

## Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos

*Applicability of molecular biology techniques to the understanding of early mammalian folliculogenesis*

A.P. Almeida<sup>1,3</sup>, J.J.H. Celestino<sup>1</sup>, M.V.A. Saraiva<sup>1</sup>, J.R.V. Silva<sup>2</sup>, J.R. Figueiredo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA) - Universidade Estadual do Ceará (UECE), 60740-000, Fortaleza, CE, Brasil

<sup>2</sup>Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), Universidade Federal do Ceará (UFC), 62041-040, Sobral, CE, Brasil

<sup>3</sup>Correspondência: anderson\_almeida@click21.com.br

### Resumo

A elucidação do processo de foliculogênese é necessária para um melhor aproveitamento do potencial biológico do ovário, uma vez que 99,9% dos folículos ovarianos são eliminados através do processo de atresia. Assim, para melhor compreender a função dos diferentes hormônios e fatores de crescimento que atuam na regulação da fisiologia ovariana, torna-se necessário associar as técnicas de cultivo *in vitro* à quantificação e à identificação do local de produção de cada substância envolvida nas diferentes etapas do desenvolvimento folicular. Nesse contexto, o emprego de técnicas de biologia molecular é fundamental para esclarecer as complexas relações entre os inúmeros fatores que interagem durante o crescimento e desenvolvimento folicular e, dessa forma, permitir uma compreensão maior da foliculogênese mamífera. Tais técnicas detectam, localizam ou identificam os ácidos nucléicos (hibridização *in situ*, Southern e Northern Blotting) ou as proteínas (Western Blotting), podem efetuar a quantificação do DNA (PCR) ou do RNA (RT-PCR), permitem a quantificação da expressão do RNAm mesmo em uma mistura complexa de RNA total (ensaios de proteção de ribonuclease) ou possibilitam a análise da expressão de milhares de genes simultaneamente (microarranjos de DNA).

**Palavras-chave:** folículos ovarianos, expressão de ácidos nucleicos e proteínas, MOIFOPA, ovário mamífero.

### Abstract

*The elucidation of the folliculogenesis is needed to better use of the ovary biologic potential, since 99.9% of ovarian follicles are eliminated through atresia process. Thus, for a better understanding of the role of various hormones and growth factors that act in the regulation of ovarian physiology, it is necessary to associate the *in vitro* culture techniques with quantification and identification of local production of each substance involved in various stages of follicular development. Therefore, molecular biology techniques can be used to determine the expression of genes encoding ligands and receptors involved in folliculogenesis. In this context, the use of molecular biology techniques is essential to clarify the complex relationships between the numerous factors that interact during growth and follicular development and thus enable a greater understanding of mammalian folliculogenesis. Such techniques detect, locate or identify the nucleic acids (*in situ* hybridization, Southern and Northern blotting) or protein (Western Blotting), can perform the quantification of DNA (PCR) or RNA (RT-PCR), allow the quantification of mRNA expression even in a complex mixture of total RNA (ribonuclease protection assays) or enable the expression analysis of thousands of genes simultaneously (DNA microarrays).*

**Keywords:** expression of nucleic acids and proteins, mammalian ovary, MOEPF, ovarian follicles.

### Introdução

O ovário mamífero contém milhares de folículos pré-antrais, encontrando-se a grande maioria desses folículos no estádio primordial ou quiescente. Estes folículos permanecem em repouso até que eles sejam ativados, ou seja, até que deixem o grupo de reserva e entrem em fase de crescimento. Uma vez ativados, a grande maioria deles degenera-se pelo processo fisiológico conhecido como atresia e poucos se desenvolvem até a maturação, que é precedida por um processo de proliferação e diferenciação celular (Carroll et al., 1990). O início do crescimento do folículo primordial é essencial para a reprodução da fêmea, no entanto os mecanismos reguladores deste processo ainda são pouco conhecidos (Park et al., 2005).

O crescimento folicular é um processo complexo regulado por diversos fatores intra e extraovarianos, tais como fatores de crescimento e outros hormônios da esfera reprodutiva (Richards, 2001; Fortune, 2003). Além disso, sabe-se que os fatores de sinalização que permeiam entre o oócito e as células da granulosa/teca circundantes são tidos como essenciais à indução e à regulação da diferenciação dos compartimentos foliculares do estádio pré-antral para o estádio antral e, assim, para o desenvolvimento de um oócito que será competente para fertilização

e subsequente embriogênese (Van den Hurk et al., 2000; Eppig, 2001; Matzuk et al., 2002).

