que ocorrem dois processos simultâneos, a foliculogénese e a ovogénese, cujo produto em cada ciclo menstrual é um folículo de *Graaf*, que não é mais que um ovócito secundário (ovócito totalmente desenvolvido e pronto a ser fecundado) rodeado por células foliculares (Faddy *et al.*, 1992). Tanto a ovogénese como a foliculogénese são altamente reguladas pelo sistema endócrino, mais precisamente, pelo eixo hipotálamo-hipófise. Assim, o hipotálamo liberta a hormona libertadora das gonadotropinas que actua na hipófise anterior. Esta por sua vez liberta as gonadotropinas: hormona folículo-estimulante (FSH) e hormona luteinizante (LH). No ovário, a FSH tem como principal função o aumento do crescimento dos folículos ováricos e a LH que atinge a sua concentração máxima possibilita a ovulação e assim, a libertação do folículo de *Graaf* (Fox, 2004).

1.2.1. A Ovogénese

O desenvolvimento das gónadas e das células germinais começa muito cedo. De facto, é logo no primeiro mês de vida embrionária, que uma pequena população de **células germinais primordiais** migra do saco vitelino até os primórdios gonadais (onde as gónadas se estão a começar a desenvolver). Nas mulheres, as células germinais primordiais dividem-se, transformando-se em **ovogónias** (figura 3) e no segundo mês de vida intra-uterina há cerca de 600.000 ovogónias e mais de 7 milhões por volta do quinto mês, sendo estes números bem elucidativos da intensidade da divisão celular. É a partir do quinto mês que as ovogónias começam a entrar na profase da meiose I, contudo a meiose fica parada na fase de diplóteno (Junqueira e Carneiro, 2004). Estas células constituem os **ovócitos primários** (figura 3) que são ainda diplóides e permanecem nesta fase até à adolescência (figura 3) (Fox, 2004). Esta

paragem na fase de diplóteno e o posterior reinício da meiose é regulado pelos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), em que a inibição da maturação ovocitária se encontra associada a níveis elevados de AMPC (Mehlmann, 2005).

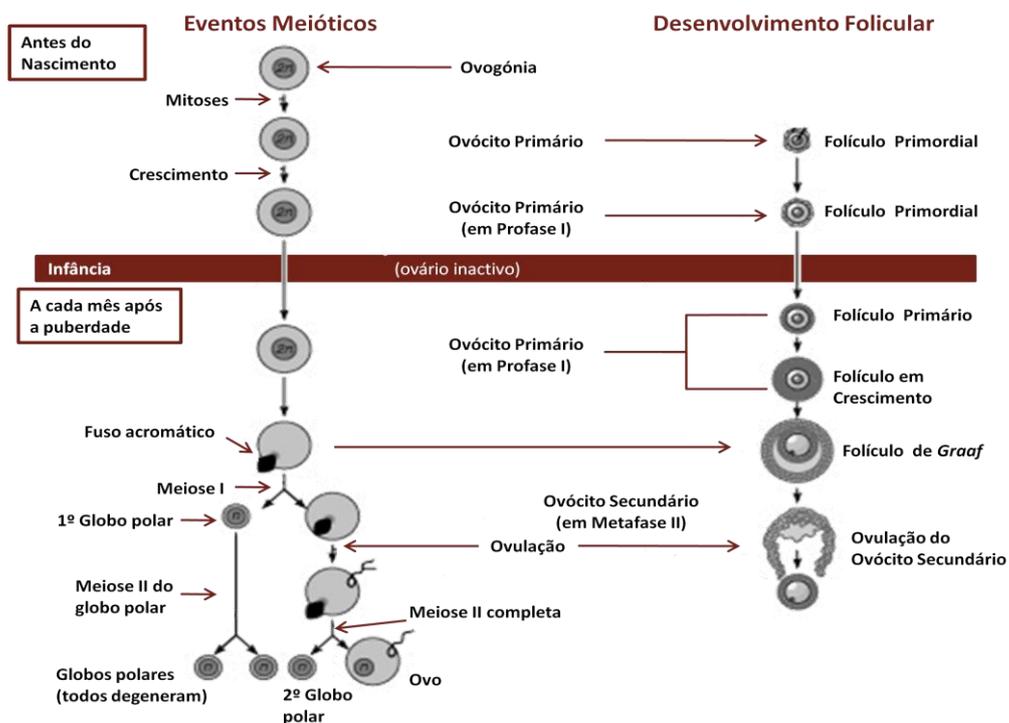


Figura 3 - Ovogénese e Foliculogénese. À esquerda, o esquema das divisões que a ovogónia sofre até chegar à fase de ovócito secundário; à direita, o desenvolvimento folicular que ocorre no ovário (adaptado de Mehlmann, 2005).

É a partir da puberdade que alguns grupos de ovócitos reiniciam periodicamente a meiose, como resposta ao aparecimento pré-ovulatório da LH. É só na altura da formação da cavidade folicular que o ovócito tem a capacidade para prosseguir a meiose, ou seja, adquirir a competência meiótica. Até ao aparecimento da LH, o desenvolvimento do ovócito encontra-se bloqueado (figura 4; Lopes, 2008).

A meiose progride até à metafase II, e aqui permanece novamente bloqueada até à fertilização (figura 4; Mehlmann, 2005). Para completarem a meiose I os ovócitos têm de sofrer maturação ovocitária, que compreende tanto a maturação nuclear (progressão da

cromatina durante a meiose), como a maturação citoplasmática (como a acumulação de ácido ribonucleico (ARN), proteínas, reorganizações no citoesqueleto e alterações no metabolismo celular). A maturação ovocitária é um processo complexo e é o culminar de um longo período de crescimento e desenvolvimento dos ovócitos dentro dos folículos (Lopes, 2008). Apesar da maturação nuclear ser adquirida antes da maturação citoplasmática, ambos os processos têm de estar coordenados para que seja assegurada a competência de desenvolvimento (Nogueira *et al.*, 2006), que não é mais do que a capacidade que o ovócito tem de completar a meiose e suportar o desenvolvimento embrionário pré-implantação após a fertilização, sendo esta competência adquirida gradualmente durante a foliculogénese (Thomas e Vanderhyden, 2006).

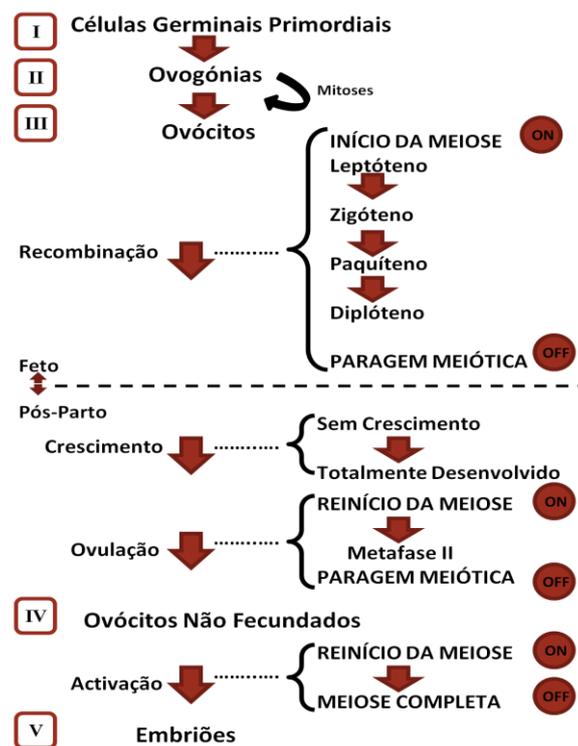


Figura 4- Esquema da sequência e paragens que as Células Germinais Primordiais sofrem até se desenvolverem em Embriões (adaptado de Mehlmann, 2005).

Apesar dos processos de ovogénese e foliculogénese serem bastante regulados, muitos ovócitos primários são perdidos por atresia, durante a vida da mulher (Junqueira e Carneiro, 2004). Este tipo de apoptose resulta de uma interacção complexa entre hormonas e reguladores parácrinos, em que as gonadotropinas e o estrogénio actuam para proteger o folículo da atresia e reguladores parácrinos, tal como androgénios e ligandos do receptor Fas, promovem o processo (Fox, 2004). Os ovários de uma menina recém-nascida contêm cerca de 2 milhões de ovócitos e, na altura da puberdade, já só possuem entre 300000 a 400000, aproximadamente (Fox, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004). Como em cada ciclo menstrual, geralmente, só um ovócito é libertado pelas gónadas femininas e a vida reprodutiva dura de 30 a 40 anos, são libertados por uma mulher somente cerca de 450 ovócitos. Todos os outros degeneram por atresia. Os folículos em qualquer fase de desenvolvimento (primordial, primário, pré-antral ou antral) podem sofrer atresia, que é o processo pelo qual as células foliculares e ovócitos morrem e são eliminados por células fagocíticas (Junqueira e Carneiro, 2004). Caracteristicamente, as mitoses param nas células da granulosa, há separação das células da granulosa da lâmina basal e ocorre a morte do ovócito. Após a morte celular, os macrófagos invadem e fagocitam os restos foliculares. Posteriormente, os fibroblastos ocupam a área do folículo e produzem uma cicatriz de colagénio que pode persistir algum tempo (Junqueira e Carneiro, 2004). A ovogénese cessa com a menopausa (Fox, 2004).

1.2.2. A Foliculogénese

A ovogénese está intimamente relacionada com a foliculogénese, processo pelo qual o folículo ovárico se forma. Este folículo ovárico não é mais do que um ovócito envolvido por uma ou mais camadas concêntricas de células foliculares ou células da granulosa (figura 5; Junqueira e Carneiro, 2004; Gilbert, 2006).

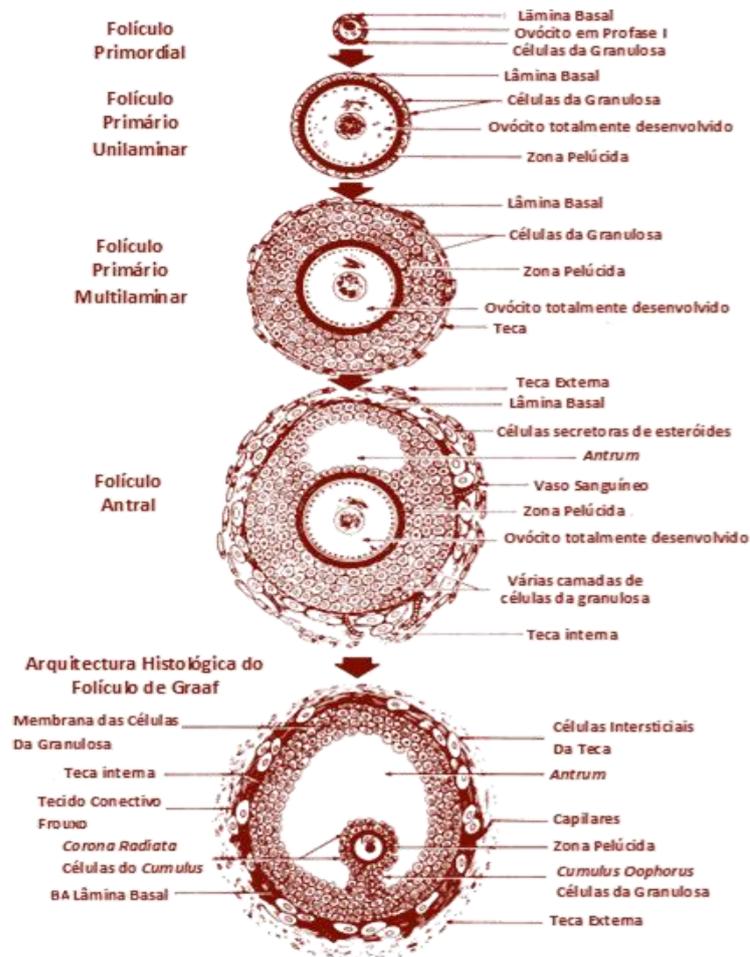


Figura 5 – Esquema das mudanças histológicas sofridas pelo folículo, ao longo da Foliculogênese (adaptado de Erickson, 1995).

A foliculogênese é regulada tanto por mecanismos inter-ovários como por mecanismos endócrinos que coordenam os processos de crescimento do ovócito e proliferação e diferenciação das células somáticas. Interações parácrinas entre o ovócito e as células da granulosa circundantes são essenciais para um normal desenvolvimento celular (Thomas e Vanderhyden, 2006). Os folículos formados durante a vida fetal são chamados **folículos primordiais** e consistem num ovócito primário envolvido por uma única camada de células foliculares achatadas (figura 5). Os ovócitos destes folículos encontram-se na primeira profase da meiose (figura 6; Junqueira e Carneiro, 2004).

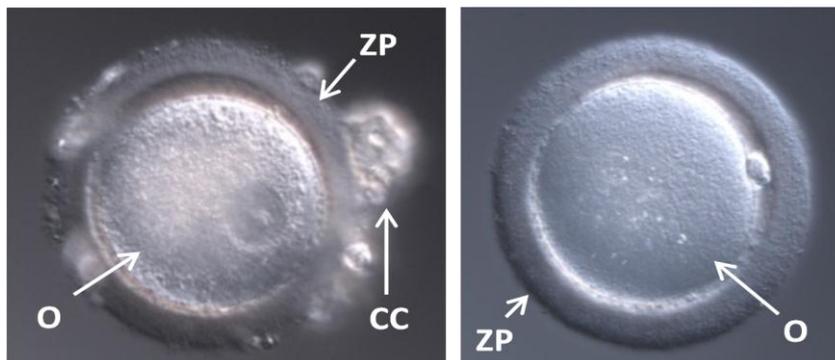


Figura 6 - Ovócitos humanos após punção folicular. À esquerda, ovócito em fase de vesícula germinal (primeira profase da meiose); à direita, ovócito secundário (em metafase II). o (ovócito); cc (células do *cumulus*); zp (zona pelúcida) (fotografias cedidas pelo Serviço de Reprodução Humana dos HUC).

À medida que o folículo se desenvolve o ovócito primário completa a sua primeira divisão meiótica. Os ovócitos primários que não são estimulados a completar a primeira divisão meiótica ficam contidos nos folículos primários e só alguns respondem à estimulação com a FSH e sofrem crescimento folicular (Fox, 2004), que compreende modificações do ovócito, das células foliculares e dos fibroblastos do estroma que envolve cada um desses folículos (Junqueira e Carneiro, 2004). Este crescimento dá-se a cada dia num pequeno grupo de folículos primordiais a partir da puberdade (Nakahara *et al.*, 1997). Na primeira parte desta fase o crescimento do ovócito é tão rápido que a célula pode alcançar um diâmetro máximo de cerca de 120 μm (Junqueira e Carneiro, 2004) e o folículo forma mesmo uma protuberância na superfície do ovário (Fox, 2004). O folículo evolui para **folículo primário unilaminar** (figura 5) e é nesta fase que as células foliculares se dividem por mitose formando uma única camada de células cubóides. As células foliculares continuam a proliferar e originam um epitélio estratificado também chamado camada granulosa, cujas células frequentemente comunicam por junções *gap*. O folículo é então chamado **folículo primário multilaminar** ou **folículo pré-antral** (figura 5). Forma-se a zona pelúcida (figura 5), uma camada espessa amorfa, composta por pelo menos quatro glicoproteínas, que envolve todo o ovócito (Junqueira e Carneiro, 2004).

Existe uma movimentação dos folículos à medida que estes crescem para áreas mais profundas da região do córtex do ovário, devido principalmente ao aumento em tamanho e número das células da granulosa (Junqueira e Carneiro, 2004). Começa também a haver acumulação de líquido, denominado líquido folicular, em vesículas entre as células foliculares. Estas vesículas fundem-se e as células da granulosa reorganizam-se formando uma grande cavidade, o *antrum* folicular, cavidade antral ou antro (figura 5; Fox, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004). O líquido folicular contém componentes do plasma e produtos secretados por células foliculares, tais como glicosaminoglicanos, proteínas (inclusive proteínas que ligam esteróides) e altas concentrações de progesterona, androgénios e estrogénios (Junqueira e Carneiro, 2004; Gilbert, 2006). O *antrum* divide as células da granulosa em duas subpopulações: as células murais, que formam as camadas mais exteriores e permanecem no folículo após ovulação e as que acompanham o ovócito após ovulação, as células do *cumulus* (figura 5; Lopes, 2008). As células do *cumulus* formam um anel à volta do ovócito e originam um espessamento de células que suporta o ovócito e podem também ser denominadas de *cumulus oophorus* (Fox, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004). A camada de células do *cumulus* mais próxima do ovócito constitui a *corona radiata*. A zona pelúcida localiza-se, então, entre o ovócito e a *corona radiata* (figura 5; Fox 2004). Os ovócitos controlam o seu ambiente, através da secreção de factores de sinalização parácrinos lábeis, suprimindo a diferenciação do fenótipo das células murais da granulosa e promovendo a diferenciação do fenótipo das células do *cumulus* (Eppig *et al.*, 1997). Nesta etapa, o folículo é chamado **folículo secundário** ou **folículo antral** (figura 5; Junqueira e Carneiro, 2004) e é nesta altura da formação do *antrum* que o ovócito adquire a competência para completar a meiose (Sorensen e Wassarman, 1976). A formação do *antrum* e o desenvolvimento seguinte necessitam de estimulação com LH e FSH (Halpin *et al.*, 1986; Hillier, 1994), contudo só há produção suficiente destas hormonas para induzir a ovulação depois da puberdade, e todos os folículos

que chegaram à fase antral até esta altura são perdidos por atresia (Hirshfield, 1991; McGee *et al.*, 1998).

À medida que estas modificações ocorrem, o estroma situado imediatamente à volta do folículo modifica-se para formar as tecas foliculares, com duas camadas, a teca interna e a teca externa (figura 5). As células da teca interna sintetizam uma hormona esteróide, a androstenediona, que é transportada para as células da camada granulosa e estas, sob influência da FSH, sintetizam aromatase, uma enzima que transforma a androstenediona em estrogénio. Esta hormona é depois distribuída pelo organismo (Junqueira e Carneiro, 2004).

Normalmente, entre o décimo e o décimo quarto dia após o primeiro dia da menstruação, apenas um folículo continuou o seu crescimento para se tornar um folículo pronto a ovular (Fox, 2004). Este cresceu muito mais do que os outros e tornou-se o folículo dominante, alcançou assim o estadio mais desenvolvido de crescimento e denominou-se **folículo de Graaf, maduro** ou **pré-ovulatório** (figura 5). Os outros folículos, pertencentes ao grupo que estava a crescer com uma certa sincronia, entram em atresia. Como resultado da acumulação de líquido, a cavidade folicular aumenta de tamanho e a camada de células da granulosa da parede do folículo fica mais delgada, visto que, estas células não se multiplicam na mesma proporção que o crescimento do folículo (Junqueira e Carneiro, 2004). Sob estimulação hormonal apropriada, o folículo rompe e expulsa o ovócito para o tubo uterino num processo chamado ovulação. A célula libertada é um ovócito secundário (figura 6), rodeado pela zona pelúcida e pelas células do *cumulus*. O ovócito se não for fertilizado degenera em dois dias, contudo se for fertilizado pelo espermatozóide, completa a segunda divisão meiótica (Fox, 2004). No ovário depois da ovulação, sob influência da LH, o folículo vazio transforma-se em *corpus luteum* ou corpo amarelo que vai segregar estrogénio e progesterona. Se o ovócito não for fecundado, há regressão do *corpus luteum* para se tornar num *corpus albicans* ou corpo branco, não funcional (Fox, 2004).

1.3. As Células do *Cumulus*

As células do *cumulus* possuem uma estreita comunicação com o ovócito (figura 7), através de junções *gap* e de factores parácrinos (Raman *et al.*, 2001). De acordo com a bibliografia, existe um fornecimento bidireccional de nutrientes e sinalização que regulam o crescimento e maturação tanto das células do *cumulus* como do ovócito (Eppig *et al.*, 1997; Moffatt *et al.*, 2002; Van Soom *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003). Embora seja uma comunicação nos dois sentidos, a grande maioria dos estudos nesta área, centra-se na direcção das células do *cumulus* para o ovócito. A interrupção da comunicação entre os dois tipos celulares reduz a proliferação das células do *cumulus* e induz a apoptose em ambos os tipos celulares (Luciano *et al.*, 2010). As células do *cumulus* rodeiam o ovócito durante toda a maturação folicular e durante a ovulação (Lee *et al.*, 2001), contudo, estas células são progressivamente eliminadas após a ovulação e sofrem apoptose ou morte celular programada (Kerr *et al.*, 1972; Raman *et al.*, 2001).

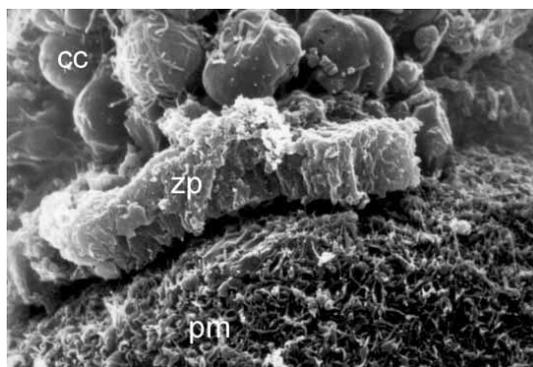


Figura 7- Fotografia de Microscopia electrónica de varrimento de superfície de um ovócito humano em MII não fertilizado. zp (zona pelúcida); cc (células do *cumulus*); pm (membrana plasmática) do ovócito (Elder e Dale, 2003).

1.3.1. **Comunicação entre o Ovócito e as Células do *Cumulus***

Durante todo o processo de crescimento e desenvolvimento do ovócito é evidente a existência de uma estreita associação entre este e as células do *cumulus* circundantes, sendo esta feita através de junções *gap* (Gershon *et al.*, 2008). Este tipo de junções aparece cedo na

foliculogênese, antes da deposição da zona pelúcida e da formação da cavidade antral (Albertini e Anderson, 1974). De facto, as junções *gap* no folículo são essenciais para a coordenação dos processos de ovogénese e foliculogénese (Thomas e Vanderhyden, 2006) e, conseqüentemente, para o desenvolvimento do ovócito e fertilidade (Sutton *et al.*, 2003). As células do *cumulus* têm umas estruturas específicas denominadas prolongamentos citoplasmáticos transzonais, que penetram através da zona pelúcida atingindo o oolema (citoplasma do ovócito; figura 8; Sutton *et al.*, 2003; Corn *et al.*, 2005). Estes prolongamentos foram bem caracterizados por microscopia electrónica em vários mamíferos, incluindo em humanos (Motta *et al.*, 1999; Albertini *et al.*, 2001).

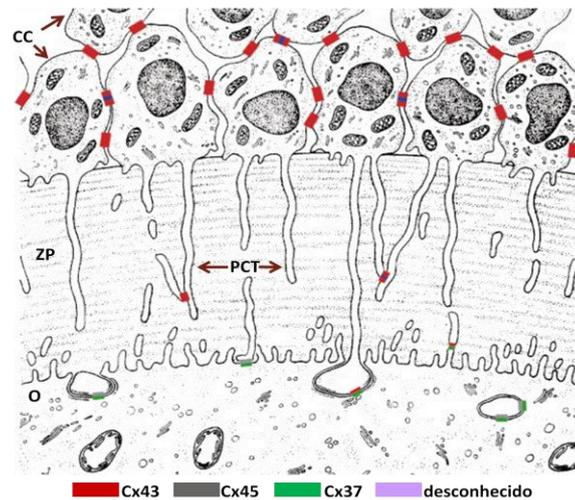


Figura 8- Comunicação entre as células do *cumulus* e entre as células do *cumulus* e o ovócito através de junções *gap* constituídas por conexina (Cx): Cx43, Cx45, Cx37, em rato. CC (células do cumulus); ZP (zona pelúcida); PCT (prolongamentos citoplasmáticos transzonais); O (ovócito) (adaptado de Kidder e Mhawi, 2002).

As junções *gap* estão presentes nesta região de contacto para facilitar a transferência de moléculas de baixo peso molecular (< 1 kDa) como sódio, cloreto, iões de cálcio (Ca^{2+}), mensageiros secundários (como o cAMP) e pequenos metabolitos como adenosina trifosfato (ATP; (Kidder e Mhawi, 2002; Sasseville *et al.*, 2009) entre as células do *cumulus* e a célula germinal, assim como entre as próprias células do *cumulus* (Eppig *et al.*, 1997; Sutton *et al.*,

2003). Como foi referido, esta comunicação que existe entre a célula germinal e as células somáticas é bidireccional. Estes canais intercelulares são compostos por uma família de proteínas membranares integrantes, as conexinas (Cx; Goodenough *et al.*, 1996) que se organizam em conexões, canais intercelulares e placas de junções *gap* (figura 9; Kidder e Mhawi, 2002).

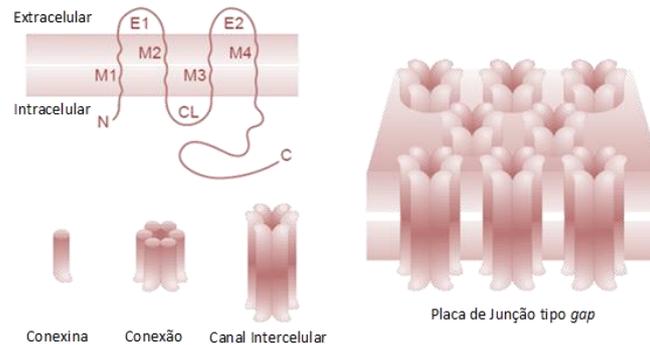


Figura 9 - Organização estrutural das placas de junções *gap* (adaptado de Kidder e Mhawi, 2002).

As células da granulosa adjacentes contêm junções *gap* homólogas, enquanto, as junções *gap* heterólogas são encontradas entre o ovócito e as células murais da granulosa (Albertini e Anderson, 1974; Anderson e Albertini, 1976; Valdimarsson *et al.*, 1993).

Maioritariamente, as junções *gap* são constituídas por Cx43, embora dependendo da espécie, possam também ser expressas, no complexo *cumulus*-ovócito, outras conexinas, tais como Cx26, Cx30.3, Cx32, Cx37, Cx40, Cx45 e Cx57 (figura 8; Kidder e Mhawi, 2002). A comunicação entre células da granulosa é levada a cabo pela Cx43, enquanto a comunicação ovócito-células somáticas é da responsabilidade da Cx37 (Sasseville *et al.*, 2009). As junções *gap* entre o ovócito e as células do *cumulus* suportam uma cooperação metabólica ao transferirem substratos metabólicos e previnem a progressão da meiose no ovócito, ao transferirem sinais inibitórios da meiose (Gilula *et al.*, 1978; Dekel *et al.*, 1981; Bornslaeger e Schultz, 1985). Esta comunicação intercelular e a própria expressão de Cx43 são afectados por

factores como mensageiros secundários, FSH, LH, estradiol e pelo estado de desenvolvimento folicular (Pant *et al.*, 2005).

Durante o desenvolvimento folicular, os prolongamentos citoplasmáticos transzonais sofrem alterações dinâmicas na sua forma e número, sendo mais numerosos na fase pré-antral. Durante o pico do crescimento do ovócito, os prolongamentos citoplasmáticos transzonais prolongam-se como profundas invaginações (Motta *et al.*, 1999).

Ainda não há um completo conhecimento da natureza e diversidade dos compostos transferidos entre as células do *cumulus* e o ovócito através das junções *gap*, nem há estudos conclusivos se mudanças dinâmicas neste tipo de comunicação têm impacto na aquisição da competência do desenvolvimento (Albertini *et al.* 2001; Thomas *et al.* 2004). Contudo, devido a esta íntima associação entre o ovócito e as células do *cumulus*, é possível que o estado das células do *cumulus* influencie o desenvolvimento do ovócito e que o estado das células do *cumulus* também possa ser influenciado pelo ovócito (Perez e Tilly, 1997).

1.3.2. Funções das Células do *Cumulus*

As células do *cumulus* desempenham papéis importantes antes, durante e após a ovulação (Tanghe *et al.*, 2002). A **maturação do ovócito**, que ocorre antes da ovulação é apoiada pelas células do *cumulus* (Wassarman, 1988), que também auxiliam na **condução do ovócito** no interior do oviducto durante a ovulação (Mahi-Brown e Yanagimachi, 1983) e logo após a ovulação participam nos **mecanismos que controlam o acesso do espermatozóide ao ovócito** (Tesarik, 1990).

1.3.2.1. Antes da Ovulação: Maturação do Ovócito

A maturação do ovócito corresponde à altura em que o ovócito completa a primeira divisão meiótica e sofre mudanças citoplasmáticas, progredindo para a MII (Mehlmann, 2005). É o culminar de um período prolongado de crescimento e desenvolvimento, em que o ovócito

atinge a competência de desenvolvimento, ou seja, a capacidade de sustentar o desenvolvimento precoce do embrião (Sutton *et al.*, 2003). As células do *cumulus* têm um papel importante na **maturação do ovócito** pois mantêm-no em paragem meiótica, participam na indução do reinício da meiose e suportam a sua maturação citoplasmática (Tanghe *et al.*, 2002).

Para o crescimento do ovócito e manutenção da paragem meiótica é importante a transferência directa de substâncias entre as células do *cumulus* e o ovócito. Purinas (como a hipoxantina e a adenosina) e cAMP foram identificadas como substâncias que actuam como inibidores meióticos e são transferidos das células do *cumulus* para o ovócito (Tanghe *et al.*, 2002).

A indução da maturação ovocitária é mediada por componentes somáticos do folículo (Buccione *et al.*, 1990; Mattioli, 1994), mais precisamente, pelas células murais da granulosa, uma vez que o ovócito e as células do *cumulus* não possuem receptores de LH (Tanghe *et al.*, 2002). O reinício da meiose é estimulado por gonadotropinas dentro do folículo e há três hipóteses de como este mecanismo funciona: (i) diminuindo o nível intrafolicular de um inibidor da maturação do ovócito (Downs e Eppig, 1986); (ii) extraíndo um sinal indutor da maturação das células da granulosa que substitui o meio inibitório do folículo ou (iii) bloqueando ou alterando as junções *gap* entre as células do *cumulus* e o ovócito (Tanghe *et al.*, 2002). Na altura do reinício da meiose, os prolongamentos citoplasmáticos transzonais começam a afastar-se do ovócito e há quase perda total de comunicação por junções *gap* (Sutton *et al.*, 2003).

A maturação citoplasmática do ovócito é muito importante pois permite ao ovócito adquirir capacidade para estimular a formação do pronúcleo masculino, garantir a fertilização monoespérmica e apoiar o antecipado desenvolvimento embrionário (Staigmiller e Moor, 1984; Vanderhyden e Armstrong, 1989). As células do *cumulus* actuam secretando factores solúveis que induzem a competência de desenvolvimento ou removendo do meio do ovócito

um componente supressor do desenvolvimento embrionário e, por isso, é evidente que as células do *cumulus* têm um papel protector e metabólico na maturação citoplasmática do ovócito (Tanghe *et al.*, 2002).

Os compartimentos celulares do complexo *cumulus*-ovócito têm grandes diferenças no que toca a actividades e necessidades metabólicas, nomeadamente em relação à obtenção de ATP (Thompson *et al.*, 2007). O ovócito totalmente desenvolvido no folículo antral é totalmente dependente da fosforilação oxidativa para a produção de ATP e não é capaz de oxidar glucose (Biggers *et al.*, 1967). As células do *cumulus* têm uma grande capacidade de absorver e utilizar glucose, via glicólise (Gardner *et al.*, 1996; Sutton *et al.*, 2003), fornecendo ácidos carboxílicos como substratos para a fosforilação oxidativa ao ovócito (figura 10). Enquanto, os ovócitos maduros expressam apenas uma isoforma do transportador de glucose (GLUT-1), as células do *cumulus* expressam quatro isoformas (Sutton *et al.*, 2003).

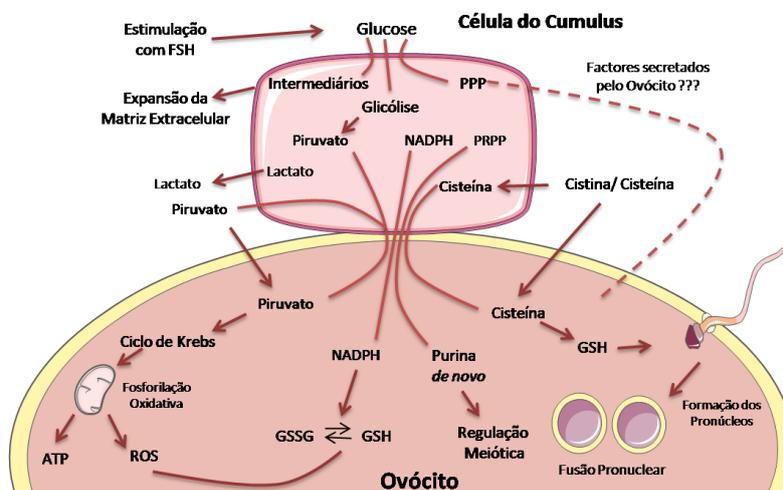


Figura 10- Modelo das interações metabólicas e actividade entre as células do *cumulus* e o ovócito. A glucose pode ser utilizada de três formas diferentes: a) Oxidação (combinação da Glicólise, Ciclo de Krebs e Fosforilação Oxidativa); b) Via das Pentoses-Fosfato (PPP); c) convertida a intermediários e utilizada para a expansão da matriz extracelular. GSH (glutationa); GSSG (GSH oxidada); ROS (espécies reactivas de oxigénio); NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reduzida); PRPP (fosforibosilpirofosfato) (adaptado de Sutton *et al.* 2003).

No que respeita ao metabolismo e a factores de crescimento e diferenciação, normalmente, a investigação foca-se apenas na direcção das células do *cumulus* para o ovócito, isto é, no suporte das células da granulosa ao ovócito em desenvolvimento (Sutton *et al.*, 2003). Contudo, outros estudos demonstraram a importância da bidireccionalidade desta comunicação (Albertini *et al.*, 2001). É agora claro que os sinais parácrinos do ovócito são reguladores essenciais das células da granulosa e da função ovárica (Eppig, 2001). O factor de diferenciação de crescimento-9 (GDF-9) e o GDF-9B, também chamada proteína morfogenética do osso 15 (BMP-15) são duas moléculas chave do ovócito identificadas até agora (figura 11; Sutton *et al.*, 2003; Thomas e Vanderhyden, 2006). Estes factores de crescimento do ovócito são essenciais para vários estádios precoces da foliculogénese (Dong *et al.*, 1996; Galloway *et al.*, 2000) e depois, no desenvolvimento folicular mais avançado, têm também um papel importante na diferenciação das diferentes linhagens das células da granulosa (Eppig *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000) e na regulação de funções importantes das células da granulosa. Por exemplo, Hussein *et al.* (2005) demonstraram que os factores secretados pelo ovócito, nomeadamente BMP15 e BMP6, mantêm uma baixa incidência de apoptose nas células do *cumulus*.

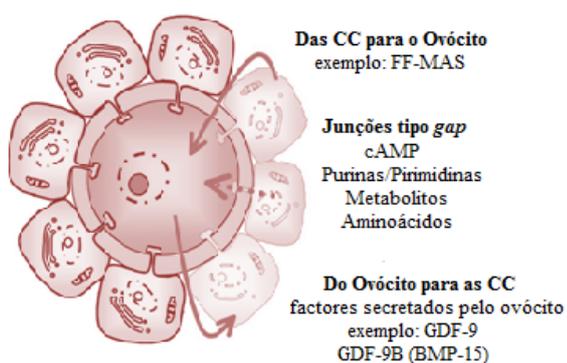


Figura 11- Representação esquemática da comunicação parácrina (setas completas) e da comunicação por junções *gap* (seta pontilhada) entre as células do *cumulus* (CC) e o ovócito. FF-MAS (esterol do líquido folicular activador da meiose) (adaptado de Sutton *et al.* 2003).

1.3.2.2. Durante a Ovulação: Condução do Ovócito no Oviducto

A ovulação é o resultado de uma cascata de eventos iniciada com um aumento da concentração das gonadotropinas LH e FSH. Em resposta a esta estimulação ocorrem mudanças na expressão de genes e na estrutura folicular com consequências para as células da teca, murais, do *cumulus* e nos compartimentos do ovócito (Russell e Robker, 2007). Na ovulação, o complexo *cumulus*-ovócito é expelido para a cavidade peritoneal perto do *infundibulum* do oviducto. Graças às contribuições bioquímicas das células do *cumulus* é criado um microambiente fluido (maioritariamente constituído por ácido hialurónico) que favorece a fertilização. O *cumulus oophorus* participa na ovulação ao facilitar a extrusão do ovócito, assim como, também facilita a sua captura pelas células epiteliais ciliadas do *infundibulum* e o seu transporte para o local de fertilização (Tanghe *et al.*, 2002).

1.3.2.3. Após a Ovulação: Mecanismos de acesso do espermatozóide ao ovócito

Em relação à última etapa, as células do *cumulus* estão envolvidas nos mecanismos que controlam o acesso do espermatozóide ao ovócito (Tanghe *et al.*, 2002). A expansão da matriz do *cumulus* desempenha um papel essencial no normal desenvolvimento do ovócito, da ovulação e da fertilização, bem como no desenvolvimento embrionário e implantação (Lee *et al.*, 2010). Para o espermatozóide fertilizar o ovócito, precisa de encontrar uma passagem através da matriz extracelular das células do *cumulus* e para o conseguir tem de romper a estrutura molecular da matriz (Tanghe *et al.*, 2002). Na fertilização, as células do *cumulus* podem exercer três funções principais: (1) facilitar a capacitação do espermatozóide, promover a reacção acrossómica e a penetração através da criação de um microambiente favorável; (2) umentar o número de espermatozoides com capacidade de fertilização à volta do ovócito; ou (3) prevenir mudanças no ovócito que são desfavoráveis para a fertilização (Tanghe *et al.*, 2002).

Papel na Capacitação, Reacção Acrossómica e Penetração dos Espermatozóides

O microambiente criado pelas células do *cumulus* consiste em certos factores que são secretados ou por factores físico-químicos que são modulados por estas células (como a pressão de oxigénio ou o pH; Van Soom *et al.*, 2002; Tanghe *et al.*, 2002). Estudos em *hamsters* demonstraram que tanto as células do *cumulus* como os componentes da matriz destas células estão envolvidos na capacitação e reacção acrossómica do espermatozóide (Van Soom *et al.*, 2002). A penetração do espermatozóide requer a sua capacitação (uma série de eventos moleculares que confere ao espermatozóide a capacidade de fertilizar o ovócito), a ligação à zona pelúcida, a reacção acrossómica (reacção de fusão da membrana do acrossoma com a membrana plasmática do espermatozóide, o que leva à libertação de enzimas hidrolíticas que vão hidrolisar componentes das células do *cumulus* e da zona pelúcida e, conseqüentemente, vão auxiliar o espermatozóide a penetrar o ovócito), a penetração na zona pelúcida, a ligação e a fusão com o oolema e a descondensação da cabeça do espermatozóide para formar o pronúcleo masculino (Tanghe *et al.*, 2002).

Para além de proteínas, as células do *cumulus* produzem também progesterona (Tanghe *et al.*, 2002), ácido hialurónico (Ball *et al.*, 1983), sulfato de heparano e sulfato de condroitina, substâncias que por isso compõem a matriz expandida do *cumulus* (Tanghe *et al.*, 2002). Bronson *et al.* (1999) sugeriram que a progesterona é um possível indutor da reacção acrossómica em humanos. Esta hormona ao ligar-se a locais específicos da membrana plasmática do espermatozóide, induz um aumento acentuado no Ca^{2+} citossólico, o que leva à fusão das membranas (Tanghe *et al.*, 2002). Contudo, o ácido hialurónico é o componente principal da matriz do *cumulus* (Ball *et al.*, 1983; Russell e Robker, 2007), que pode ser facilmente penetrada pelo espermatozóide. Esta penetração pode dar-se devido a dois mecanismos hipotéticos: por um lado, proteínas específicas que estão distribuídas na região do acrossoma durante a capacitação poderão ter actividade de hialuronidase (Meyers e Rosenberger, 1999); por outro, o ácido hialurónico poderá ligar-se a uma proteína da

membrana plasmática do espermatozóide, PH-20, resultando num aumento dos níveis de Ca^{2+} no espermatozóide. E deste modo, o ácido hialurónico pode ser uma molécula candidata para aumentar a capacitação dos espermatozóides (Tanghe *et al.*, 2002).

A regulação da expansão do *cumulus* pode ser feita *in vitro* por acções parácrinas do ovócito, utilizando factores de crescimento como o factor de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$; Salustri *et al.*, 1990; Vanderhyden *et al.*, 2003), o GDF9 (Elvin *et al.*, 1999), o BMP15 (Yoshino *et al.*, 2006) e activinas (Dragovic *et al.*, 2007). Uma matriz do *cumulus* danificada pode alterar o transporte do ovócito no oviducto (Russell e Robker, 2007). A síntese da matriz extracelular do *cumulus* e a sua expressão de genes têm sido relacionadas com a determinação da qualidade e capacidade de desenvolvimento do ovócito (Russell e Robker, 2007).

Papel na Retenção de espermatozóides à volta do ovócito

O *cumulus* é capaz de “aumentar” o número de espermatozóides capazes de fertilizar à volta do ovócito, na medida em que as células do *cumulus* mais próximas do ovócito secretam substâncias atractivas para os espermatozóides, criando um gradiente atractivo dentro do *cumulus oophorus* (Eisenbach, 1999). Embora este seja um tema polémico, evidências dos efeitos quimiotáticos do *cumulus oophorus* foram observadas num estudo em que os produtos de ovulação (ovócitos, *cumulus oophorus* e líquido folicular) estimularam o transporte de espermatozóides no oviducto de hamsters (Ito *et al.*, 1991). A orientação radial das células do *cumulus* pode também guiar o espermatozóide para o ovócito (Bedford, 1999). Foi ainda observado o aprisionamento de espermatozóides pelas células do *cumulus*, em que as células masculinas ficaram presas na matriz de ácido hialurónico entre as células do *cumulus* (Van Soom *et al.*, 2002; Tanghe *et al.*, 2002). As células do *cumulus* podem também fazer uma selecção morfológica dos espermatozóides, retendo os não capacitados e cujo acrossoma sofreu reacção (Carrell *et al.*, 1993) e “conduzindo” os hiperactivados para a superfície do ovócito (Tanghe *et al.*, 2002). Os espermatozóides hiperactivados têm uma vantagem

mecânica sobre os outros no oviducto, visto que penetram a matriz viscosa do *cumulus* mais facilmente que os espermatozóides não hiperactivados (Suarez, 1988).

Papel na Prevenção de mudanças desfavoráveis no Ovócito

O endurecimento precoce da zona pelúcida é uma mudança que o ovócito pode sofrer e é desfavorável para a normal fertilização (Van Soom *et al.*, 2002; Tanghe *et al.*, 2002). Esta alteração é causada por uma excitose precoce dos grânulos corticais (Dell'Aquila *et al.*, 1999) e ocorre durante a maturação do ovócito tanto *in vivo* como *in vitro* (Ducibella *et al.*, 1990). Este endurecimento da zona pelúcida tem como consequências uma resistência elevada à digestão proteolítica e à penetração do espermatozóide (Tanghe *et al.*, 2002). Como estudado em suínos por Galeati *et al.* (1991), a remoção mecânica das células do *cumulus* leva a uma reacção cortical prematura, o que apoia a teoria de que as células do *cumulus* participam na prevenção do endurecimento espontâneo da zona pelúcida. Fatehi *et al.* (2005) descreveram também outra mudança no ovócito que é evitada pela presença das células do *cumulus*, o aumento do stress oxidativo (Russell e Robker, 2007). Durante a ovulação podem ocorrer eventos de hiperemia (aumento da quantidade de sangue circulante) e inflamação do tecido, que aumentam os radicais livres de oxigénio (Russell e Robker, 2007). No entanto, a matriz extracelular do *cumulus* possui o componente versican pericelular, que é um potente inibidor de danos oxidativos na célula (Wu *et al.*, 2005) e que protege o ovócito destes possíveis danos (Russell e Robker, 2007).