A elucidação dos mecanismos que regulam a foliculogênese inicial é o pré-requisito básico para o uso de folículos pré-antrais no melhoramento da eficiência reprodutiva de animais de interesse zootécnico ou ameaçados de extinção, bem como de humanos com problemas de fertilidade (Fortune, 2003). Na tentativa de melhor compreender o papel dos diferentes hormônios e fatores de crescimento envolvidos no controle da foliculogênese e da atresia, nas últimas décadas têm sido desenvolvidos vários modelos de estudo. Dentre estes, destaca-se o estudo da expressão de genes que codificam para ligantes e/ou receptores de substâncias chave da foliculogênese utilizando técnicas de biologia molecular (Eppig et al., 2002; Chand et al., 2006; Mazerbourg e Hsueh, 2006).

Nesta revisão, serão abordados aspectos gerais relacionados à foliculogênese, bem como às principais técnicas de biologia molecular que têm sido empregadas com a finalidade de melhor compreender o processo de foliculogênese inicial ovariana, a saber: *Southern*, *Northern* e *Western Blotting*; reação de cadeia de polimerase (PCR) e reação de transcriptase reversa de cadeia de polimerase (RT-PCR); hibridização *in situ*; microarranjos de DNA; e ensaios de proteção de ribonuclease (EPR). Estas técnicas foram escolhidas pela sua relevância, quer seja por sua maior difusão, empregabilidade e características dos resultados obtidos, ou por sua inovação no estudo da foliculogênese.

### Foliculogênese

Aos processos de formação, crescimento e maturação folicular dá-se o nome de foliculogênese, que tem início com a formação do folículo primordial, culminando com a formação do folículo pré-ovulatório (Van den Hurk e Zhao, 2005). Segundo o estádio de desenvolvimento, os folículos podem ser divididos em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários, abrangendo os folículos primordiais, primários e secundários e b) folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários e de De Graaf ou pré-ovulatórios (Hulshof et al., 1994). A foliculogênese pode ser dividida em duas fases: 1) Fase pré-antral, subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários; 2) Fase antral, subdividida nas fases de crescimento inicial e terminal dos folículos terciários (Figueiredo et al., 2008).

O ovário mamífero possui uma reserva de folículos quiescentes, os folículos primordiais. Em algumas espécies, como, por exemplo, os roedores, a formação do reservatório de folículos primordiais acontece próximo ao nascimento (Hirshfield, 1991), enquanto em outras espécies, como primatas e animais domésticos, a formação dos folículos ocorre durante a vida fetal (Russe, 1983; Van Wervel e Rodgers, 1996). Independentemente de quando ocorra a formação dos folículos primordiais, a saída destes do estádio de quiescência para o de desenvolvimento é um processo gradual (Fortune et al., 1998). A duração da foliculogênese em ovinos e bovinos é de aproximadamente quatro a seis meses, sendo, no entanto, mais curta em suínos (Campbell et al., 2003; Hunter et al., 2004).

A transição de folículos primordiais para o grupo de folículos em desenvolvimento é um processo fundamental na fisiologia ovariana, uma vez que determina a fertilidade feminina. Morfologicamente, os folículos primordiais consistem de uma única camada de células achatadas da pré-granulosa envolvendo o ócito. Apesar de uma grande quantidade de folículos primordiais estar presente no ovário, a maioria deles, cerca de 99,9%, não chega até a ovulação, mas sofre um processo degenerativo e/ou apoptótico conhecido por atresia, fazendo com que o ovário seja um órgão de baixíssima produtividade. Em função desse elevado índice, a atresia folicular e os fatores que influenciam este processo têm sido extensivamente estudados, havendo comprovação de que muitos hormônios e fatores de crescimento estão envolvidos. Durante o início do desenvolvimento de folículos primordiais, recentes estudos têm demonstrado que fatores de crescimento, como, por exemplo, o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), a proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4) e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) são extremamente importantes para a manutenção da viabilidade destes folículos (Reynaud e Driancourt, 2000; Markstrom et al., 2002; Nilsson e Skinner, 2003).