1.4. Características das Células do *Cumulus* e a sua Relação com o Ovócito

1.4.1. Receptores de Progesterona

Todo o sistema reprodutor feminino e, mais especificamente, o processo de ovulação é dependente de uma importante hormona esteróide, a progesterona (Krietsch *et al.*, 2006) sendo o útero humano o maior alvo da sua acção (Fernandes *et al.*, 2005). A progesterona é essencial para o comportamento sexual normal, secreção de gonadotropinas, ovulação, receptividade do útero, invasão do trofoblasto e formação da placenta, assim como, para a manutenção da gravidez e para o parto (Fernandes *et al.*, 2005). No entanto, os seus mecanismos de acção fundamentais não são muito claros (Jacobsen e Horwitz, 2011).

Com base na literatura, a progesterona terá duas formas de acção, podendo ligar-se a receptores genómicos (nPR-A/B) ou a receptores não genómicos (mPR α/β , PGRMC1/2) presentes nas células (Zhu *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2005; Krietsch *et al.*, 2006; Cahill, 2007; Luciano *et al.*, 2010; Jacobsen e Horwitz, 2011; Luciano *et al.*, 2011; Aparicio *et al.*, 2011). Os receptores genómicos actuam na regulação dos processos transcriptómicos, envolvendo a translocação do receptor para o núcleo e a ligação a elementos de resposta específicos, levando assim à regulação da expressão do gene alvo. Já os receptores não genómicos são independentes da transcrição de genes ou da síntese de proteínas e envolvem a modulação de proteínas citoplasmáticas ou de proteínas reguladoras ligadas à membrana celular (Simoncini *et al.*, 2004).

Os receptores genómicos não são mais que factores de transcrição que consistem num domínio que liga ácido desoxirribonucleico (ADN) que se localiza no meio de uma região N-terminal e de uma região C-terminal. nPR-A e nPR-B são as duas isoformas deste tipo de receptores, sendo que a nPR-B possui uma região N-terminal mais longa (Jacobsen e Horwitz,

2011). A expressão destes dois receptores faz-se a partir do mesmo gene mas possuem dois promotores alternativos e o início da tradução dá-se em dois codões de iniciação AUG diferentes (Mulac-Jericevic e Conneely, 2004). Curiosamente, no trabalho em bovinos de Aparicio *et al.* (2011), as células do *cumulus* que circundam ovócitos em MII não apresentam estes receptores no núcleo mas sim no citoplasma e nos prolongamentos citoplasmáticos transzonais. A progesterona que é produzida pelas células do *cumulus*, e potencialmente estimulada pela FSH e LH, pode regular a expressão dos seus próprios receptores genómicos (Aparicio *et al.*, 2011). De facto, as mudanças dinâmicas observadas na expressão de proteínas dos receptores de progesterona depois dos complexos *cumulus*-ovócito serem submetidos a maturação *in vitro* ou em resposta à suplementação com LH, FSH ou progesterona sugerem um papel importante da progesterona durante a maturação de ovócitos (Aparicio *et al.*, 2011).

Os receptores de progesterona membranares (mPR), apenas descritos em humanos em 2003 (Zhu *et al.*, 2003), têm diferentes localizações nos tecidos e apresentam três subtipos. A forma mPR α predomina nos tecidos reprodutivos, a mPR β em tecidos neuronais e a mPR γ no rim, rim fetal, cólon, carcinoma pulmonar, entre outros (Zhu *et al.*, 2003). Cada isoforma codifica uma proteína transmembranar com grande afinidade e capacidade limitada de ligação à progesterona. Estes receptores são membros da família de receptores de adiponectina Q e da progesterona e quando se ligam a esta hormona, activam rapidamente proteínas G e as suas cascatas de sinalização (Dressing *et al.*, 2011). Há já várias evidências que os mPR são expressos e regulados hormonalmente no folículo ovárico e no *corpus luteum*. De facto, um estudo em suínos indica um aumento de expressão do gene que codifica mPR β nas células do *cumulus* à medida que o folículo ovárico matura, havendo um pico de expressão perto da dissolução da vesícula germinal. Este estudo é também o primeiro que descreve a localização do receptor na membrana plasmática nos complexos *cumulus*-ovócito e refere que a molécula deverá estar associada à expansão da matriz do *cumulus* (Qiu *et al.*, 2008). Aparicio *et al.*

(2011) localizaram o mPR β heterogeneamente no citoplasma das células do *cumulus* e também na área perinuclear em algumas células do *cumulus*, em bovinos.

Finalmente, a progesterona pode ainda mediar a sua acção não genómica através dos componentes 1 e 2 do receptor de progesterona membranar (PGRMC1 e PGRMC2) (Cahill, 2007; Aparicio *et al.*, 2011). O PGRMC1 foi primeiramente purificado em fígado de rato (Cahill, 2007) e é o componente mais estudado, tendo já sido descrito em diferentes tipos celulares do ovário como na superfície do epitélio germinal, nas células da granulosa, nas células da teca, na vesícula germinal dos ovócitos e no *corpus luteum* (Luciano *et al.*, 2011). Este receptor pode estar envolvido em diferentes processos celulares e ter várias localizações subcelulares (Cahill, 2007; Luciano *et al.*, 2010). Luciano *et al.* (2010) defendem no seu trabalho em bovino que esta proteína se localiza tanto no núcleo como no citoplasma das células do *cumulus* e que as células do *cumulus* mais próximas do ovócito aparentam ter maior expressão do receptor. Já Aparicio *et al.* (2011) descreve a presença do receptor na região perinuclear das células do *cumulus* que circundam ovócitos em fase de vesícula germinal e em MII. Alguns trabalhos sugerem que a progesterona através do PGRMC1 activa cascatas de sinalização que previnem a apoptose (Peluso *et al.*, 2008, 2009).

No entanto, a expressão e localização dos receptores de progesterona em células do *cumulus* humanas ainda não é muito clara.

1.4.2. Junções *gap* e Conexinas

A comunicação directa entre compartimentos citoplasmáticos de células vizinhas é possível graças à existência das junções *gap*, que estão presentes em vários tipos de tecidos e medeiam processos fisiológicos essenciais (Gershon *et al.*, 2008).

Estudos sobre esta comunicação estabelecida entre o ovário e as células da granulosa surgiram em 1974 em mamíferos, e focavam-se principalmente na estrutura e morfologia, sendo os trabalhos basicamente compostos por fotografias de microscopia electrónica de

varrimento (Albertini e Anderson, 1974; Anderson e Albertini, 1976; Gilula *et al.*, 1978). À medida que se começaram a descobrir as proteínas que constituíam as junções *gap*, os estudos começaram a ganhar outro rumo. Assim, surge um estudo em 2001 (Ackert *et al.*, 2001) em que foi feito um *knockout* da Cx43 num ratinho, determinando-se que esta alteração genética era letal, devido ao desenvolvimento de problemas cardíacos no animal. Os ovários deste ratinho *knockout* foram transferidos através de enxertos para um ratinho imunocomprometido. O resultado na ausência da Cx43 no ovário foi a paragem da foliculogénese antes dos folículos se tornarem multilaminares e, de facto, os ovócitos daí resultantes apresentavam grandes anomalias morfológicas, sendo incapazes de maturar. Este trabalho veio comprovar a importância desta conexina na correcta formação do folículo ovárico. Outro estudo em 2005, procurou uma relação entre os efeitos da FSH e LH na expressão de Cx43 nos complexo *cumulus*-ovócito e concluiu que o estado de maturação do ovócito, assim como a duração do tratamento com as hormonas afecta a expressão da Cx43 (Pant *et al.*, 2005).

1.4.3. Apoptose

A apoptose ou morte celular programada é um tipo de resposta celular a diferentes estímulos exógenos e endógenos e consiste, basicamente, num processo de auto-eliminação controlado que protege o organismo de danos causados por uma morte celular indiscriminada (Grivicich *et al.*, 2007).

A activação da apoptose pode ser feita de duas maneiras distintas: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A primeira é desencadeada pela ligação de ligandos específicos a um grupo de receptores da membrana da superfamília dos receptores de factores de necrose tumoral (rTNF). A segunda é activada por stress intracelular ou extracelular como por exemplo, a privação de factores de crescimento, danos no ADN, hipóxia, activação de oncogenes, exposição a luz ultra-violeta ou a agentes de quimioterapia

(Grivicich *et al.*, 2007). Tanto na via extrínseca como na via intrínseca são activadas umas proteases essenciais à apoptose, as caspases.

Este tipo de morte programada é um fenómeno bastante rápido: primeiramente há uma contracção da célula que leva à perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas (Lavin e Watters, 1993; Grivicich *et al.*, 2007). Na globalidade a morfologia dos organelos celulares é mantida, com excepção, em alguns casos, de eventuais rupturas que a membrana externa das mitocôndrias pode sofrer. Seguidamente ocorre condensação da cromatina havendo uma concentração desta junto à membrana nuclear. Há também formação de prolongamentos a partir da membrana celular e o núcleo desintegra-se em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Estes prolongamentos aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas chamadas corpos apoptóticos. Estes são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório. Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossómica do ADN, em que uma endonuclease é activada e produz estes fragmentos de ADN de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base (Sambade, 2005; Grivicich *et al.*, 2007).

A apoptose pode ocorrer, no desenvolvimento folicular, em pelo menos quatro compartimentos celulares diferentes: nas células da teca, nas células murais da granulosa, nas células do *cumulus* e no próprio ovócito (Mikkelsen *et al.*, 2001). A apoptose nas células murais da granulosa e nas células do *cumulus* está associada com a atresia folicular durante os ciclos ovários naturais (Yuan e Giudice, 1997) e estimulados (Høst *et al.*, 2000). Este processo celular é um dos parâmetros mais avaliados nas células do *cumulus* de ratinho, cabra, bovino e humanos (Lee *et al.*, 2001; Mikkelsen *et al.*, 2001; Raman *et al.*, 2001; Høst *et al.*, 2002; Moffatt *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Corn *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Abu-Hassan *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006).

Em humanos, os autores tentam relacionar este parâmetro com a idade da mulher, com a qualidade, maturação e competência de desenvolvimento do ovócito envolvido pelas células

do *cumulus*, assim como com a taxa de fertilização e qualidade do embrião a que o ovócito deu origem. Os primeiros estudos sugeriram que ovócitos não fertilizados apresentavam células do *cumulus* com maior taxa de apoptose do que células do *cumulus* que circundavam ovócitos que fertilizaram. Estabeleceu-se ainda uma correlação negativa entre a incidência de apoptose nas células do *cumulus* e a qualidade do embrião (Lee *et al.*, 2001). Em termos do estado de maturação do ovócito foi observada uma percentagem relativamente maior de apoptose nas células do *cumulus* de ovócitos imaturos quando comparadas com células do *cumulus* de ovócitos em MII. Por outro lado, ovócitos em MII com percentagens mais elevadas de apoptose nas células do *cumulus* circundantes tinham taxas de fertilização mais baixas (Høst *et al.*, 2000). Visto que a apoptose nas células do *cumulus* tem influência na maturação ovocitária (Høst *et al.*, 2000; Corn *et al.*, 2005), observou-se que gâmetas e embriões obtidos de complexos *cumulus*-ovócito com baixa incidência de apoptose nas células do *cumulus* têm maior probabilidade de dar origem a embriões com melhor qualidade (Corn *et al.*, 2005). Outros estudos focados na apoptose relatam que células do *cumulus* provenientes de ovários com um folículo dominante apresentam menores taxas de apoptose em comparação com células do *cumulus* de ovários sem folículo dominante (Mikkelsen *et al.*, 2001), que células do *cumulus* expostas a espermatozóides aumentam os seus marcadores apoptóticos em comparação com células do *cumulus* não expostas aos gâmetas masculinos (Moffatt *et al.*, 2002) e, por último, que existe uma relação entre a maior incidência de apoptose nas células do *cumulus* e a idade da mulher (Lee *et al.*, 2001; Moffatt *et al.*, 2002).

Apesar destes resultados já publicados, outros trabalhos não conseguiram observar, por exemplo, a relação da morte celular programada nas células do *cumulus* com o estado de maturação do ovócito (Mikkelsen *et al.*, 2001; Høst *et al.*, 2002), assim como com a fertilização e a qualidade embrionária (Abu-Hassan *et al.*, 2006). Deste modo, o estabelecimento de uma relação entre a apoptose nas células do *cumulus* e a qualidade do ovócito, a fertilização e mesmo o estabelecimento de gravidez continua em aberto.

1.4.4. Genómica e Proteómica

Outros estudos, com início em 2004 (McKenzie *et al.*, 2004) e que recorreram a técnicas de *Microarrays*, Reacção em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR) e RT-PCR quantitativo, centram-se mais na genómica e transcriptómica das células do *cumulus* e da sua relação com a competência de desenvolvimento do ovócito, com o desenvolvimento do blastocisto, com as taxas de fertilização e de gravidez (McKenzie *et al.*, 2004; Feuerstein *et al.*, 2007; Cillo *et al.*, 2007; Assou *et al.*, 2008; Hamel *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2009; Assidi *et al.*, 2011; Ouandaogo *et al.*, 2011; Regassa *et al.*, 2011).

Esta procura de novos biomarcadores envolve genes como sintetase de ácido hialurónico 2 (HAS2), ciclooxigenase 2 (COX2; PTGS2), gremlin (GREM1), proteína reguladora da esteroidogénese aguda (STAR), anfiregulina (AREG), *desaturase de estearoil-coenzime A 1 e 5* (SCD1 e SCD5), Cx43, a pentraxina-3 (PTX3), *B-cell lymphoma 2-like protein 11* (BCL2L11), fosfoenolpiruvato carboxicinasase 1 (PCK1), *nuclear factor 1 B-type* (NFIB), factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), entre outros (McKenzie *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2009; Feuerstein *et al.*, 2007; Cillo *et al.*, 2007; Assou *et al.*, 2008).

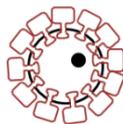
De facto, observou-se que a elevada expressão nas células do *cumulus* de PCK1, BCL2L11 e NFIB pode prever o desenvolvimento do ovócito em embrião e prever a ocorrência de gravidez (Assou *et al.*, 2008). A baixa expressão de STAR, AREG, Cx43, PTGS2, SCD1 e SCD5 está relacionada negativamente com a competência do ovócito (Feuerstein *et al.*, 2007). Por outro lado, esta competência do desenvolvimento pode ser positivamente associada com a elevada expressão de HAS2, GREM1 (Cillo *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2009) e PTGS2 (Anderson *et al.*, 2009), assim como, pode ser positivamente associada com o desenvolvimento embrionário (Anderson *et al.*, 2009). De facto, a elevada expressão de GREM1 e a baixa expressão de BDNF foram descritos como indicadores positivos e negativos, respectivamente, da qualidade embrionária (Anderson *et al.*, 2009).

1.5. Objectivos

Como referido anteriormente, as células do *cumulus* são as células mais próximas do ovócito e usufruem duma estreita associação com a célula germinal. Visto que análises directamente no ovócito o podem danificar e destruir, impossibilitando a sua utilização nas técnicas de reprodução assistida, novas abordagens são necessárias para se aceder à sua maturação e qualidade. Assim, uma correcta avaliação de certos parâmetros fisiologicamente importantes nas células do *cumulus* poderá conduzir ao estabelecimento duma relação com o estado de maturação e qualidade do ovócito correspondente e até com o desenvolvimento e qualidade embrionárias e posterior gravidez.

Deste modo, o objectivo deste trabalho é o estudo e avaliação nas células do *cumulus* de parâmetros como a sua densidade por ovócito, a presença e expressão de receptores de progesterona e de Cx43 e a incidência de apoptose. Espera-se portanto que estes parâmetros tenham uma relação com a maturidade e qualidade do ovócito, assim como, com as taxas de fertilização, de desenvolvimento embrionário ou de gravidez após a realização das técnicas de reprodução assistida.

Com este trabalho pretende-se desenvolver um conjunto de testes rápidos, facilmente executáveis e eficazes que possam ser realizados em centros de procriação medicamente assistida e que permitam caracterizar o estado das células do *cumulus* de um dado ovócito. Como objectivo último esta caracterização dos parâmetros nas células do *cumulus* deverá permitir a selecção ou não de ovócitos a injectar ou inseminar nas técnicas de reprodução assistida ou a selecção do embrião, que se desenvolveu a partir do ovócito em estudo, para ser ou não transferido para o útero da paciente.



Capítulo II: Materiais e Métodos

Seleção de Ovócitos para as Técnicas de Reprodução Assistida com base no estudo das Células do *Cumulus*

2.1. Materiais e Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, EUA), salvo exceções referenciadas ao longo do texto.

2.2. Material Biológico

O material biológico foi utilizado de acordo com as directrizes éticas dos HUC e com o devido consentimento das pacientes. As células do *cumulus* foram obtidas de pacientes que após um protocolo de estimulação hormonal, foram submetidas a punção folicular ecoguiada para se proceder à técnica de injeção intracitoplasmática de um espermatozóide (ICSI), no Serviço de Reprodução Humana dos HUC.

Este estudo foi efectuado num total de 137 mulheres que foram submetidas à técnica de ICSI de Outubro de 2011 a Junho de 2012. Utilizou-se apenas as amostras de células do *cumulus* cujos ovócitos iriam ser submetidos a ICSI, visto que nesta técnica estas células são removidas e descartadas, de modo ao técnico de laboratório poder manipular e injectar o ovócito com melhor campo de visão. Na técnica de FIV não se procede à remoção das células do *cumulus*.

2.2.1. Obtenção e Preparação das Células do *Cumulus*

Um total de 1221 complexos *cumulus*-ovócito foi recolhido através de punção folicular ecoguiada. Os ovócitos foram desnudados (separação das células do *cumulus* do ovócito) através de manipulação com micropipeta e tratamento enzimático com a hialuronidase *SynVITRO Hyadase* (Origio, Måløv, Dinamarca). Consoante o tipo de teste a que se iria proceder, os ovócitos de uma mesma paciente foram desnudados em conjunto ou em separado (figura

12). As amostras de células do *cumulus* foram mantidas em meio *Flushing* (Origio, Måløv, Dinamarca) até ao tratamento das mesmas.

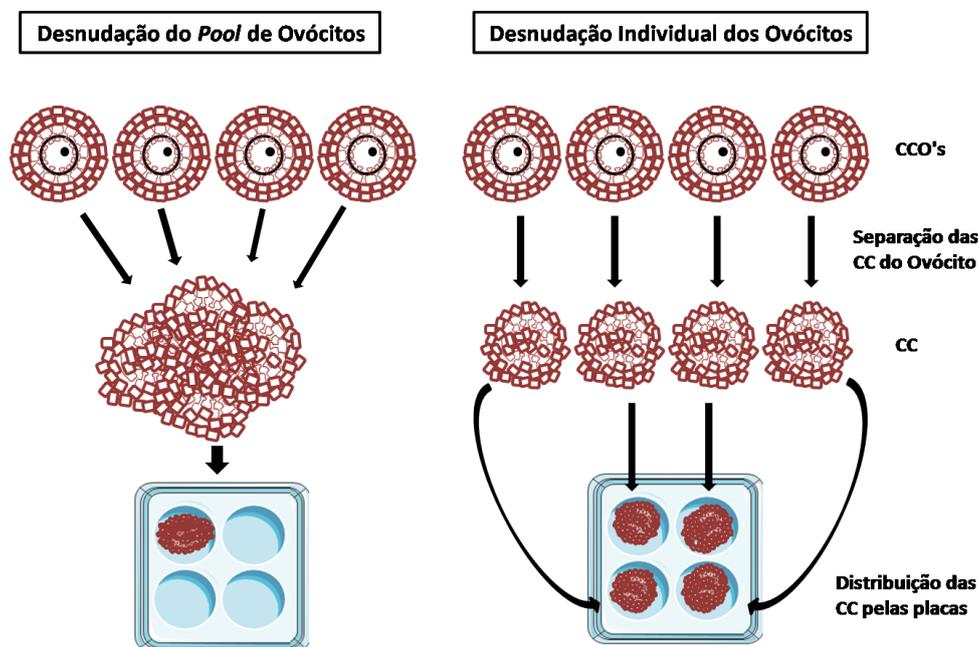


Figura 12- Esquema da Desnudação dos ovócitos e Obtenção das células do *cumulus*. As células do *cumulus* estudadas neste trabalho foram obtidas através da Desnudação do Pool de ovócitos (à esquerda) ou através da Desnudação individual dos ovócitos (à direita). CCO's (complexos cumulus-ovócito); CC (células do *cumulus*).

2.3. Testes Laboratoriais

2.3.1. Quantificação do Número de Células do *Cumulus* por Ovócito

Antes de se efectuar qualquer teste, procedeu-se ao cálculo da concentração de células do *cumulus* de cada amostra. Após as amostras serem recebidas foram submetidas a centrifugação (300 g durante 5 min) e posteriormente, o sobrenadante foi descartado e, consoante, o *pellet* formado foi adicionado um volume conhecido de solução salina tamponizada com fosfato (PBS). Seguidamente, colocaram-se 10 μ L da amostra numa câmara de *Makler*, procedeu-se à contagem de células do *cumulus*. Efectuou-se o cálculo da concentração da amostra e do número médio de células do *cumulus* por ovócito.

2.3.2. Teste do Azul de Tripano

A grande maioria dos testes de viabilidade baseia-se no colapso da integridade da membrana, determinado pela internalização de um corante ao qual a célula é normalmente impermeável. Neste trabalho recorreu-se ao teste do Azul de Tripano, em que as células com a membrana intacta não incorporam o corante, enquanto as células não viáveis ficam marcadas de azul, quando vistas ao microscópio óptico (Mascotti *et al.*, 2000; Lopes, 2008).

O procedimento consistiu na mistura de 5 μ L da amostra com 5 μ L de uma solução de 0,4% (v/v) Azul de Tripano, procedendo-se a uma incubação de 2 min à temperatura ambiente (T_a). De seguida, retiraram-se os 10 μ L da solução para uma lâmina, cobriu-se com uma lamela e observou-se num microscópio óptico de campo claro (Olympus Model CHS-G, Olympus, Hamburgo, Alemanha) com uma objectiva de 40x. Procedeu-se à contagem de 100 células por lâmina e determinou-se a percentagem de células vivas (sem coloração) e células mortas (coloração azul).

2.3.3. Imunocitoquímica, Microscopia de Epifluorescência, Microscopia Confocal de Fluorescência e Citometria de Fluxo

A técnica de imunocitoquímica, otimizada a partir do protocolo descrito em Ramalho-Santos *et al.* (2004), foi efectuada com recurso, em separado, aos seguintes anticorpos primários: anti-nPR-A/nPR-B (Neomarkers, Fremont, CA), anti-mPR β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-PGRMC1 (Abcam, Cambridge, UK) e anti-Cx43 (Santa Cruz Biotechnology). Depois da fixação das amostras com 2% (v/v) de formaldeído em PBS (pH=7,2) durante 45 min, da permeabilização com PBS com 1% (v/v) Triton X-100 durante 20 min, as amostras foram bloqueadas com PBS com 100 mM de glicina e 1mg/mL de albumina sérica bovina (solução de bloqueio) durante 30 min. Seguidamente, cada amostra foi incubada, durante a noite e a T_a , com um dos anticorpos primários mouse anti-nPR-A/nPR-B (diluição

1:300), goat anti-mPR β (diluição 1:200), goat anti-PGRMC1 (diluição 1:200) ou goat anti-Cx43 (diluição 1:50). Procedeu-se à lavagem das amostras com PBS com 0,1% (v/v) Triton X-100 durante 30 min e foi feita a incubação com os anticorpos secundários adequados (anti-mouse Alexa Fluor 488 ou anti-goat Alexa Fluor 568, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) numa diluição de 1:100, durante 1 hora a 37°C no escuro. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas em solução de bloqueio.

De modo a otimizar as concentrações dos anticorpos primários, colocaram-se 10 μ L de amostra nas lâminas e procedeu-se à montagem da mesma com meio de montagem para fluorescência *VectaShield* com *4,6-diamino-2-phenylindole* (DAPI; Vector Labs, Burlingame, CA). Posteriormente, selaram-se as lâminas com verniz e estas foram observadas por Microscopia de Epifluorescência no microscópio Zeiss Axioplan 2 Imaging fluorescence (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). As amostras foram também analisadas por Microscopia Confocal de Fluorescência no microscópio Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), com o objectivo de captação de imagens (na Unidade de Microscopia do Centro de Neurociências e Biologia Celular). Foram ainda efectuadas experiências controlo nas quais não se procedeu à incubação com os anticorpos primários, mas apenas com os anticorpos secundários, e observou-se, em microscopia de epifluorescência, a ausência de fluorescência (dados não apresentados).

Após optimização as amostras foram tratadas exactamente com o mesmo protocolo e após suspensão em 500 μ L de solução de bloqueio foram analisadas por Citometria de Fluxo com recurso ao citómetro BD FACSCanto II (Becton Dickinson, EUA; Centro de Histocompatibilidade do Centro). Utilizaram-se lasers de excitação a 488 e 633 nm, respectivamente, para a detecção do fluoróforo isocianato de fluoresceína (FITC) com um filtro *bandpass* 530/30 nm (para a análise do nPR) e do fluoróforo ficoeritrina-*Texas Red* (PE-*Texas Red*) com um filtro *bandpass* 585/42 nm (para a análise de mPR β , PGRMC1 e Cx43). Os dados daqui resultantes foram analisados com o software *Infinicyt V1.5* (Infinicyt, Cytognos,

Salamanca, Espanha). Foram analisadas um mínimo de 81, 1458, 486, 1188 células para o nPR-A/B, mPR β , PGRMC1, Cx43, respectivamente.

2.3.4. Teste de Detecção de Actividade das Caspases 3 e 7

As caspases são proteases cisteínicas que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato e têm um papel muito importante na apoptose. Ao clivarem os seus substratos estas proteases levam à condensação e fragmentação nuclear que, em conjunto com a externalização de fosfolípidos do folheto interno da membrana plasmática levam à sinalização para as células apoptóticas serem fagocitadas por macrófagos. São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis delas (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10) participam na apoptose (Sambade, 2005; Grivicich *et al.*, 2007). A caspase-3 é uma caspase muito importante, que leva à clivagem de muitas proteínas, que por sua vez, leva ao colapso ordenado da célula.

Através do *kit* usado neste trabalho, o Caspase-Glo[®] 3/7 Assay (G8091, Promega, Wisconsin, EUA), consegue-se aceder com grande sensibilidade à actividade das caspases-3 e -7. Este teste é composto por um substrato pró-luminescente contendo a sequência DEVD (Asp[OMe]-Glu[OMe]-Val-Asp[OMe]) reconhecida pelas caspases-3/7 e por uma luciferase termoestável num sistema tampão otimizado para a actividade das caspases-3/7, assim como, para a actividade da luciferase e para a lise celular. Quando se adiciona o reagente Caspase-Glo[®] 3/7 a uma amostra celular ocorre clivagem do substrato pelas caspases, e a subsequente libertação de aminoluciferina livre, sendo esta consumida pela luciferase, originando um sinal luminoso (figura 13). Este sinal luminoso produzido é directamente proporcional à quantidade de actividade das caspases. Esta técnica é desenhada de modo a ser usada em placas multi-poços e a leitura feita num luminómetro (O'Brien *et al.*, 2003).

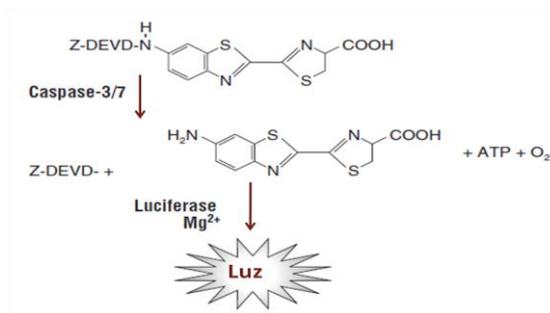


Figura 13- Representação esquemática dos passos da reacção do teste Caspase-Glo™ 3/7 (adaptado de O'Brien *et al.*, 2003).

O protocolo deste teste foi realizado de acordo com o que está descrito pelo fabricante (O'Brien *et al.*, 2003). Primeiro realizou-se a preparação do reagente Caspase-Glo™ 3/7 e, posteriormente, a incubação de 100 µL deste reagente com 5000 células do *cumulus* contidas num volume de 100 µL de meio PBS, durante 1 h a Ta e no escuro. Após o período de incubação, procedeu-se à leitura no luminómetro *Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader* (BioTek, Winooski, EUA).

2.4. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através da utilização do software *SPSS* para *Windows* (versão 20, Chicago, EUA). Verificou-se se os dados tinham uma distribuição normal através do teste *Kolmogorov-Smirnov*. Após se verificar a homogeneidade de variâncias, utilizou-se a ANOVA de uma via para estudar as diferenças nos parâmetros avaliados relativamente à % de ovócitos em MII, à taxa de fecundação, à % de embriões grau 1, à taxa de desenvolvimento embrionário, ao estado do ovócito, ao grau do embrião e à idade da paciente. O teste pos-hoc utilizado foi o teste de Tukey. O teste t para amostras independentes foi utilizado nos parâmetros avaliados relativamente à taxa de gravidez, ao estudo de ovócitos fecundados vs não fecundados, assim como ao estudo de ovócitos que deram origem a gravidez vs os que não deram e ao grau do embrião. Quando se verificou que a distribuição

dos dados não era normal e/ou não se verificou a homogeneidade de variâncias, procedeu-se à utilização dos testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Teste Mann-Whitney. Visto os dados não terem uma distribuição normal, para estudar as correlações recorreu-se ao teste de Spearman. Os resultados foram expressos como médias \pm desvio-padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando associadas a um valor de $p < 0,05$.



Capítulo III: Resultados

Seleção de Ovócitos para as Técnicas de Reprodução Assistida com base no estudo das Células do *Cumulus*

De modo a tentar estabelecer a importância do estado das células do *cumulus* e a sua influência no estado de maturação/qualidade do ovócito, do embrião resultante e possível gravidez, os parâmetros monitorizados ao longo deste trabalho foram relacionados com parâmetros clinicamente importantes obtidos após as técnicas de reprodução assistida. Mais precisamente, os dados referentes às células do *cumulus* obtidas do *pool* de ovócitos (figura 14) foram relacionados com os seguintes parâmetros:

- percentagem de ovócitos em metafase II (n° ovócitos em MII/ n° total de ovócitos do *pool*);
- taxa de fecundação (n° de ovócitos fecundados/ n° de ovócitos injectados pela técnica de ICSI);
- percentagem de embriões grau 1 (n° embriões grau 1/ n° embriões grau 1+2+3);
- taxa de desenvolvimento embrionário (n° embriões/ n° de ovócitos fecundados);
- taxa de gravidez.

Quando os ovócitos foram desnudados separadamente (figura 12) e as células do *cumulus* foram estudadas isoladamente e os dados obtidos relacionados com o estado de qualidade do ovócito desse complexo (MII, MI, degenerado (DEG) + atrésico (AT)); com o grau do embrião resultante e se o ovócito em causa participou ou não para a gravidez. Em ambas as abordagens de estudo os dados foram também relacionados com a idade da paciente.

3.1. Número de Células do *Cumulus* por Ovócito e Viabilidade das Células do *Cumulus*

O número médio de células do *cumulus* que rodeiam o ovócito é um dado que se considerou relevante e assim, em amostras de células do *cumulus* (CC) provenientes do *pool* de ovócitos efectuou-se uma média do número de CC/ovócito e em amostras de células do *cumulus* isoladas de um só ovócito contabilizou-se o número de CC/ovócito. O número médio destas células por ovócito é de 17216 ± 24227 , com um mínimo observado de 167 CC/ovócito

e um máximo de 245000 CC/ovócito (tabela 2). Em células do *cumulus* provenientes apenas de ovócitos em MII, observa-se que o valor médio destas células é de 13667 ± 13792 CC/ovócito (tabela 2). Determinou-se ainda a viabilidade das amostras, constatando-se que em média $59\% \pm 21$ das células se encontravam vivas, segundo o teste do Azul de Tripano (tabela 2).

Tabela 2- Resultados Descritivos do Número de CC/Ovócito e Viabilidade das Células do *cumulus*

	Nº de CC/Ovócito	Nº de CC/Ovócito em MII	Viabilidade
Média	17216	13667	59%
Mínimo	167	2000	3%
Máximo	245000	57500	90%
Desvio Padrão	24227	13792	21
N	152	18	52

Quando se procedeu à contagem das células do *cumulus* de cada ovócito, observou-se que ovócitos em MII apresentam um maior número de células do *cumulus* (13667 ± 13791 CC/ovócito) do que ovócitos em MI (3750 ± 2872 CC/ovócito) e que estes últimos parecem apresentar uma tendência para possuírem menor número de células do *cumulus* do que o grupo de DEG + AT (7636 ± 5002 CC/ovócito; $p=0,05$) (figura 14.A).

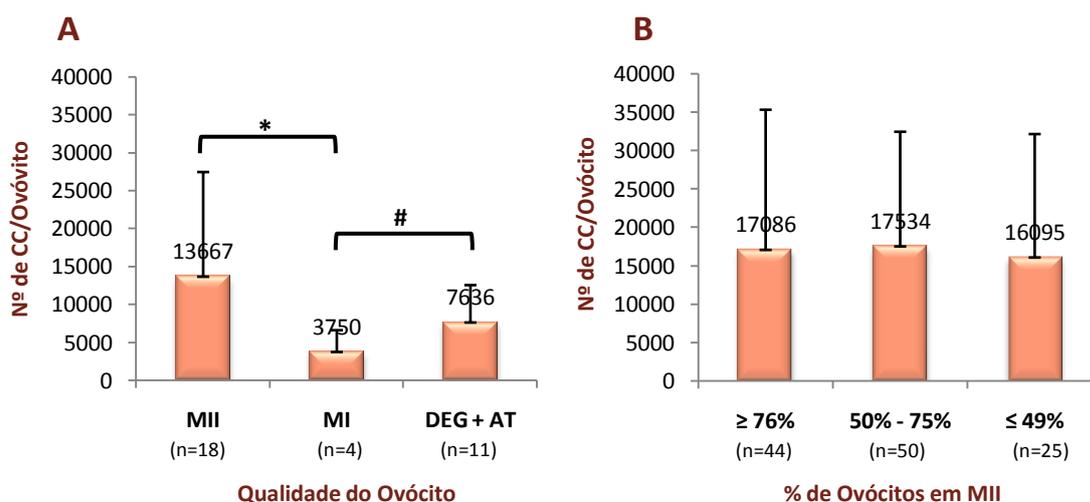


Figura 14 – Número de CC/Ovócito consoante o Estado dos Ovócitos: A. Número de CC de ovócitos em MII, em MI e ovócitos DEG + AT; B. Número de CC/Ovócito Vs Percentagem de Ovócitos em MII do Pool. * $p < 0,05$; # $p = 0,05$. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão.

Já quando se avaliou o número de CC/ovócito de células do *cumulus* provenientes de *pools* de ovócitos com diferentes qualidades, isto é, grupos de ovócitos com diferentes percentagens de ovócitos em MII, não se verificaram diferenças ($p=0,778$; figura 14.B).

Também não se observou uma influência estatisticamente significativa do número de CC/ovócito na taxa de fecundação dos ovócitos correspondentes, assim como, na percentagem de embriões de grau 1, na taxa de desenvolvimento embrionário nem na taxa de gravidez (tabela 3). Por outro lado, quando avaliados individualmente, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no número de CC/ovócito entre os grupos de ovócitos fecundados e não fecundados (tabela 3).

Tabela 3- Dados Descritivos do Número de CC/Ovócito consoante o Parâmetro Clínico em Estudo

CC de Pool de Ovócitos			CC por Ovócito	
Taxa de Fecundação			Fecundação do Ovócito	
$\geq 76\%$	50% - 75%	$\leq 49\%$	Fecundado	Não Fecundado
18297 \pm 21840	17001 \pm 13062	18174 \pm 15002	11143 \pm 9662	14429 \pm 19370
p=0,795			p=0,971	
% Embriões de Grau 1			Grau do Embrião	
$\geq 76\%$	50% - 75%	$\leq 49\%$	1	2 + 3
18932 \pm 20911	17254 \pm 13090	15319 \pm 10296	14778 \pm 10035*	4600 \pm 4336 *
p=0,790			*p=0,029	
Taxa de Desenvolvimento Embrionário			Ovócito originou Gravidez	
$\geq 76\%$	50% - 75%	$\leq 49\%$	Não	Sim
17543 \pm 19030	17118 \pm 13737	20529 \pm 11285	13300 \pm 10778	8000
p=0,345			p=0,727	
Taxa de Gravidez				
Negativa	Positiva			
16060 \pm 13838	26294 \pm 26525			
p=0,087				
Idade				
≤ 29 Anos	30 – 34 Anos	≥ 35 Anos		
21590 \pm 20192	13839 \pm 10841	15837 \pm 17390		
p=0,756				

Verificou-se, no entanto, que embriões de grau 1 provêm de ovócitos com mais células do *cumulus* (14778 \pm 10035 CC/ovócito) do que embriões de grau 2 e 3 (4600 \pm 4336 CC/ovócito; tabela 3). Contudo, o número de células do *cumulus* não indica se o ovócito em causa deu ou não origem a gravidez e a idade da paciente também não influenciou o número de CC/ovócito (tabela 3).

3.2. Receptores de Progesterona - Presença, Localização e Expressão

Em relação aos receptores de progesterona, estudou-se a sua presença, assim como, a sua localização por Imunocitoquímica, Microscopia de Epifluorescência e Microscopia Confocal de Fluorescência e a sua expressão (análise da percentagem de células marcadas e da intensidade de fluorescência) através de Citometria de Fluxo.

Deste modo, verificou-se que os três receptores estão presentes nas células do *cumulus* humanas. O receptor genómico nPR-A/B pode localizar-se não só no núcleo mas também no citoplasma das células do *cumulus* (figura 15). O receptor mPR β parece localizar-se de uma forma heterogénea na membrana plasmática destas células (figura 15) e isto é também comprovado com um ensaio em que não se procedeu à permeabilização das células, em que estas emitiam na mesma fluorescência (dados não apresentados). Quanto ao PGRMC1, como se vê no detalhe da figura 15 (E3), há localização deste receptor no citoplasma das células do *cumulus*, formando inclusive uma espécie de anel à volta do núcleo. No ensaio em que não se procedeu à permeabilização das células, foi notória a existência de fluorescência, no entanto, não tão intensa (dados não apresentados). Parece assim existir uma localização citoplasmática e membranar deste receptor.

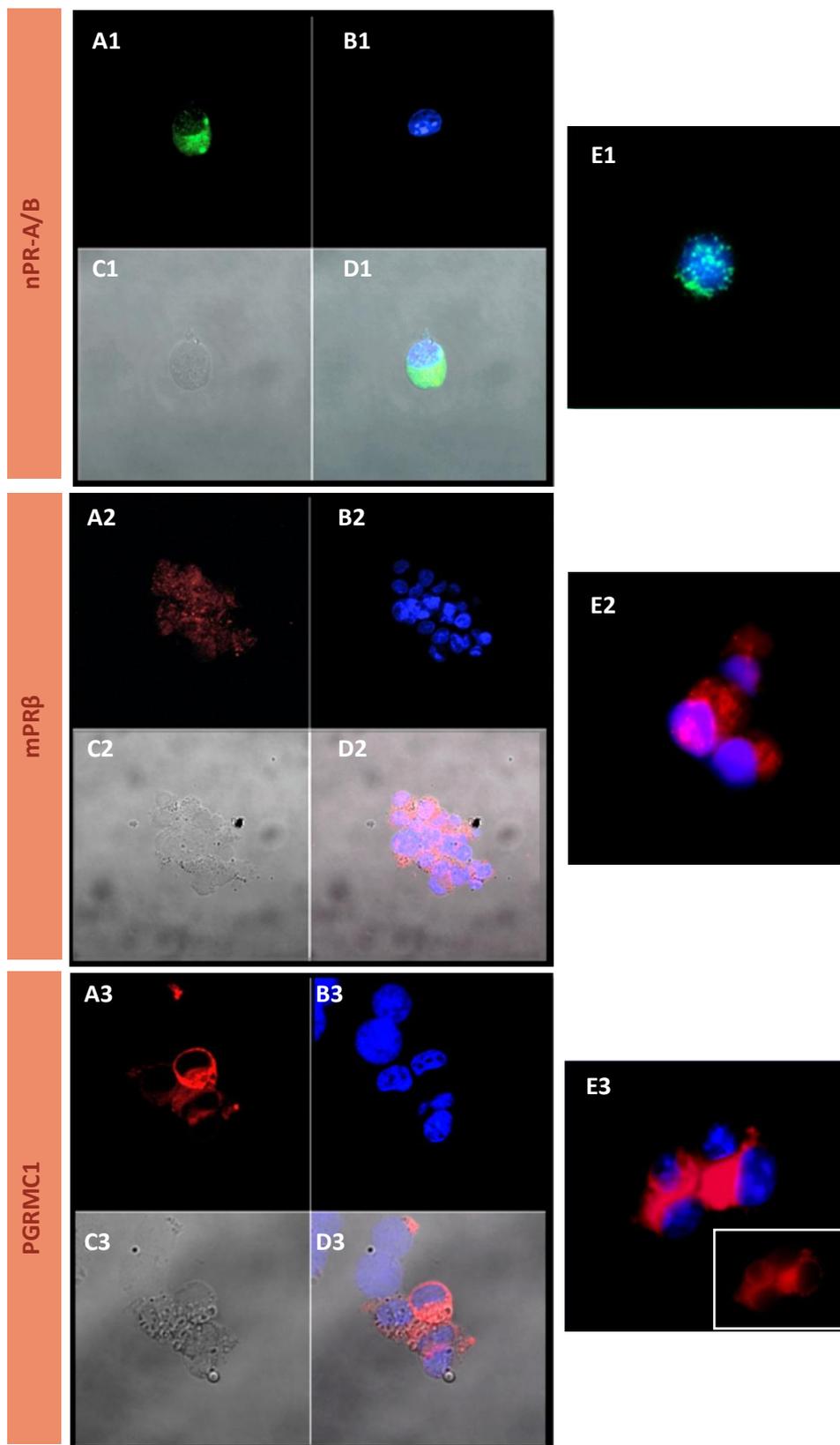


Figura 15 - Células do *cumulus* humanas a expressar os três receptores de Progesterona. Fotografias de Microscopia Confocal de Fluorescência (A e B); de Contraste de Fase (C); Sobreposição de fotografias de Microscopia Confocal de Fluorescência e Microscopia de Contraste de Fase (D) e Microscopia de Epifluorescência (E). 1- nPR-A/B (verde), 2- mPR β (vermelho), 3- PGRMC1 (vermelho). O núcleo das células foi marcado com DAPI (azul).