Além disso, vários fatores de crescimento agem localmente no ovário na transição de folículo primordial para primário, entre eles o *kit ligand* (Parrott e Skinner, 1999), o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF; Nilsson et al., 2001), o fator inibidor de leucemia (LIF; Nilsson et al., 2002) e a proteína morfogenética do osso 15 (BMP-15; Otsuka et al., 2000).

Quando os folículos primordiais são ativados para o grupo de folículos em desenvolvimento, as células achatadas da pré-granulosa se tornam cuboides, caracterizando, assim, os folículos primários. A proliferação das células da granulosa dos folículos primários leva ao desenvolvimento de duas ou mais camadas dessas células ao redor do ócito, formando os folículos secundários. Quando duas a três camadas de células da granulosa são formadas, as células da teca podem ser visualizadas em torno da membrana basal em ovelhas (Scaramuzzi et al., 1993), podendo também já ser identificada a zona pelúcida em bovinos (Figueiredo et al., 1995). Os fatores locais que agem na transição de folículos primários para secundários são: GDF-9 em camundonga (Dong et al., 1996), BMP-15 em ovelha (Galloway et al., 2000), FGFb em vaca (Vernon e Spicer, 1994), Fator de

Crescimento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) em camundonga (Liu et al., 1999) e EGF em vaca (Wandji et al., 1996).

Somando-se ao exposto, diversos componentes locais já foram identificados como possíveis promotores do crescimento de folículos secundários, entre eles: a ativina-A em ratas (Zhao et al., 2001) e ovelhas (Thomas et al., 2003), Hormônio do Crescimento (GH) em ratas (Liu et al., 1998), TGF- $\beta$  em camundongas (Liu et al., 1999), EGF e IGF-I em vacas (Gutierrez et al., 2000), FGFb em vacas (Wandji et al., 1996), GDF-9 em camundongas (Hayashi et al., 1999) e BMP-15 em ovelhas (Juengel et al., 2002). Também há as gonadotrofinas como FSH em vacas (Gutierrez et al., 2000) e LH em camundongas (Wu et al., 2000).

Com o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, entre as camadas de células da granulosa, denominada antro. O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteroides secretados pelas células da granulosa (Barnett et al., 2006). O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado pelas fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (Van den Hurk e Zhao, 2005), sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como para a manutenção da fertilidade (Drummond, 2006).

Diante da complexidade e dos vários fatores que parecem estar envolvidos no desenvolvimento folicular durante toda a foliculogênese, numerosos estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias no cultivo *in vitro* (Buratini Jr et al., 2005), bem como estudar a expressão de genes durante todo o processo de foliculogênese (Bao e Garverick, 1998).

Os componentes do complexo oócito-células da granulosa/teca têm sido alvo de muitas manipulações ao longo dos anos, na tentativa de aumentar os suprimentos de oócitos competentes à fertilização *in vitro*. No modelo bovino, embora o sucesso da maturação nuclear (MIV) e da fertilização *in vitro* (FIV) seja elevado (80%), apenas aproximadamente 30% dos oócitos se desenvolvem até o estádio de blastocisto (Rizos et al., 2002). A qualidade intrínseca do oócito é um fator fundamental determinante da proporção de oócitos que se desenvolvem ao estádio de blastocisto (Sirard e Blondin, 1996; Rizos et al., 2002). Oócitos maturados *in vivo* são mais competentes que os maturados *in vitro* (Van de Leemput et al., 1999; Rizos et al., 2002).

O uso de oócitos provenientes de folículos pré-antrais em técnicas reprodutivas poderia oferecer novas possibilidades para a propagação de animais de interesse zootécnico ou em vias de extinção. Porém, a primeira limitação é a recuperação de grandes números de folículos pré-antrais saudáveis do ovário (Lucci et al., 1999). Nesse contexto, o desenvolvimento de biotécnicas que possibilitem o aumento das taxas de recuperação de folículos pré-antrais é de grande interesse para o aumento das taxas de maturação *in vitro* desses folículos.