Após verificar a presença e localização destes receptores quantificou-se a sua expressão através da análise da percentagem de células marcadas e também a intensidade de fluorescência para cada receptor. Assim sendo, procedeu-se à análise das amostras por Citometria de fluxo. Observou-se que há uma maior percentagem de células do *cumulus* marcadas para o nPR-A/B ($76\% \pm 23$) do que para o mPR β ($41\% \pm 25$; $p=0,002$; figura 16.A). No entanto, não existem diferenças relativamente ao PGRMC1. Em relação à intensidade de fluorescência para cada receptor, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre eles (figura 16.B).

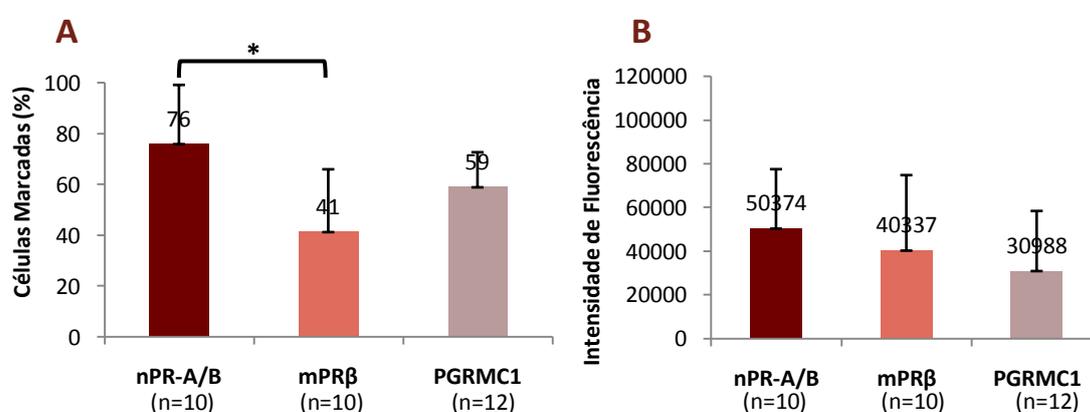


Figura 16 - Células Marcadas (A) e Intensidade de Fluorescência (B) dos três Receptores de Progesterona nas células do *cumulus*. * $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão.

De seguida, procedeu-se à avaliação destes mesmos parâmetros (percentagem de Células marcadas e Intensidade de fluorescência) relativamente à maturação do *pool* de ovócitos dos quais as células do *cumulus* foram isoladas, ou seja, relativamente à percentagem de ovócitos em MII de cada amostra. Deste modo, células do *cumulus* provenientes de *pools* de ovócitos com $\geq 76\%$ de ovócitos em MII, apresentam maior marcação para o receptor nPR-A/B ($85\% \pm 9$) do que para o PGRMC1 ($58\% \pm 17$; $p=0,034$; figura 17). Já células do *cumulus* provenientes de *pools* de $50\%-75\%$ e $\leq 49\%$ de ovócitos em MII não apresentaram diferenças na marcação para os três receptores de progesterona (figura 17). Quando comparados os três grupos com diferentes graus de maturação dos ovócitos entre si, também não foram

observadas diferenças estatisticamente significativas relativamente à percentagem de células marcadas para cada receptor (figura 17).

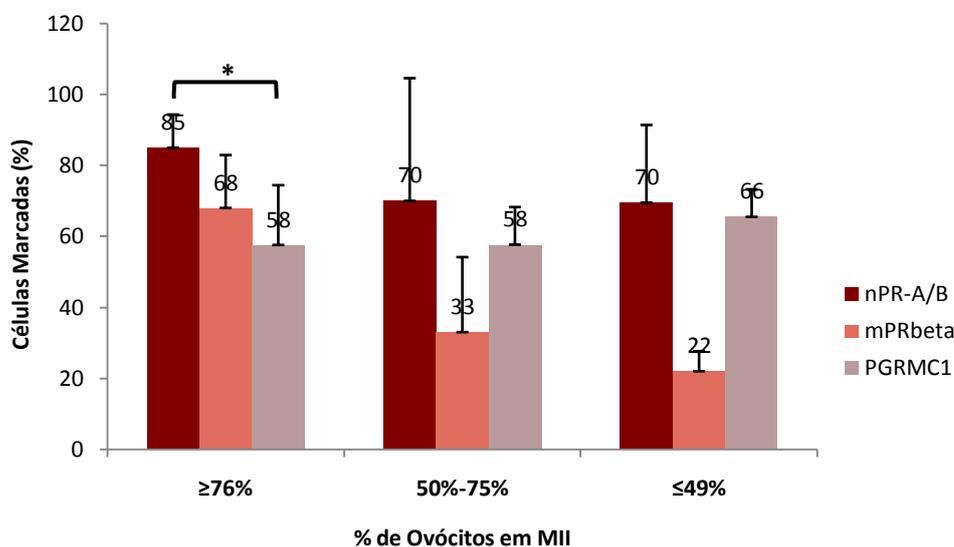


Figura 17 – Células Marcadas para os Receptores de Progesterona nas células do *cumulus* consoante a percentagem de Ovócitos em MII do *Pool* de Ovócitos. Respetivamente para nPR-A/B, mPR β , PGRMC1: n= 4, 3, 7 ($\geq 76\%$); n= 4, 5, 3 (50%-75%); n= 2, 2, 2 ($\leq 49\%$). * p < 0,05. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão.

Em relação à Intensidade de fluorescência, as amostras com $\geq 76\%$ de ovócitos em MII possuem células do *cumulus* em que o PGRMC1 apresenta uma intensidade de fluorescência inferior (28646 ± 16275) tanto à intensidade de fluorescência do nPR-A/B (70146 ± 28928 ; p= 0,024) como à intensidade de fluorescência do mPR β (80921 ± 34881 ; p=0,033). Contudo, a intensidade de fluorescência do nPR-A/B e do mPR β não diferem entre si (p=0,857). A intensidade de fluorescência do mPR β nas células do *cumulus* provenientes de $\geq 76\%$ de ovócitos em MII é superior à intensidade de fluorescência do mPR β nas células do *cumulus* provenientes de 50%-75% de ovócitos em MII (20380 ± 16422 ; p=0,019), mas não se observou diferenças relativamente ao grupo de $\leq 49\%$ de ovócitos em MII (29354 ± 4753). Neste último grupo não se observaram diferenças entre a intensidade de fluorescência de cada receptor (figura 18).

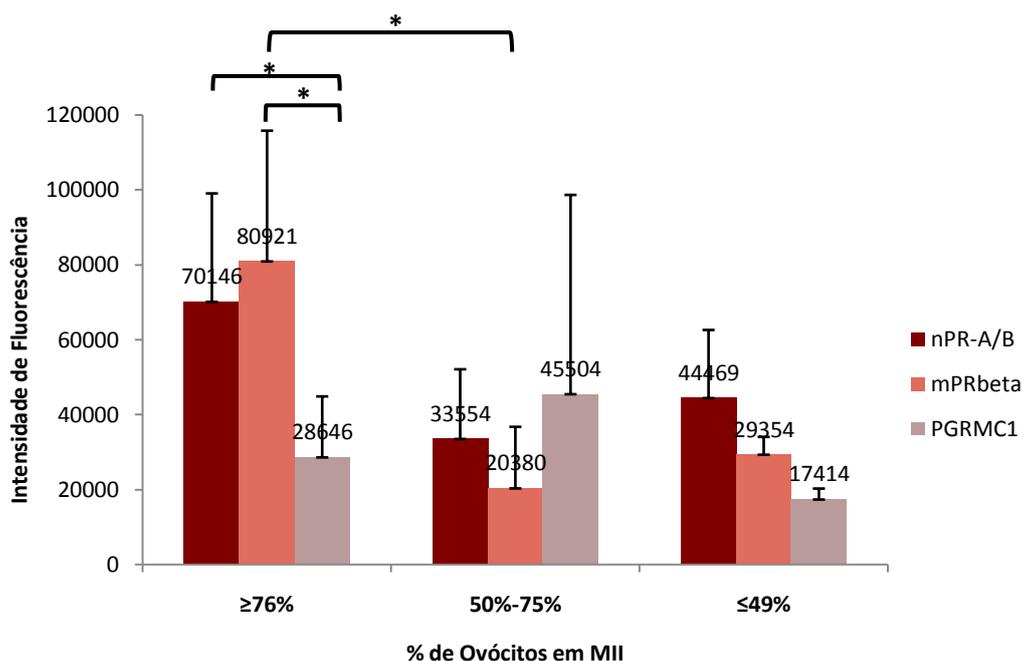


Figura 18 - Intensidade de Fluorescência para os Receptores de Progesterona nas células do *cumulus* consoante a percentagem de Ovócitos em MII do *Pool* de Ovócitos. Respectivamente para nPR-A/B, mPRβ, PGRMC1: n= 4, 3, 7 (≥76%); n= 4, 5, 3 (50%-75%); n= 2, 2, 2 (≤49%). * p <0,05. Os dados são expressos em média ± desvio padrão.

Não foi encontrada qualquer relação estatisticamente significativa queo comparada a percentagem de Células marcadas e a Intensidade de fluorescência das células do *cumulus* para os receptores de progesterona com a taxa de fecundação dos ovócitos do *pool*, a percentagem de embriões de grau 1 a que o *pool* de ovócitos deu origem, a taxa de desenvolvimento embrionário, com a taxa de gravidez e com a idade da paciente (tabela 4).

Tabela 4 - Dados Descritivos da Percentagem de Células do *cumulus* marcadas e Intensidade de Fluorescência para os três Receptores de Progesterona consoante o Parâmetro Clínico em estudo

	nPR-A/B		mPR β		PGRMC1	
	% Células Marcadas	Intensidade de Fluorescência	% Células Marcadas	Intensidade de Fluorescência	% Células Marcadas	Intensidade de Fluorescência
Taxa de Fecundação						
≥ 76%	78 ± 4	45597 ± 8068	49 ± 30	68129 ± 37935	60 ± 20	19547 ± 7259
50% - 75%	75 ± 28	50496 ± 36004	35 ± 24	14668 ± 11920	55 ± 12	40768 ± 41340
≤ 49%	98	52252	38 ± 28	36092 ± 14281	63 ± 13	27345 ± 11631
p	0,725	0,98	0,767	0,067	0,747	0,588
% de Embriões de Grau 1						
≥ 76%	76 ± 26	50611 ± 32869	42 ± 25	32679 ± 24832	62 ± 12	57790 ± 48275
50% - 75%	75	39892	62	3982	47 ± 6	22233 ± 11311
≤ 49%			18	25993	66 ± 16	22521 ± 11035
p	0,549	0,32	0,59	0,217	0,601	0,331
Taxa de Desenvolvimento Embrionário						
≥ 76%	66 ± 29	34796 ± 14698	43 ± 28	35541 ± 24706	58 ± 11	45798 ± 38559
50% - 75%	95 ± 1	72835 ± 36816	42 ± 29	73593 ± 59903	60 ± 18	22655 ± 9110
≤ 49%	77 ± 17	54658 ± 50719	31	7397	48	10120
p	0,422	0,403	0,927	0,255	0,781	0,353
Taxa de Gravidez						
Negativa	71 ± 24	50586 ± 30770	34 ± 29	35062 ± 27828	60 ± 14	35969 ± 30300
Positiva	94	46802	43 ± 19	53191 ± 45403	44	18539
p	0,385	0,911	0,599	0,482	0,3	0,6
Idade						
≤29 Anos	80	51302			59 ± 20	16252 ± 9097
30-34 Anos	70 ± 25	43824 ± 25750	36 ± 30	15345 ± 10626	58 ± 17	43369 ± 43381
≥35 Anos	95 ± 1	51048 ± 36069	44 ± 24	51048 ± 36069	57 ± 10	32538 ± 18914
p	0,448	0,464	0,664	0,141	0,988	0,51

3.3. Conexina 43 - Presença, Localização e Expressão

À semelhança do que foi efectuado para os receptores de progesterona, estudou-se a presença e localização da conexina 43 (Cx43) por Imunocitoquímica, Microscopia de Epifluorescência e Microscopia Confocal de Fluorescência e, posteriormente, a sua expressão (análise da percentagem de células marcadas e da intensidade de fluorescência) através de Citometria de Fluxo.

Verificou-se que a Cx43 se localiza de uma forma heterogénea na membrana citoplasmática das células do *cumulus*, observando-se zonas pontilhadas onde a fluorescência se apresentou mais intensa (figura 19).

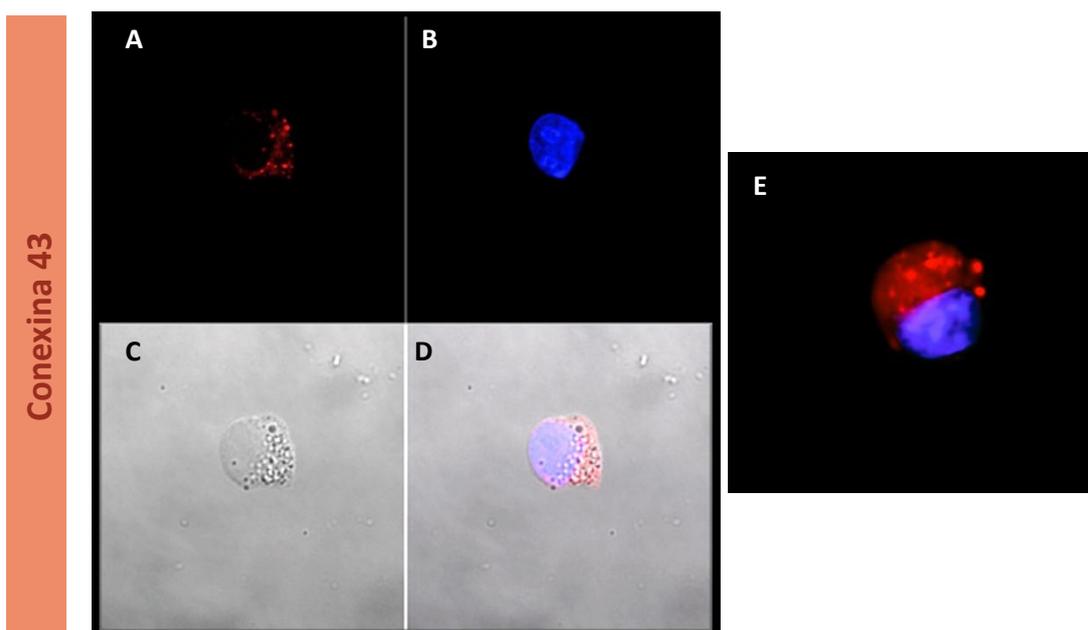


Figura 19 - Células do *cumulus* humanas a expressar Cx43. Fotografias de Microscopia Confocal de Fluorescência (A e B); de Contraste de Fase (C); Sobreposição de fotografias de Microscopia Confocal de Fluorescência e Microscopia de Contraste de Fase (D) e Microscopia de Epifluorescência (E). A Cx43 emite fluorescência vermelha e o núcleo das células foi marcado com DAPI (azul).

Na análise feita através de citometria de fluxo foi possível estabelecer que $48\% \pm 14$ das células encontravam-se marcadas para esta proteína e a sua intensidade de fluorescência foi de 26555 ± 20062 (figura 20).

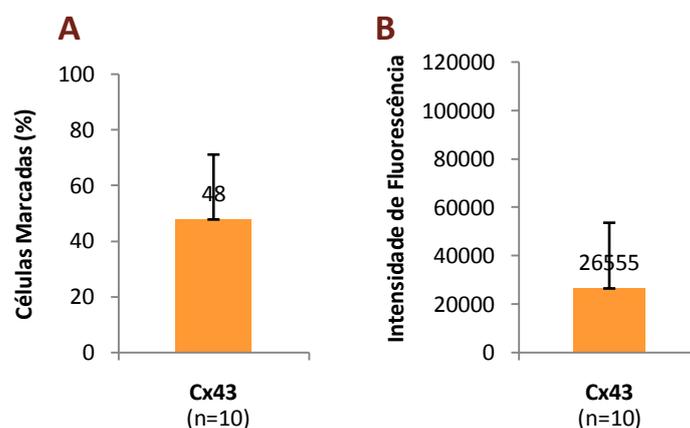


Figura 20 - Células Marcadas (A) e Intensidade de Fluorescência (B) de Cx43 nas células do *cumulus*. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão.

Quando a percentagem de células do *cumulus* marcadas e a intensidade de fluorescência para Cx43 foram estudadas consoante a percentagem de ovócitos em MII, não foram reveladas diferenças estatisticamente significativas (figura 21).

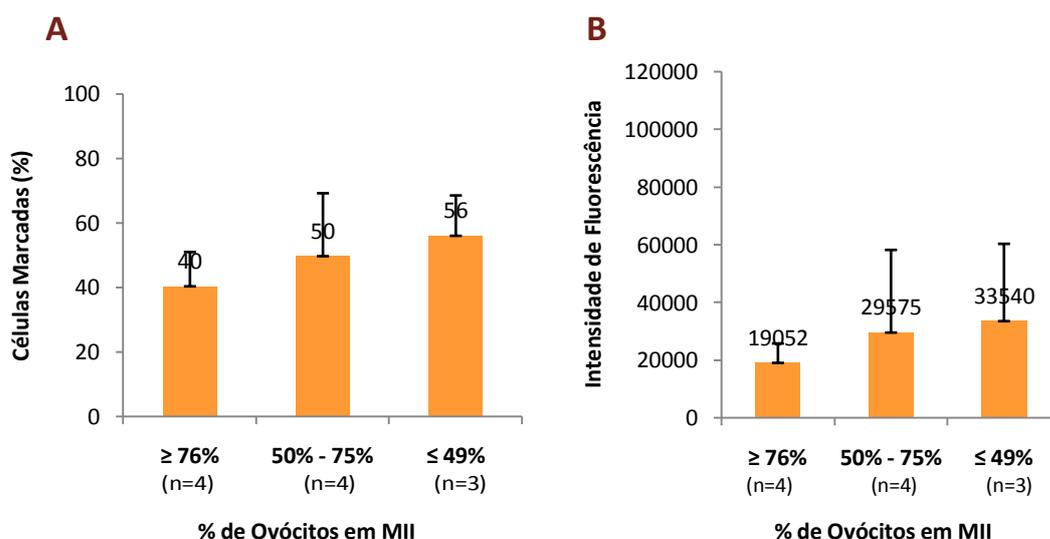


Figura 21 - Células Marcadas (A) e Intensidade de Fluorescência (B) da Cx43 nas células do *cumulus* consoante a percentagem de Ovócitos em MII do *Pool* de Ovócitos. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão.

Não foi encontrada qualquer relação entre a percentagem de células marcadas e a intensidade de fluorescência de Cx43 nas células do *cumulus* com a taxa de fecundação dos ovócitos do *pool*, a percentagem de embriões de grau 1 a que o *pool* de ovócitos deu origem e com a taxa de desenvolvimento embrionário. Apesar da intensidade de fluorescência não apresentar nenhuma relação com a taxa de gravidez, a percentagem de células do *cumulus* marcadas para Cx43 é, no entanto, estatisticamente mais elevada nas células do *cumulus* de mulheres que engravidaram ($64\% \pm 9,2$) em relação a mulheres que não engravidaram ($40\% \pm 9,8$; $p= 0,026$; tabela 4). A idade da mulher também não influencia a percentagem de células do *cumulus* marcadas e a intensidade de fluorescência para a Cx43 (tabela 5).

Tabela 5 - Dados Descritivos da Percentagem de Células do *cumulus* marcadas e Intensidade de Fluorescência para a Conexina 43 consoante o Parâmetro Clínico em estudo

Cx43: % de Células Marcadas			Cx43: Intensidade de Fluorescência		
Taxa de Fecundação			Taxa de Fecundação		
≥ 76%	50% - 75%	≤ 49%	≥ 76%	50% - 75%	≤ 49%
49 ± 17	52 ± 14	36 ± 6	36568 ± 23015	26587 ± 21167	11455 ± 3759
p=0,423			p=0,440		
% de Embriões de Grau 1			% de Embriões de Grau 1		
≥76%	50% - 75%	≤49%	≥76%	50% - 75%	≤49%
47 ± 20	49 ± 12	40 ± 12	28406 ± 29479	14298 ± 4558	23181 ± 7864
p=0,880			p=0,452		
Taxa de Desenvolvimento Embrionário			Taxa de Desenvolvimento Embrionário		
≥76%	50% - 75%	≤49%	≥76%	50% - 75%	≤49%
44 ± 12	47 ± 17		14094 ± 4543	26438 ± 21319	
p=0,792			p=0,374		
Taxa de Gravidez			Taxa de Gravidez		
Negativa		Positiva	Negativa		Positiva
40 ± 10*		64 ± 9*	17104 ± 6658		35925 ± 37310
*p=0,026			p=0,209		
Idade			Idade		
≤29 Anos	30-34 Anos	≥35 Anos	≤29 Anos	30-34 Anos	≥35 Anos
56 ± 22	42 ± 10	49 ± 12	44540 ± 30955	21655 ± 6546	11828 ± 3232
p=0,467			p=0,148		

3.4. Actividade das Caspases-3/7

Por último, avaliou-se a actividade de duas caspases essenciais ao processo de apoptose, as caspases 3 e 7. Novamente, a obtenção das amostras de células do *cumulus* obedeceu a duas abordagens, o que resultou na análise da actividade das caspases de células do *cumulus* por ovócito e de células do *cumulus* por *pool* de ovócitos. Os resultados seguintes expressam-se em unidades relativas de luz (RLU).

Em primeiro lugar foi possível estabelecer uma correlação negativa entre a actividade das caspases por ovócito e o número de células do *cumulus* por ovócito ($r = -0,447$; $p = 0,012$).

Posteriormente analisou-se os dados da actividade das caspases nas células do *cumulus* consoante a maturação dos ovócitos. e no estudo das células do *cumulus* por ovócito, constatou-se que não existem diferenças na actividade destas caspases entre os ovócitos em MII (1784 ± 1545 RLU), em MI (1893 ± 1832 RLU), DEG e AT (3273 ± 6800 RLU) ($p = 0,776$; figura 22.A). Também não se detectam diferenças estatisticamente significativas quando comparada a actividade destas proteases em *pools* de ovócitos com a percentagem de ovócitos em MII ($p = 0,065$; figura 22.B).

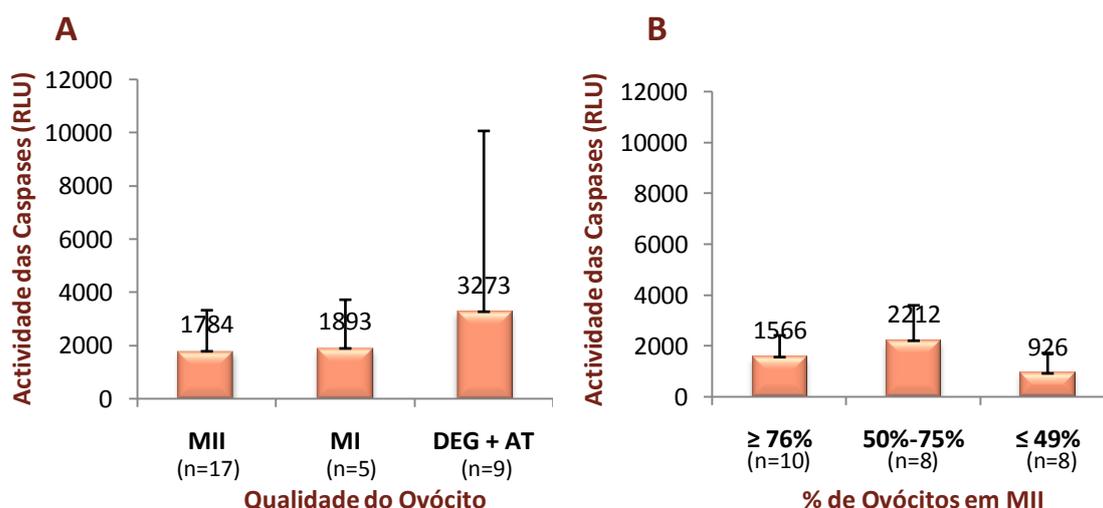


Figura 22 – Actividade das Caspases-3/7 nas Células do *cumulus* consoante o Estado dos Ovócitos: A. Actividade das Caspases por Ovócito. B. Actividade das Caspases consoante a percentagem de ovócitos em MII do *Pool* de Ovócitos. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão.

Não se verificaram diferenças na actividade das caspases em relação à taxa de fecundação dos ovócitos, assim como em relação à taxa de desenvolvimento embrionário e à taxa de gravidez (tabela 6). Quando avaliada a actividade das caspases em células do *cumulus* por ovócito não se verificaram diferenças na actividade das caspases nas células do *cumulus* entre ovócitos fecundados e não fecundados (tabela 6).

Tabela 6 - Dados Descritivos da Actividade das Caspases consoante o Parâmetro Clínico em Estudo

CC de Pool de Ovócitos			CC por Ovócito		
Taxa de Fecundação			Fecundação do Ovócito		
≥ 76%	50% - 75%	≤ 49%	Fecundado	Não Fecundado	
1687 ± 1228	1583 ± 1183	1580 ± 1351	2102 ± 1798	1174 ± 685	
p = 0,983			p = 0,470		
Taxa de Desenvolvimento Embrionário			Ovócito originou Gravidez		
≥76%	50% - 75%	≤49%	Não	Sim	
1813 ± 1189	1267 ± 1035	707	2219 ± 1878	1149	
p = 0,474			p = 0,545		
Taxa de Gravidez			Idade		
Negativa		Positiva	≤29 Anos	30 - 34 Anos	≥35 Anos
1339 ± 1041		1569 ± 1061	2487 ± 754	1348 ± 2165	2621 ± 4687
p = 0,667			p = 0,078		
Idade					
≤29 Anos	30-34 Anos	≥35 Anos			
1310 ± 1407	1735 ± 1356	1450 ± 1002			
p= 0,811					

Em relação ao grau do embrião resultante, parece existir uma tendência para embriões de grau 1 terem em média menor actividade de caspases nas células do *cumulus* dos ovócitos que lhe deram origem (1270 ± 563 RLU) do que células do *cumulus* de ovócitos que originaram embriões de grau 3 (3734 ± 1009 RLU; p=0,036; figura 23). Apesar de esta ser uma diferença estatisticamente significativa, o facto de apenas terem sido analisadas duas amostras para o grupo de embriões de grau 3 não nos assegura a solidez deste resultado.

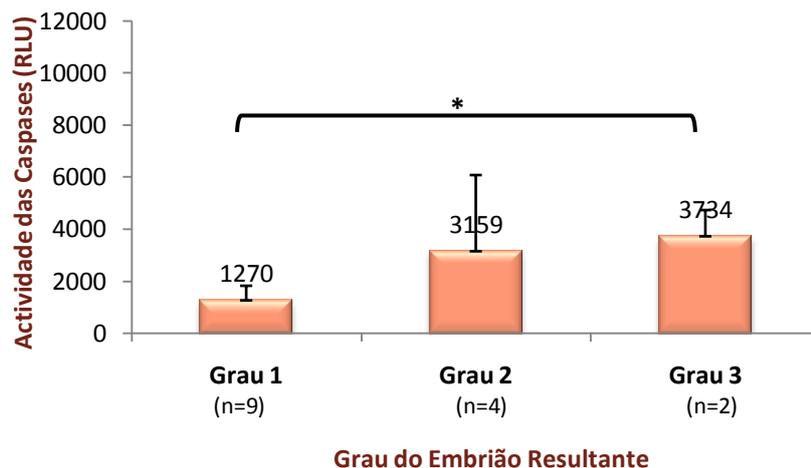
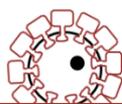


Figura 23 – Actividade das Caspases-3/7 nas células do *cumulus* conforme o Grau do Embrião Resultante. * $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão.

Contudo, também não houve diferenças na actividade das caspases nas células do *cumulus* de ovócitos que originaram e não originaram gravidez e a idade da paciente também parece não afectar a actividade das caspases nas células do *cumulus* (tabela 6).



Capítulo IV: Discussão

Seleção de Ovócitos para as Técnicas de Reprodução Assistida com base no estudo das Células do *Cumulus*

Hoje em dia o maior problema das tecnologias de reprodução é a impossibilidade de se conseguir prever a capacidade que um ovócito possui de sustentar o desenvolvimento do embrião *in vitro* ou *in vivo* (Lucidi *et al.*, 2003; Assou *et al.*, 2010). Além disso, nas técnicas de reprodução assistida os embriões obtidos apresentam grandes diferenças, não só em termos da sua morfologia, mas também do tempo de desenvolvimento, metabolismo e expressão de genes (Dell'Aquila *et al.*, 2004), o que faz com que se desenvolvam em embriões de diferentes graus de qualidade. Visto que a morfologia, tanto do ovócito, como do embrião, não consegue prever a qualidade do mesmo (McKenzie *et al.*, 2004; Rienzi *et al.*, 2011), nasce assim uma necessidade de descoberta de biomarcadores simples que indiquem a qualidade do ovócito e/ou embrião (Rienzi *et al.*, 2011). Estes testes deverão ser fiáveis e aplicáveis à rotina dos centros de procriação medicamente assistida e, acima de tudo, não poderão interferir com a viabilidade e qualidade da célula germinal e/ou embrião.

Deste modo, as células do *cumulus* surgem como as melhores candidatas na tentativa de resposta a este problema, visto serem as células que partilham de uma maior comunicação e relação com o ovócito (Canipari, 2000; Tanghe *et al.*, 2002). Como referido no Capítulo I, estas células desempenham funções essenciais de apoio na maturação e condução do ovócito no interior do oviducto e participação no acesso do espermatozóide ao ovócito (Tanghe *et al.*, 2003; Van Soom *et al.*, 2002; Russell e Robker, 2007; Huang e Wells, 2010). Estas células da granulosa poderão contribuir para o nosso, ainda inadequado, conhecimento dos aspectos moleculares que envolvem o desenvolvimento de ovócitos com capacidade de originar embriões de melhor qualidade e consequentemente, dar origem a gravidez.

O estudo aqui apresentado veio definir um parâmetro importante nas células do *cumulus* que será o seu número médio num complexo *cumulus*-ovócito. Além da importância que poderá ter em termos clínicos de se saber que número de células do *cumulus* o ovócito possui à sua volta e qual a sua relação com o ovócito e com o embrião, foi importante definir

do ponto de vista prático a densidade destas células para, no futuro, se saber que tipo e quantidade de testes e técnicas se poderão utilizar. Assim, descrevemos pela primeira vez em humanos que um complexo *cumulus*-ovócito tem em média 17216 ± 24227 células do *cumulus*, com uma variação entre 167 e 245000 células do *cumulus*. Este valor é muito diferente dos dois encontrados na bibliografia, que apontam para uma média de 1400 ± 200 células do *cumulus* por complexo *cumulus*-ovócito em rato (Salustri *et al.*, 1989) e uma média de 1000 células do *cumulus* por folículo, em ratinho (Salustri *et al.*, 1990). Já em bovino, existe um estudo que afirma que um complexo *cumulus*-ovócito pode possuir em média 21000 ± 2000 células do *cumulus* (Hashimoto *et al.*, 1998). Pode-se concluir que a média de células do *cumulus* que rodeia o ovócito humano pode diferir muito de ovócito para ovócito (entre 167 e 245000). Estabelece-se também que a espécie humana tem em média 12 e 17 vezes mais células do *cumulus* num complexo *cumulus*-ovócito do que rato e ratinho, respectivamente. O bovino, do ponto de vista da densidade celular, será um modelo biológico mais adequado, dado o seu número médio de células do *cumulus* por ovócito (CC/ovócito) ser mais semelhante ao da espécie humana.

Dada a escassa informação acerca da densidade destas células, os dados sobre a sua relação com o estado de maturação e qualidade do ovócito são inexistentes. Contudo, foi-nos possível estabelecer que ovócitos em metafase II (MII) possuem mais células do *cumulus* (13667 ± 13791 CC/ovócito) do que ovócitos em metafase I (MI; 3750 ± 2872 CC/ovócito) e que estes últimos apresentam também uma tendência para apresentarem um menor número de células do *cumulus* do que o grupo dos degenerados e atrésicos (DEG + AT; 7636 ± 5002 CC/ovócito; $p= 0,05$). Apesar do grupo de ovócitos em MI estar representado apenas por quatro amostras de células do *cumulus*, estes dados poderão levar-nos a crer que à medida que o ovócito ganha maturidade, ou seja, que progride de MI para MII as suas células do *cumulus* dividem-se mais intensamente, formando uma matriz do *cumulus* não só mais expandida, devido à perda da comunicação entre as células do *cumulus* (Motta *et al.*, 1999),

mas também mais numerosa. Comprova-se assim que a escolha dos ovócitos para a técnica de FIV com base na expansão da matriz do *cumulus* (Veeck, 1990), tem lógica dado estar a escolher-se o ovócito com maior maturação. O facto das células do *cumulus* em complexos *cumulus*-ovócito com ovócitos em MII serem mais numerosos, é concordante com o descrito por Hashimoto *et al.* (1998) em que descrevem que a competência do desenvolvimento do ovócito é dependente da densidade das células do *cumulus* que o rodeiam. Sendo que o ovócito em MII é o que possui maior competência do desenvolvimento, é então de esperar que o número de células do *cumulus* seja aí o mais elevado. O facto do grupo DEG + AT apresentar mais células do *cumulus* do que os ovócitos em MI poderá dever-se ao facto de terem sido ovócitos que progrediram até à MII mas, por qualquer motivo, entraram em degeneração e/ou atresia. É importante ainda referir que devido à comunicação entre as células do *cumulus* e o ovócito ser bidireccional (Canipari, 2000), poderá ser o ovócito e o seu grau de maturação e qualidade que estarão a influenciar a densidade das células do *cumulus* que o circundam. Seria de esperar no entanto, que no *pool* de células do *cumulus* se verificasse que amostras com maior percentagem de ovócitos em MII apresentassem mais células do *cumulus*. Isto não acontece e poderá dever-se ao facto da constituição da amostra dos ovócitos poder ser muito heterogénea em termos de maturação.

O número de células do *cumulus* por ovócito calculado a partir do *pool* de células do *cumulus* não teve influência na taxa de fecundação dos ovócitos, na percentagem de embriões de grau 1 a que os ovócitos deram origem, na taxa de desenvolvimento embrionário, assim como, na taxa de gravidez. Apesar do número de células do *cumulus* por ovócito não prever se um dado ovócito tem ou não capacidade de ser fecundado ou se dará origem a gravidez, o número destas células por ovócito é maior em ovócitos que dão origem a embriões de grau 1 (14778 ± 10035 CC/ovócito) em relação aos que dão origem a embriões de grau 2 e 3 (4600 ± 4336 CC/ovócito). Este dado poderá justificar-se com o facto de uma maior matriz do *cumulus* poder providenciar um melhor meio de maturação para o ovócito (Hashimoto *et al.*, 1998) e,

deste modo, este ter maior competência do desenvolvimento e originar um embrião de melhor qualidade quando fecundado.

Conclui-se deste modo que a escolha de ovócitos com maior número de células do *cumulus* irá levar ao desenvolvimento de embriões de melhor qualidade. No entanto, será necessário aumentar o caso de números analisados para se poderem tirar conclusões mais definitivas e futuramente se poder seleccionar os melhores embriões tendo em conta o número de células do *cumulus* dos ovócitos que lhes deram origem. Em estudos futuros pretende-se aumentar o número de amostras de modo a perceber se estes embriões de melhor qualidade, originados a partir de ovócitos com uma grande densidade de células do *cumulus*, serão capazes de gerar maiores taxas de gravidez do que os embriões que se desenvolvem a partir de ovócitos com menos células do *cumulus*.

A progesterona desempenha um papel importante na reprodução feminina (Mulac-Jericevic e Conneely, 2004), sendo produzida no ovário e dependendo esta produção do nível de estimulação pelas gonadotropinas e do estado fisiológico do ovário (Peluso, 2006). A participação desta hormona esteróide no desenvolvimento folicular, na ovulação e luteinização encontra-se já descrita (Conneely *et al.*, 2002; Mulac-Jericevic e Conneely, 2004; Peluso, 2006; Teilmann *et al.*, 2006; Aparicio *et al.*, 2011). Foi possível estabelecer em várias espécies (rato, porco, bovino e humano) que as células do *cumulus* produzem progesterona e, inclusivamente, que esta produção é maior com a estimulação de FSH e LH (Shimada e Terada, 2002; Shimada *et al.*, 2004). Estas hormonas regulam e induzem (Hasegawa *et al.*, 2005), a par com a própria progesterona (Aparicio *et al.*, 2011), a expressão de receptores genómicos aos quais a hormona esteróide se liga. Neste trabalho e pela primeira vez em humanos, foram estudados três receptores de progesterona (um genómico e dois não genómicos) quanto à sua localização e expressão nas células do *cumulus*, na expectativa de puderem dar informações quanto à qualidade ovocitária.

Hasegawa *et al.* (2005) estudaram as células do *cumulus* humanas e focou-se no receptor genómico nPR-A/B, localizaram pela primeira vez a isoforma A maioritariamente no citoplasma e a isoforma B apenas no núcleo. Já o trabalho desenvolvido em bovinos de Aparicio *et al.* (2011) demonstra que as células do *cumulus* associados a ovócitos em MII exibem o nPR-A/B no citoplasma e nas projecções citoplasmáticas transzonais, não estando este receptor presente no núcleo. Em caninos este receptor localiza-se no núcleo das células, aumentando a intensidade da marcação para o receptor com o avançar do desenvolvimento folicular (Vermeirsch *et al.*, 2001). Outros trabalhos como o de Teilmann *et al.* (2006) em ratinho, não reconhecem a presença do receptor genómico de progesterona nas células do *cumulus*, localizando-o no entanto no núcleo e citoplasma das células murais da granulosa e nas células da teca. O nosso trabalho revela que o receptor genómico poderá localizar-se tanto no núcleo como no citoplasma das células do *cumulus*, podendo algumas células exibir fluorescência para o receptor apenas no núcleo e nunca se tendo verificado fluorescência apenas no citoplasma das células. Estes dados vão de encontro com os de Aparicio *et al.* (2011), que define a localização deste receptor no citoplasma. No entanto, não são concordantes com a ausência deste receptor no núcleo definida por estes autores. Por outro lado, a localização do nPR-A/B vai também de encontro com a localização encontrada no núcleo das células do *cumulus* de caninos (Vermeirsch *et al.*, 2001). A localização deste receptor nas células do *cumulus* na espécie humana parece diferir um pouco da localização do mesmo receptor em ratinho e bovino. Os dados apresentados estão de acordo com o único trabalho em humanos Hasegawa *et al.* (2005), que descreve esta proteína no citoplasma e no núcleo, no entanto, os anticorpos utilizados não nos permitem particularizar a localização de cada isoforma, como é feito por estes autores.

Relativamente ao receptor mPR β , este foi localizado na membrana plasmática de células do *cumulus* de suínos (Qiu *et al.*, 2008). Em bovinos, o mPR β encontra-se igualmente na membrana plasmática de uma forma heterogénea, apresentando algumas células marcação

para este receptor na área perinuclear (Aparicio *et al.*, 2011). Em células do *cumulus* humanas, o mPR β parece também estar localizado na membrana citoplasmática, encontrando-se este dado em concordância com os trabalhos de Qiu *et al.* (2008) e Aparicio *et al.* (2011). Este é o primeiro relato deste receptor em células do *cumulus* de humanos.

Se parece haver consenso para o mPR β , já a localização do PGRMC1 é um pouco contraditória consoante a espécie em estudo e o tipo celular. Assim, o artigo de Lösel *et al.* (2008) tenta clarificar o conhecimento sobre esta proteína em vários tipos celulares. Neste trabalho, refere-se que esta proteína está predominantemente localizada nas membranas intracelulares e que, em algumas células hepáticas, o PGRMC1 demonstra ter uma colocalização com o retículo endoplasmático em ratinho e suíno. Já outro trabalho descreve que o PGRMC1 pode ter uma localização na superfície extracelular da membrana plasmática em células da granulosa de ratinho (Peluso *et al.*, 2006), embora também se possa localizar no núcleo das células HeLa em humanos (Beausoleil *et al.*, 2004). Por exemplo, na linha celular do cancro do ovário Ovar-3 em humanos, o PGRMC1 está presente tanto no citoplasma como no núcleo, sendo a presença no núcleo dependente do estado de fosforilação do receptor (Beausoleil *et al.*, 2004). Nas células da granulosa de ratos a presença do PGRMC1 foi estudada e observou-se que este receptor aparece num número limitado de células e com localização no núcleo. Estes autores referem ainda que, após tratamento com a hormona gonadotrofina coriônica equina (eCG), para além da expressão do PGRMC1 aumentar, a sua localização altera-se e este receptor aparece quase exclusivamente perto ou em certas zonas da membrana plasmática (Peluso, 2006). No trabalho de Aparicio *et al.* (2011) o PGRMC1 está localizado no citoplasma de células do *cumulus* de bovino, mais precisamente, na região perinuclear. Nas células do *cumulus* humanas localizámos o PGRMC1 parece localizar-se no citoplasma, assim como, na membrana citoplasmática. Visto que não se verificou qualquer fluorescência no núcleo, podemos afirmar que o PGRMC1 não é um receptor nuclear nestas células em humanos. As nossas observações vão de encontro com a localização membranar

descrita por (Peluso *et al.*, 2006) assim como com a presença no citoplasma também verificada na linha celular do cancro do ovário Ovar-3 em humanos (Beausoleil *et al.*, 2004) e com a localização nas mesmas células em bovino (Aparicio *et al.*, 2011), sendo característico também nas nossas observações uma marcação para o receptor em forma de anel à volta do núcleo (marcação perinuclear). No entanto, os nossos resultados não são concordantes com a localização no núcleo das células da granulosa em rato (Peluso, 2006).

Quando feita uma comparação da expressão (em termos de percentagem de células marcadas) de cada receptor nas células do *cumulus* humanas, verificou-se que as células do *cumulus* apresentam uma maior percentagem de marcação para o receptor genómico nPR-A/B do que para o mPR β e não se tendo verificado diferenças em relação ao PGRMC1. O facto de as células apresentarem uma maior marcação para o receptor genómico poderá levar-nos a crer que nestas células a progesterona deverá actuar de uma forma mais lenta.

Por outro lado, avaliou-se a intensidade de fluorescência que é um parâmetro importante em citometria de fluxo e que nos dá informações adicionais. Assim, se tivermos duas amostras com a mesma percentagem de células marcadas para uma dada proteína mas se uma amostra tiver maior intensidade de fluorescência que a outra, significa que apesar de ambas terem o mesmo número de células a expressar a proteína, a que tem uma maior intensidade de fluorescência tem mais proteína por célula. A intensidade de fluorescência entre os três receptores não diferiu. Note-se, no entanto, que é preciso ter algum cuidado ao comparar estes resultados, os quais também se podem dever a ligações diferenciais anticorpo-antígeno. Seria por isso útil ter-se efectuado *Western Blot* ou reacção em cadeia de polimerase com transcriptase reversa quantitativo (qRT-PCR), contudo o número reduzido de amostras não nos permitiu.

Quando se comparou a percentagem de células marcadas para os três receptores em *pools* de células do *cumulus* com diferente percentagem de ovócitos em MII, verificou-se que quando as células do *cumulus* provêm de um pool de ovócitos com maior maturação ($\geq 76\%$ de

ovócitos em MII) têm uma maior percentagem de células marcadas para nPR-A/B do que para PGRMC1. Os grupos de células do *cumulus* provenientes de ovócitos com maturação intermédia (50%-75% de ovócitos em MII) e com menor maturação ($\leq 49\%$ de ovócitos em MII) possuem a mesma percentagem de células marcadas para os três receptores. A percentagem de células marcadas para nPR-A/B, mPR β e PGRMC1 não varia consoante o *pool* de ovócitos do qual as células do *cumulus* provêm. Em relação ao único estudo em que comparam também estes três receptores nas células do *cumulus*, mas desta vez em bovinos, os ovócitos em MII apresentam uma maior expressão de nPR-A/B e mPR β nas suas células do *cumulus* do que ovócitos em fase germinal (imaturos; Aparicio *et al.* 2011). Isto é, ovócitos com maior maturação expressam mais nPR-A/B e mPR β nas células do *cumulus* circundantes, o que não é concordante com os nossos dados, em que apenas há maior percentagem de células marcadas para nPR-A/B em relação a PGRMC1. Por outro lado, à medida que a maturação do ovócito aumenta, verificam também um decréscimo na expressão do PGRMC1 nas células do *cumulus* (Aparicio *et al.*, 2011), o que nós também não constatámos, verificando-se a percentagem de células marcadas para PGRMC1 igual nos três grupos de maturação dos ovócitos.

Em relação à intensidade de fluorescência, nas amostras de ovócitos com maior maturação as células do *cumulus* apresentaram uma menor intensidade de fluorescência para o PGRMC1 quando comparada com a de nPR-A/B e a de mPR β . Ou seja, há diferenças na percentagem de células marcadas e na intensidade de fluorescência entre o nPR-A/B e o PGRMC1 e há diferenças na intensidade de fluorescência entre o mPR β e o PGRMC1. Isto indica-nos que há uma menor percentagem de células marcadas para o PGRMC1 e que existe também em menor quantidade nas células comparativamente com o nPR-A/B e que apesar do número de células marcadas para o mPR β e para o PGRMC1 ser igual, o PGRMC1 parece existir em menor quantidade do que o mPR β dentro das células. Esta menor intensidade de fluorescência poderá ter uma relação com o descrito por Peluso (2006) em que o autor refere que este receptor aparece num número limitado de células da granulosa de rato. Esta

diminuição do PGRMC1 em células do *cumulus* de ovócitos com maior maturação é também explicada por Aparicio *et al.* (2011) como sendo característica da apoptose aumentada que se pode dar nas células do *cumulus* em ovócitos mais maduros, visto que está descrito um papel do PGRMC1 na mediação de efeitos anti-apoptóticos da progesterona. Contudo esta não deverá ser a justificação no nosso caso, visto que, como veremos mais adiante, as células do *cumulus* de ovócitos com diferentes qualidades de maturação possuem a mesma actividade de caspases 3 e 7, ou seja, os mesmos níveis de apoptose.

O mPR β , nas células do *cumulus* do *pool* de ovócitos com maior maturação, apresentou ainda uma maior intensidade de fluorescência que o mPR β das células do *cumulus* do *pool* de ovócitos com maturação intermédia, mas não diferindo a intensidade de fluorescência do receptor nas células do *cumulus* do *pool* de ovócitos com menor maturação. Isto significa que ovócitos com maior maturação e ovócitos com maturação intermédia, possuem a mesma percentagem de células do *cumulus* marcadas para o mPR β . Contudo, as amostras de células do *cumulus* provenientes de ovócitos com maturação intermédia parecem ter menor quantidade de mPR β no seu conteúdo. De acordo com Qiu *et al.* (2008), a concentração de RNA de mPR β aumenta significativamente após maturação *in vitro* dos complexos *cumulus*-ovócito, em suínos. Ora, se nos complexos *cumulus*-ovócito há um aumento do RNA do mPR β há medida que o complexo matura, então os nossos resultados parecem fazer sentido visto que no *pool* de ovócitos mais maduros a proteína está mais expressa. Seria de esperar que este dado também se reflectisse na percentagem de células marcadas, no entanto não ocorre possivelmente devido ao número de amostras ser baixo. Os grupos de células do *cumulus* provenientes de ovócitos com maturação intermédia e de ovócitos com menor maturação não revelaram mais diferenças na intensidade de fluorescência entre os receptores de progesterona. A intensidade de fluorescência do nPR-A/B não varia consoante o *pool* de ovócitos do qual as células do *cumulus* provêm, assim como a intensidade de fluorescência do PGRMC1.

Pode-se concluir que quando as células do *cumulus* provêm de *pools* de ovócitos com maior maturação, a percentagem de células marcadas e a intensidade de fluorescência não varia quando se comparam os receptores entre si (salvo a exceção do mPR β). Apenas quando as células do *cumulus* provêm de ovócitos com maior maturação, é que se verificam diferenças entre os três receptores, elucidando que a forma como a progesterona actua nestas células será dependente do estado do ovócito. Deste modo, ovócitos mais maduros têm uma maior dinâmica nos receptores de progesterona das suas células do *cumulus*.

No entanto, tanto a percentagem de células marcadas como a intensidade de fluorescência dos três receptores nas células do *cumulus* parece não ter influência na taxa de fecundação dos ovócitos, na percentagem de embriões de grau 1 a que os ovócitos deram origem, na taxa de desenvolvimento embrionário, assim como, na taxa de gravidez. O facto de a expressão de nPR-A/B não influenciar a percentagem de embriões de grau 1 não coincide com um trabalho publicado em 2005 que refere que a redução na expressão destes receptores nas células do *cumulus* está associada a uma boa qualidade embrionária, em humanos (Hasegawa *et al.*, 2005). Contudo, há certas tendências que levam a concluir que se o número de amostras for superior poderão observar-se diferenças nalgumas das taxas supracitadas.

A expansão da matriz do *cumulus* é essencial para a maturação citoplasmática do ovócito e é um processo acompanhado por modificações nas junções *gap* (Dell'Aquila *et al.*, 2004). Estas junções *gap* têm um papel essencial no desenvolvimento do ovócito, no entanto, não existe um conhecimento total sobre a regulação da principal conexina presente nestas junções nos complexos *cumulus*-ovócito, a conexina 43 (Cx43; Sasseville *et al.*, 2009).

Em estudos dos complexos *cumulus*-ovócito de ovelha em que analisaram esta conexina, localizaram-na através de imunohistoquímica entre o ovócito e as células do *cumulus* e entre as próprias células do *cumulus*. Mais precisamente, a marcação observava-se na membrana plasmática das células do *cumulus* de forma pontilhada (Pant *et al.*, 2005). A

localização desta proteína nas células do *cumulus* de ovelha é a mesma que em células do *cumulus* de humanos, onde através de imunocitoquímica localizámos esta conexina também na membrana plasmática de uma forma heterogénea/pontilhada.

No trabalho de Pant *et al.* (2005), verificaram ainda que a expressão de Cx43 tende a ser maior em complexos *cumulus*-ovócito imaturos do que em complexos maduros. Como já observado em roedores, o início da maturação meiótica é precedido pela desagregação das junções *gap* nos folículos ováricos (Larsen *et al.*, 1981), o que restringe a transferência de sinais das células do *cumulus* para o ovócito. Deste modo, seria de esperar precisamente o que Pant *et al.* (2005) observaram, ou seja, ovócitos mais imaturos que necessitam de maturar e ganhar competência do desenvolvimento requererem mais comunicações com as células do *cumulus* e deste modo, estas expressariam mais Cx43. Por outro lado, ovócitos mais maduros e prestes a resumir a meiose, passariam pela desagregação das suas junções *gap* e por isso teriam uma expressão mais baixa de Cx43. No nosso trabalho 48% das células do *cumulus* em média, expressavam Cx43, contudo, não conseguimos observar alterações consoante o estado de maturação do *pool* de ovócitos. No entanto, pensamos que se formos capazes de aumentar o número de amostras analisadas observar-se-ão diferenças na expressão de Cx43 células do *cumulus* consoante a maturação dos ovócitos.

Com base na literatura disponível não foi possível encontrar trabalhos anteriores que relacionassem a expressão da Cx43 com a taxa de fecundação dos ovócitos, com a percentagem de embriões de grau 1 a que os ovócitos deram origem ou com a taxa de desenvolvimento embrionário. No entanto, curiosamente, verificou-se neste estudo que mulheres que engravidaram possuíam mais células do *cumulus* marcadas para Cx43 do que mulheres que não engravidaram. Este resultado não seria o esperado, visto que, os ovócitos que dão origem a gravidez são, normalmente, os mais maduros e com maior competência do desenvolvimento. Assim sendo, esperar-se-ia que estes tivessem menor células do *cumulus* marcadas para Cx43 ao seu redor.

Encontra-se já descrito que folículos ováricos morfológicamente idênticos possuem níveis variados de apoptose tanto nas suas células do *cumulus*, como nas células murais da granulosa (Zeuner *et al.*, 2003). Deste modo, a caracterização desta apoptose diferencial nas células será de grande interesse, principalmente, se se conseguir estabelecer uma relação com o estado do ovócito. Assim, a par com a genómica e a proteómica, a apoptose tem sido um parâmetro muito estudado nas células do *cumulus* nos últimos anos (Lee *et al.*, 2001; Mikkelsen *et al.*, 2001; Raman *et al.*, 2001; Høst *et al.*, 2002; Moffatt *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Corn *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Abu-Hassan *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006; Hussein *et al.*, 2005; Zeuner *et al.*, 2003).

No estudo por nós efectuado comparámos a actividade das caspases-3/7 nas células do *cumulus*, tanto provenientes de um único ovócito como de *pools* de ovócitos. Globalmente, nas células do *cumulus* isoladas de um único ovócito, foi possível estabelecer que quanto maior for a actividade destas caspases, menor é a densidade das células do *cumulus* por ovócito e que quando o ovócito possui muitas células do *cumulus* ao seu redor, a actividade das caspases é mais baixa. Deste modo, o processo de morte celular programada parece interferir com a divisão das células, fazendo com que o complexo *cumulus*-ovócito seja menos numeroso em termos de células do *cumulus*. Ou poderá também estar a acontecer o contrário, ou seja, poucas células do *cumulus* fazerem com que haja uma maior incidência de apoptose e uma densidade alta destas células fazer com que a incidência de apoptose seja menor. Este é o primeiro relato de uma associação entre a densidade das células do *cumulus* e a apoptose.

Juntando esta correlação com os primeiros resultados deste estudo relativos à densidade de células do *cumulus*, em que ovócitos em MII estão associados a mais células do *cumulus* do que ovócitos em MI seria de esperar que este dado também se reflectisse em termos de actividade de caspases. Ou seja, que células do *cumulus* associadas a ovócitos em MII, que apresentam uma maior densidade de células do *cumulus*, tivessem menor actividade de caspases do que as de ovócitos em MI. Assim como seria de esperar que o grupo dos DEG +

AT apresentasse uma tendência para ter uma menor apoptose nas células do *cumulus* circundantes que as células do *cumulus* que rodeiam os ovócitos em MI. No entanto, isto não acontece, apresentando todos os grupos a mesma actividade de caspases. Estes dados vão de encontro com dados publicados em humanos em que ovócitos maduros possuem a mesma incidência de apoptose nas suas células do *cumulus* que ovócitos imaturos (Moffatt *et al.*, 2002). Em contraste com estes resultados, Høst *et al.* (2002) e Corn *et al.* (2005) descreveram que existem maiores níveis de apoptose nas células do *cumulus* provenientes de ovócitos em MI e VG (imaturos) e também em complexos apenas com células do *cumulus* (em que o ovócito degenerou), quando comparados com células do *cumulus* provenientes de ovócitos em MII. Quando se procedeu ao mesmo estudo em células do *cumulus* provenientes de pools de ovócitos com diferentes percentagens de ovócitos em MII ($\geq 76\%$ e 50%-75% de ovócitos em MII), constatou-se novamente que os diferentes grupos possuem a mesma actividade de caspases.

A taxa de fecundação e a sua relação com a apoptose nas células do *cumulus* foi um parâmetro estudado por Raman *et al.* (2001), em que revelou que após ICSI, os ovócitos que fertilizaram possuíam uma maior fragmentação de ADN nas suas células do *cumulus* (Raman *et al.*, 2001). E assim, este estudo relacionou positivamente a taxa de fertilização com a apoptose nestas células, sendo o único estudo que o faz. Os autores justificam que as células do *cumulus* apoptóticas serão um sinal de que o ovócito possui competência do desenvolvimento e estará apto a ser fertilizado (Raman *et al.*, 2001). Contrariamente a este trabalho, surge outro em 2002 que indica que a apoptose nas células do *cumulus* compromete a fecundação de ovócitos em MII após ICSI (Høst *et al.*, 2002). Em 2006, outro estudo relata não existir qualquer relação entre os níveis de apoptose nas células do *cumulus* e a taxa de fertilização do ovócito (Abu-Hassan *et al.*, 2006). Este último trabalho encontra-se em coerência com os nossos resultados (quer queo as células do *cumulus* foram analisadas individualmente ou em *pools*).

Em relação à qualidade embrionária, trabalhos já publicados indicam existir uma correlação negativa com a apoptose nas células do *cumulus*, ou seja, embriões de melhor qualidade estão associados a uma incidência de apoptose mais baixa nas células do *cumulus* do que embriões de pior qualidade (Lee *et al.*, 2001). Encontra-se já descrito também que um maior número de células do *cumulus* apoptóticas prejudica o desenvolvimento do blastocisto e a sua qualidade (Corn *et al.*, 2005). Quando analisámos as células do *cumulus* pertencentes a um só ovócito, observámos que células germinais que originam embriões de pior qualidade (grau 3) têm mais caspases activas nas células do *cumulus* em seu redor, do que ovócitos que originam embriões de melhor qualidade (grau 1), o que é concordante com os dois estudos acima referidos. Apesar deste resultado ser estatisticamente significativo, o facto de apenas existirem duas amostras analisadas de células do *cumulus* que rodeavam ovócitos que originaram embriões de grau 3, não nos assegura a solidez deste resultado. Contudo, os resultados obtidos indicam que a apoptose nas células do *cumulus* deverá ter uma influência na qualidade do embrião desenvolvido a partir do ovócito em estudo. Assim, poderá haver uma transferência de sinais apoptóticos entre as células do *cumulus* e o ovócito que condicione o desenvolvimento nuclear e citoplasmático do ovócito e, deste modo, comprometa a qualidade do embrião resultante. No entanto, outros trabalhos indicam não existir qualquer relação entre a apoptose e a qualidade embrionária (Høst *et al.*, 2002; Abu-Hassan *et al.*, 2006).

Apesar de influenciar a qualidade embrionária, a apoptose nas células do *cumulus* não foi relacionada com a taxa de gravidez, o que coincide também com os resultados do estudo elaborado por Raman *et al.* (2001).

Nos estudos já publicados verifica-se uma maior incidência de apoptose nas células do *cumulus* a partir de uma certa idade nas mulheres. Apesar de Lee *et al.* (2001) afirmarem que este aumento de morte celular programada se verifica a partir dos 40 anos, outros afirmam que é a partir dos 38 anos (Moffatt *et al.*, 2002) e outros ainda a partir dos 35 anos (Corn *et al.*,

2005). Tal como em Raman *et al.* (2001), os nossos dados não indicam qualquer influência da idade da paciente na apoptose das células do *cumulus*.

Deste modo pode-se concluir que a apoptose nas células do *cumulus*, não depende do estado de maturação dos ovócitos, nem da idade da paciente. A apoptose nas células do *cumulus* também não influencia a taxa de fecundação, a taxa de desenvolvimento embrionário e a taxa de gravidez. Interessantemente, os embriões de melhor qualidade parecem desenvolver-se de ovócitos com menor incidência de apoptose nas células do *cumulus* circundantes. Contudo será necessário aumentar o número de amostras analisadas, para se poder ter dados mais sólidos quanto a esta relação.

A idade da paciente parece não ter influência em nenhum dos parâmetros estudados nas células do *cumulus*.



Capítulo V: Conclusões

Seleccção de Ovócitos para as Técnicas de Reprodução Assistida com base no estudo das Células do *Cumulus*

Globalmente, os resultados obtidos permitem-nos concluir que o *pool* de ovócitos de uma dada mulher aquando da punção folicular é muito heterogéneo. Esta heterogeneidade não se reflecte apenas em termos de maturação das células germinais mas também em termos dos parâmetros medidos neste trabalho, que irão influenciar o estado do embrião, assim como a ocorrência, ou não, de gravidez.

Assim, o presente trabalho permitiu estabelecer que em média existem 17216 ± 24227 células do *cumulus* a rodear um ovócito humano e que a densidade das células do *cumulus* é dependente do grau de maturação do ovócito, apresentando os ovócitos em metafase II mais células do *cumulus* que os ovócitos em metafase I e estes menos células que os ovócitos atresícos e degenerados. Foi possível determinar também que ovócitos que dão origem a embriões de melhor qualidade são aqueles cujas células do *cumulus* circundantes existem num número mais elevado, e parece haver uma tendência para estes ovócitos possuírem menor incidência de apoptose. O estudo efectuado permitiu-nos também determinar que os ovócitos mais maduros apresentam diferenças na expressão dos receptores de progesterona nas suas células do *cumulus*, expressando estas mais o receptor genómico nPR-A/B do que o não genómico PGRMC1. A gravidez da paciente parece estar relacionada com uma maior expressão de conexina 43 nas células do *cumulus* que circundam os ovócitos.

Futuramente, quando um maior número de amostras for analisado e estes parâmetros forem mais solidamente definidos, poderá tentar fazer-se a escolha dos ovócitos e embriões nas clínicas de procriação medicamente assistida, através do estudo do número de células do *cumulus* por ovócito, dos receptores de progesterona, da conexina 43 ou da apoptose nas células do *cumulus*. Em Portugal podem-se fecundar todos os ovócitos obtidos da punção folicular, contudo os resultados aqui apresentados poderão ser úteis na abordagem da escolha do embrião, visto só se poderem transferir para o útero dois embriões e em casos excepcionais e bem justificados, três.

O maior problema deste trabalho foi o reduzido número de células disponível para estudo, situação também descrita por vários autores. Assim, na continuidade deste trabalho, pretende-se aumentar o número de amostras analisadas em todos os testes efectuados. Por outro lado, com os resultados apresentados, é claro que o estudo do *pool* de células do *cumulus* não é tão produtivo nem garante resultados tão fidedignos quanto o estudo das células do *cumulus* que circundam apenas um ovócito. Deste modo, um objectivo futuro será a optimização de testes para o estudo das células do *cumulus* por ovócito. Um objectivo mais concreto será também a correlação dos dados dos receptores de progesterona nas células do *cumulus* com o protocolo hormonal a que a paciente foi submetida. Assim como acompanhar o estudo da apoptose com outros testes (teste da anexina V, por exemplo) de modo a assegurar a detecção de diferentes aspectos e fases deste fenómeno celular. Será de grande interesse relacionar a apoptose com o potencial de membrana mitocondrial, e de modo a completar o estudo deste parâmetro metabólico analisar também a quantidade de ATP existente nestas células.

Em conclusão, através dos resultados obtidos ainda há um longo caminho a percorrer e muito a estudar nestas células para se poder estabelecer totalmente a relação das células do *cumulus* com o ovócito. Contudo, pode-se concluir que estas células têm um grande potencial como biomarcadores da qualidade do ovócito, assim como, do embrião. Poderão tornar-se em bons indicadores de qualidade do ovócito ou do embrião, a utilizar nas clínicas de procriação medicamente assistida rotineiramente ou apenas em casos específicos em que a causa da infertilidade é desconhecida ou está relacionada com problemas a nível da maturação dos ovócitos ou da ovulação. Idealmente, espera-se que o estudo e análise das células do *cumulus* levem a um aumento nas taxas de gravidez, aumentando o sucesso das técnicas de reprodução assistida.



Capítulo VI: Bibliografia

Seleção de Ovócitos para as Técnicas de Reprodução Assistida com base no estudo das Células do *Cumulus*

Abu-Hassan D., Koester F., Shoepfer B., Schultze-Mosgau A., Asimakopoulos B., Diedrich K., Al-Hasani S. (2006). Comet assay of *cumulus* cells and spermatozoa DNA status, and the relationship to oocyte fertilization and embryo quality following ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* 12:447–452.

Ackert C.L. Gittens J.E., O'Brien M.J., Eppig J.J., Kidder G.M. (2001). Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Developmental Biology* 233:258–70.

Albertini D. e Anderson E. (1974). The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. *The Journal of Cell Biology* 63:234–50.

Albertini D.F., Combelles C.M.H., Benecchi E., Carabatsos M.J. (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121:647–653.

Almeida V., Sousa A.P., Plancha C., Leal F., Figueiredo H., Silva J. (2012). Classificação da Qualidade Embrionária. In *Orientações Técnicas em Medicina da Reprodução*. Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução. Lisboa. 119–139.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine e ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* 26(6): 1270-83.

Anderson E. e Albertini D. (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *The Journal of Cell Biology* 71:680–686.

Anderson R.A., Sciorio R., Kinnell H., Bayne R.A.L., Thong K.J., Sousa P.A. de, Pickering S. (2009). *Cumulus* gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. *Reproduction* 138:629–37.

Aparicio I.M., Garcia-Herreros M., O'Shea L.C., Hensey C., Lonergan P., Fair T. (2011). Expression, Regulation, and Function of Progesterone Receptors in Bovine *Cumulus* Oocyte Complexes During In Vitro Maturation. *Biology of Reproduction* 921:910–921.

Assidi M., Montag M., Van der Ven K., Sirard M.-A. (2011). Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in *cumulus* cells before ICSI: a preliminary study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 28:173–88.

Assou S., Haouzi D., Mahmoud K., Aouacheria A., Guillemin Y., Pantesco V., Rème T., Dechaud H., De Vos J., Hamamah S. (2008). A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human *cumulus* cells: a proof of concept study. *Molecular Human Reproduction* 14:711–9.

Assou S., Haouzi D., De Vos J., Hamamah S. (2010). Human *cumulus* cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Molecular Human Reproduction* 16:531–8.

Ball G., Leibfried M., Lenz R., et al. (1983). Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reproduction* 28:717–25.

- Beausoleil S.A., Jedrychowski M., Schwartz D., Elias J.E., Villen J., Li J., Al E. (2004). Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:12130–5.
- Bedford J.M. (1999). The implications of unusual sperm: female relationships in mammals. In *The Male Gamete: from Basic Science to Clinical Applications*. C. Gagnon, editor. Cache River Press, Vienna. 81–92.
- Biggers J.D., Whittingham D.G., Donahue R.P. (1967). The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 58:560–567.
- Bornslaeger E.A. e Schultz R.M. (1985). Regulation of Mouse Oocyte Maturation : Effect of Elevating *Cumulus* Cell cAMP on Oocyte cAMP Levels. *Biology of Reproduction* 33:698–704.
- Bronson R.A., Peresleni T., Golightly M. (1999). Progesterone promotes the acrosome reaction in capacitated human spermatozoa as judged by flow cytometry and CD46 staining. *Molecular Human Reproduction* 5:507–512.
- Buccione R., Schroeder A.C., Eppig J.J. (1990). Interactions between Somatic Cells and Germ Cells throughout Mammalian Oogenesis. *Biology of Reproduction* 43:543–547.
- Cahill M.A. (2007). Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 105:16–36.
- Canipari R. (2000). Oocyte-granulosa cell interactions. *Human Reproduction Update* 6:279–89.
- Carrell D.T., Middleton R.G., Peterson C.M., Jones K.P., Urry R.L. (1993). Role of the *cumulus* in the selection of morphologically normal sperm and induction of the acrosome reaction during human in vitro fertilization. *Archives of Andrology* 31:133–137.
- Cates W., Farley T.M., Rowe P.J. (1985). Worldwide patterns of infertility: is Africa different? *The Lancet* 2:596–598.
- Cillo F., Brevini T.A.L., Antonini S., Paffoni A., Ragni G., Gandolfi F. (2007). Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some *cumulus* genes. *Reproduction* 134:645– 650.
- Conneely O.M., Mulac-Jericevic B., DeMayo F., Lydon J.P., O'Malley B.W. (2002). Reproductive Functions of Progesterone Receptors. *The Endocrine Society* 339–355.
- Corn C.M., Hauser-Kronberger C., Moser M., Tews G., Ebner T. (2005). Predictive value of *cumulus* cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. *Fertility and Sterility* 84:627–33.
- Dekel N., Lawrence T., Gilula N., Beers W. (1981). Modulation of cell-to-cell communication in the *cumulus*–oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Developmental Biology* 80:356–362.
- Dell'Aquila M.E., Caillaud M., Maritato F., Martoriati A., Gérard N., Aiudi G., Minoia P., Goudet G. (2004). *Cumulus* expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH

receptor mRNA expression in equine *cumulus*-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. *Reproductive Biology and Endocrinology* doi: 10.1186/1477-7827-2-44.

Dell'Aquila M.E., De Felici M., Massari S., Maritato F., Minoia P. (1999). Effects of fetuin on zona pelucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro. *Biology of Reproduction* 61:533–544.

Dong J., Albertini D.F., Nishimori K., Kumar T.R., Lu N., Matzuk M.M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:531–535.

Downs S.M. e Eppig J.J. (1986). The role of purines in the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* 11:463–469.

Dragovic R.A., Ritter L.J., Schulz S.J., Amato F., Thompson D.T., Armstrong J. G., Gilchrist R.B. (2007). Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse *cumulus* cell expansion. *Biology of Reproduction* 76:848–857.

Dressing G.E., Goldberg J.E., Charles N.J., Schwertfeger K.L., Lange C.A. (2011). Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: A review of regulation and physiological implications. *Steroids* 76:11–17.

Ducibella T., Kurasawa S., Rangarajan S., Kopf G.S., Schultz R.M. (1990). Precocious of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation in correlation with an egg induced modification of the zona pellucida. *Developmental Biology* 137:46–55.

Ebner T., Moser M., Sommergruber M., Tews G. (2003). Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Human Reproduction Update* 9:251–262.

Eisenbach, M. (1999). Sperm chemotaxis. *Rev Reprod* 4:56–66.

Elder K. e Dale B. (2003). In vitro fertilization. Segunda Edição. Cambridge University Press, Cambridge.

Elvin J.A., Clark A.T., Wang P., Wolfman N.M., Matzuk M.M. (1999). Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology* 13:1035–1048.

Eppig J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829–838.

Eppig J.J., Wigglesworth K., Pendola F., Hirao Y. (1997). Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction* 56:976–984.

Erickson G.F. (1995). The ovary: Basic principles and concepts. In *Endocrinology and Metabolism*. Feling P., Baxter J.D., Frohman L., editores. McGraw-Hill, New York.

Faddy M.J., Gosden R.G., Gougeon A., Richardson S.J., Nelson J.F. (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human Reproduction* 7:1342–1346.

Fatehi A.N., Roelen B.A., Colenbrander B. *et al.* (2005). Presence of *cumulus* cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote* 13:177–185.

Fernandes M., Pierron V., Michalovich D., Astle S., Thornton S., Peltoketo H., Lam E.W.-F., Gellersen B., Huhtaniemi I., Allen J., Brosens J. (2005). Regulated expression of putative membrane progesterin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *Journal of Endocrinology* 187:89–101.

Feuerstein P., Cadoret V., Dalbies-Tran R., Guerif F., Bidault R., Royere D. (2007). Gene expression in human *cumulus* cells: one approach to oocyte competence. *Human Reproduction* 22:3069–3077.

Fox S. (2004). *Human Physiology*. Oitava Edição. McGraw-Hill, New York.

Galeati G., Modena S., Lauria A., Mateoli M. (1991). Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution. *Molecular Reproduction and Development* 29:40–46.

Galloway S.M., McNatty K.P., Cambridge L.M., Laitinen M.P., Juengel J.L., Jokiranta T.S., McLaren R.J., Luiro K., Dodds K.G., Montgomery G.W., *et al.* (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage sensitive manner. *Nature* 25:279–283.

Gardner D.K., Lane M., Calderon I., Leeton J. (1996). Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of *cumulus* cells. *Fertility and Sterility* 65:349–353.

Gershon E., Plaks V., Dekel N. (2008). Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 282:18–25.

Gilbert S.F. (2006). *Developmental Biology*. Oitava Edição. Editora Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.

Gilula N.B., Epstein M.L., Beers W.H. (1978). Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the *cumulus*-oocyte complex. *The Journal of Cell Biology* 78:58–75.

Goodenough D.A., Goliger J.S., Paul D.L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual Review of Biochemistry* 65:475–502.

Grivicich I., Regner A., Rocha A.B. (2007). Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* 53:335–343.

Halpin D.M., Charlton H.M., Faddy M.J. (1986). Effects of gonadotrophin deficiency on follicular development in hypogonadal (hpg) mice. *Reproduction* 78:119–125.

- Hamel M., Dufort I., Robert C., Gravel C., Leveille M.-C., Leader A., Sirard M.-A. (2008). Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Human Reproduction* 23:1118–27.
- Han Z.-B., Lan G.-C., Wu Y.-G., Han D., Feng W.-G., Wang J.-Z., Tan J.-H. (2006). Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, *cumulus*-oocyte complex morphology, and *cumulus* expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction* 132:749–58.
- Hasegawa J., Yanaihara A., Iwasaki S., Otsuka Y., Negishi M., Akahane T., Okai T. (2005). Reduction of progesterone receptor expression in human *cumulus* cells at the time of oocyte collection during IVF is associated with good embryo quality. *Human Reproduction* 20:2194–2200.
- Hashimoto S., Saeki K., Nagao Y., Minami N., Yamada M., Utsumi K. (1998). Effects of *cumulus* cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 49:1451–1463.
- Hillier S.G. (1994). Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human Reproduction* 9:188–191.
- Hirshfield A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology* 124:43–101.
- Huang Z. e Wells. D. (2010). The human oocyte and *cumulus* cells relationship: new insights from the *cumulus* cell transcriptome. *Molecular Human Reproduction* 16:715–25.
- Hussein T.S., Froiland D.A., Amato F., Thompson J.G., Gilchrist R.B. (2005). Oocytes prevent *cumulus* cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science* 118:5257–68.
- Høst E., Gabrielsen A., Lindenberg S., Smidt-Jensen S. (2002). Apoptosis in human *cumulus* cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 77:511–5.
- Høst E., Mikkelsen A.L., Lindenberg S., Smidt-Jensen S. (2000). Apoptosis in human *cumulus* cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 79:936–940.
- Ikeda S., Imai H., Yamada M. (2003). Apoptosis in *cumulus* cells during in vitro maturation of bovine *cumulus*-enclosed oocytes. *Reproduction* 125:369–76.
- Ito M., Smith T.T., Yanagimachi R. (1991). Effect of ovulation on sperm transport in the hamster oviduct. *Journal of Reproduction & Fertility* 93:157–163.
- Jacobsen B.M. e Horwitz B. (2011). Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology* 10.1016/j.mce.2011.09.016.

Jamnongjit M. e Hammes S. (2005). Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Seminars in Reproductive Medicine* 23:234–41.

Junqueira L.C. e Carneiro J. (2004). *Histologia Básica*. Décima Edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.

Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26:239–257.

Kidder G.M. e Mhawi A.A. (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 123:613–620.

Krietsch T., Fernandes M.S., Kero J., Lösel R., Heyens M., Lam E.W.-F., Huhtaniemi I., Brosens J.J., Gellersen B. (2006). Human homologs of the putative G protein-coupled membrane progesterin receptors (mPR α , β , and γ) localize to the endoplasmic reticulum and are not activated by progesterone. *Molecular Endocrinology* 20:3146–64.

Krisher R.L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science* 82:14–23.

Larsen W.J., Tung H.N., Polking C. (1981). Response of Granulosa Cell Gap Junctions to Human Chorionic Gonadotropin (hCG) at Ovulation. *Biology of Reproduction* 25:1119–1134.

Lavin M. e Watters D. (1993). *Programmed Cell Death: The Cellular and Molecular Biology of Apoptosis*. Harwood Academic Publishers GmbH, Amsterdam.

Lee K.S., Joo B.S., Na Y.J., Yoon M.S., Choi O.H., Kim W.W. (2001). *Cumulus* cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 18:490–8.

Lee M.-S., Liu C.-H., Lee T.-H., Wu H.-M., Huang C.-C., Huang L.-S., Chen C.-M., Cheng E.-H. (2010). Association of creatin kinase B and peroxiredoxin 2 expression with age and embryo quality in *cumulus* cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 27:629–39.

Li R., Norman R.J., Armstrong D.T., Gilchrist R.B. (2000). Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and *cumulus* cells. *Biology of Reproduction* 63:839–45.

Lopes S. (2008). (In)fertilidade Feminina Humana: Novas Técnicas para avaliar a qualidade ovocitária. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Luciano A., Corbani D., Lodde V., Tessaro I., Franciosi F., Peluso J.J., Modena S. (2011). Expression of progesterone receptor membrane component-1 in bovine reproductive system during estrous cycle. *European Journal of Histochemistry* 55:145–150.

Luciano A.M., Lodde V., Franciosi F., Cecilian F., Peluso J.J. (2010). Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. *Reproduction* 140:663–72.

Lucidi P., Bernabò N., Turriani M., Barboni B., Mattioli M. (2003). *Cumulus* cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. *Reproductive Biology and Endocrinology* doi: 10.1186/1477-7827-1-45.

Lösel R.M., Besong D., Peluso J.J., Wehling M. (2008). Progesterone receptor membrane component 1-many tasks for a versatile protein. *Steroids* 73:929–34.

Mahi-Brown C.A. e Yanagimachi R. (1983). Parameters influencing ovum pick-up by the oviductal fimbria in the golden hamster. *Gamete Research* 8:1–10.

Malter H.E. e Cohen J. (2002). Intracytoplasmic sperm injection: technical aspects. In *Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction*. Vayena, R.P. editor. World Health Organization. 134–139.

Mascotti K., Mccullough J., Burger S.R. (2000). HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion* 40:693–696.

Mattioli M. (1994) Transduction mechanisms for gonadotrophin induced oocyte maturation in mammals. *Zygote* 2:347–349.

McGee E.A., Hsu Y. S., Kaipia A., Hsueh A.J. (1998). Cell death and survival during ovarian follicle development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 140:15–18.

McKenzie L.J., Pangas S.A., Carson S.A., Kovanci E., Cisneros P., Buster J.E., Amato P., Matzuk M.M. (2004). Human *cumulus* granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Human Reproduction* 19:2869–74.

Mehlmann L.M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130:791–9.

Meyers S.A. e Rosenberger A.E. (1999). A plasma membrane associates hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biology of Reproduction* 61:444–451.

Mikkelsen A.L., Høst E., Lindenberg S. (2001). Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature human follicles. *Reproduction* 122:481–6.

Moffatt O., Drury S., Tomlinson M., Afnan M., Sakkas D. (2002). The apoptotic profile of human *cumulus* cells changes with patient age and after exposure to sperm but not in relation to oocyte maturity. *Fertility and Sterility* 77:1006–11.

Motta P.M., Nottola S.A., Famuiari G., Macchiarelli G., Correr S., Makabe S. (1999). Structure and function of the human oocyte-*cumulus*-corona cell complex before and after ovulation. *Protoplasma* 206:270–277.

Mulac-Jericevic B. e Conneely O.M. (2004). Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128:139–46.

Nakahara K., Saito H., Saito T., Ito M., Ohta N., Takahashi T., Hiroi M. (1997). The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. *Fertility and Sterility* 68:312–7.

Nogueira D., Ron-El R., Friedler S., Schachter M., Raziel A., Cortvrindt R., Smits J. (2006). Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biology of Reproduction* 74:177–84.

Quandaogo Z.G., Haouzi D., Assou S., Dechaud H., Kadoch I.J., De Vos J., Hamamah S. (2011). Human *Cumulus* Cells Molecular Signature in Relation to Oocyte Nuclear Maturity Stage. *PLoS One* 6:e27179–e27179. doi: 10.1371/journal.pone.0027179

O'Brien M., Moravec R., Riss T. (2003). Caspase-Glo™ 3/7 Assay: Use Fewer Cells and Spend Less Time With This Homogeneous Assay. *Cell Notes* 6:13–15.

Pant D., Reynolds L.P., Luther J.S., Borowicz P.P., Stenbak T.M., Bilski J.J., Weigl R.M., Lopes F., Petry K., Johnson M.L., Redmer D.A., Grazul-Bilska A.T. (2005). Expression of connexin 43 and gap junctional intercellular communication in the *cumulus*-oocyte complex in sheep. *Reproduction* 129:191–200.

Pellati D., Mylonakis I., Bertoloni G., Fiore C., Andrisani A., Ambrosini G., Armanini D. (2008). Genital tract infections and infertility. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 140:3–11.

Peluso J.J. (2006). Minireview: Multiplicity of Progesterone's Actions and Receptors in the Mammalian Ovary. *Biology of Reproduction* 75:2–8.

Peluso J.J., Liu X., Gawkowska A., Johnston-MacAnanny E. (2009). Progesterone activates a progesterone receptor membrane component 1-dependent mechanism that promotes human granulosa/luteal cell survival but not progesterone secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94:2644–9.

Peluso J.J., Pappalardo A., Losel R., Wehling M. (2006). Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology* 147:3133–40.

Peluso J.J., Romak J., Liu X. (2008). Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 Mutations. *Endocrinology* 149:534–43.

Perez G.I. e Tilly J.L. (1997). *Cumulus* cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Human Reproduction* 12:2781–3.

Qiu H.B., Lu S.S., Ji K.L., Song X.M., Lu Y.Q., Zhang M., Lu K.H. (2008). Membrane progesterin receptor beta (mPR-beta): a protein related to *cumulus* expansion that is involved in in vitro maturation of pig *cumulus*-oocyte complexes. *Steroids* 73:1416–23.

Ramalho-Santos J., Amaral A., Brito R., Freitas M., Almeida Santos T. (2004). Simultaneous analysis of cytoskeletal patterns and chromosome positioning in human fertilization failures. *Fertility and Sterility* 82:1654–1659.

Raman R.S., Chan P.J., Corselli J.U., Patton W.C., Jacobson J.D., Chan S.R., King A. (2001). Comet assay of *cumulus* cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 16:831–5.

Regassa A., Rings F., Hoelker M., Cinar U., Tholen E., Looft C., Schellander K., Tesfaye D. (2011). Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion *cumulus* cells. *BioMed Central Genomics* 12. doi: 10.1186/1471-2164-12-57.

Rienzi L., Vajta G., Ubaldi F. (2011). Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Human Reproduction Update* 17:34–45.

Russell D.L. e Robker R.L. (2007). Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the *cumulus* complex. *Human Reproduction Update* 13:289–312.

Salustri A., Yanagishita M., Hascall V.C. (1989). Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse *cumulus* cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *The Journal of Biological Chemistry* 264:13840–7.

Salustri A., Ulisse S., Yanagishita M., Hasall V. (1990). Hyaluronic Acid Synthesis by Mural Granulosa Cells and *Cumulus* Cells in Vitro Is Selectively Stimulated by a Factor Produced by Oocytes and by Transforming Growth Factor-Beta. *The Journal of Biological Chemistry* 265:19517–19523.

Sambade C. (2005). A Morte Celular por Apoptose. In *Biologia Celular e Molecular*. Azevedo, C. Quarta Edição. Lidel- edições técnicas, lda., Lisboa. 553–571.

Sasseville M., Gagnon M.-C., Guillemette C., Sullivan R., Gilchrist R.B., Richard F.J. (2009). Regulation of gap junctions in porcine *cumulus*-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Molecular Endocrinology* 23:700–10.

Shimada M. e Terada T. (2002). FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in *cumulus* cells : a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. *Molecular Human Reproduction* 8:612–618.

Shimada M., Yamashita Y., Ito J., Okazaki T., Kawahata K., Nishibori M. (2004). Expression of two progesterone receptor isoforms in *cumulus* cells and their roles during meiotic resumption of porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology* 33:209–225.

Simoncini T., Mannella P., Fornari L., Caruso A., Varone G., Genazzani A.R. (2004). Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69:537–42.

Skakkebaek N.E., Jørgensen N., Main K.M., Rajpert-De Meyts E., Leffers H., Andersson A.-M., Juul A., Carlsen E., Mortensen G.K., Jensen T.K., Toppari J. (2006). Is human fecundity declining? *International Journal of Andrology* 29:2–11.

Van Soom A., Tanghe S., De Pauw I., Maes D., de Kruif A. (2002). Function of the *cumulus* oophorus before and during mammalian fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* 37:144–51.

Sorensen R.A. e Wassarman P.M. (1976). Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology* 50:531–536.

Staigmiller R.B. e Moor R.M. (1984). Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocyte matured outside the follicle. *Gamete Research* 9:221–229.

Suarez S.S. (1988). The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanism of formation. *Biology of Reproduction* 58:1105–1107.

Sutton M.L., Gilchrist R.B., Thompson J.G. (2003). 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* 9:35–48.

Tanghe S., Van Soom A., Mehrzad J., Maes D., Duchateau L., de Kruif A. (2003). *Cumulus* contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology* 60:135–149.

Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., de Kruif A. (2002). Functions of the *cumulus* oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 61:414–24.

Teilmann S.C., Clement C.A., Thorup J., Byskov A.G. (2006). Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. *Journal of Endocrinology* 191:525–535.

Tesarik J. (1990). Biology of human fertilization: the general and the special. In From ovulation to implantation. J.L.H. Evers e M.J. Heinemen, editors. Elsevier Inc., Amsterdam. 263–282.

Thomas F.H. e Vanderhyden B.C. (2006). Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:19.

Thomas R.E., Thompson J.G., Armstrong D.T., Gilchrist R.B. (2004). Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. *Biology of Reproduction* 71:1142–9.

Thompson J.G., Lane M., Gilchrist R.B. (2007). Metabolism of the bovine *cumulus*-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Society for Reproduction and Fertility Supplement* 64:179–190.

Valdimarsson G., De Sousa P.A., Kidder G.M. (1993). Coexpression of gap junction proteins in the *cumulus*-oocyte complex. *Molecular Reproduction and Development* 36:7–15.

Vanderhyden B.C. e Armstrong D.T. (1989). Role of *cumulus* cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biology of Reproduction* 40:720–8.

Vanderhyden B.C., Macdonald E.A., Nagyova E., Dhawan A. (2003). Evaluation of members of the TGFbeta superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse *cumulus* expansion and steroidogenesis. *Reprod Suppl* 61:55–70.

Veeck L.L. (1990). The morphological assessment of human oocytes and early concepti. In *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. Keel B.A. e Webster B.W., editores. CRC Press, Boston.

Vermeirsch H., Simoens P., Coryn M., Van Den Broeck W. (2001). Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reproduction* 122:73–83.

Wassarman P.M. (1988). The Mammalian Ovum. In *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. e Neill J., editores. Raven Press, New York.

World Health Organization (2012). <http://www.who.int/en/> (acedido a 30/05/2012).

Wu Y., Wu J., Lee D.Y., Al. E. (2005). Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Matrix Biology* 24:3–13.

Xia P. (1997). Intracytoplasmic sperm injection : correlation of oocyte grade based on polar body , perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Human Reproduction* 12:1750–1755.

Yoshino O., McMahon H.E., Sharma S., Shimasaki S. (2006). A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:10678–10683.

Yuan W. e Giudice L.C. (1997). Apoptosis in *cumulus* cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 31:3148–3155.

Yuan Y.Q., Van Soom A., Leroy J.L.M.R., Dewulf J., Van Zeveren A., de Kruif A., Peelman L.J. (2005). Apoptosis in *cumulus* cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 63:2147–63.

Zeuner A., Müller K., Reguszynski K., Jewgenow K. (2003). Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology* 59:1421–33.

Zhu Y., Bond J., Thomas P. (2003). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:2237–42.