### Contribuição da MOIFOPA para os estudos de biologia molecular

A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) é uma biotécnica da reprodução que vem sendo aprimorada nos últimos tempos e consiste numa das principais ferramentas utilizadas atualmente para a elucidação da foliculogênese inicial. Tal biotécnica tem como principal objetivo resgatar oócitos oriundos de folículos pré-antrais, a partir do ambiente ovariano, e posteriormente cultivá-los *in vitro* até a maturação, prevenindo-os da atresia e possibilitando sua utilização em outras biotécnicas, como fertilização *in vitro* (FIV), transgênese e clonagem. Para alcançar esse objetivo, é necessário o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* ideal para cada etapa do desenvolvimento folicular.

A elucidação dos mecanismos que regulam a foliculogênese inicial é o pré-requisito básico para o uso de folículos pré-antrais no melhoramento da eficiência reprodutiva em animais domésticos, em humanos com problemas de fertilidade e em espécies ameaçadas de extinção (Fortune, 2003). Dessa forma, com o objetivo de evitar a enorme perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, nas últimas décadas têm sido desenvolvidos vários modelos os quais possibilitam o estudo dos fatores que controlam a foliculogênese e a atresia. Dentre os métodos empregados, aqueles que relacionam a expressão de genes codificadores para esses fatores por meio de técnicas de biologia molecular têm sido largamente utilizados.

Oócitos inclusos em folículos primordiais formam uma grande fonte de gametas que permanecem quiescentes até que sejam estimulados para crescer (Erickson, 1986). Em cada ciclo, um determinado número destes folículos é ativado para entrar na fase de crescimento, caracterizada tanto pela proliferação de células da granulosa como pelo aumento em tamanho do oócito (Gougeon, 2003). Porém, durante o crescimento *in vivo*, a maioria destes folículos gradualmente se torna atresica. No ovário, há um maior número de folículos antrais iniciais do que em fases de crescimento mais avançadas. O grande estoque destes pequenos folículos cria uma fonte potencial de oócitos para a produção *in vitro* de embriões, o que permitiria uma melhor utilização do potencial reprodutivo feminino (Alm et al., 2006).

Além da produção *in vitro* de embriões, a grande quantidade de pequenos folículos que pode ser obtida do ovário fornece material precioso para estudos de expressão de genes relacionados aos fatores de crescimento e/ou aos hormônios que atuem no processo de foliculogênese. Para tanto, foi demonstrado que um número grande de folículos pré-antrais pode ser isolado de ovários bovinos (Figueiredo et al., 1993) e caprinos (Rodrigues et al., 1998) utilizando-se cortador de tecido (*tissue chopper*) ajustado para realização de cortes

seriados a intervalos de 50,0 µm. Nesse contexto, o isolamento das diferentes categorias foliculares possibilita a avaliação dos níveis de expressão gênica em cada uma dessas categorias, refletindo as mudanças que ocorrem *in vivo* durante a foliculogênese, ou *in vitro* ao longo de cultivos de folículos isolados.

O desenvolvimento de um sistema que permita o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais para a obtenção de óócitos aptos a serem maturados e fecundados *in vitro* seria de grande importância tanto para a compreensão da foliculogênese na fase inicial quanto para a preservação em longo prazo de células germinativas femininas (Mao et al., 2002). Além disso, o cultivo folicular permite a avaliação da resposta folicular, em termos de expressão gênica, aos fatores de crescimento e hormônios adicionados ao meio de cultivo. Além do exposto, outro aspecto importante a ser avaliado no que diz respeito aos folículos pré-antrais ovarianos é o efeito da criopreservação sobre a expressão de genes relacionados à foliculogênese.

### Técnicas de biologia molecular

Aliadas à biotécnica de MOIFOPA, técnicas de biologia molecular vêm sendo empregadas e desenvolvidas na tentativa de melhor compreender o processo de foliculogênese ovariana, especialmente na fase inicial. Com os avanços tecnológicos nas últimas décadas, possibilitou-se o aparecimento de um novo ramo da ciência, a biotecnologia, que transformou e revolucionou a investigação científica. Métodos engenhosos de isolamento, análise e manipulação dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e de proteínas permitiram avanços no conhecimento dos processos biológicos de inúmeras doenças humanas e de metodologias terapêuticas (Freeman e Gioia, 1999).

A análise da expressão gênica tem adquirido importância em muitos campos de pesquisa biológica. O conhecimento acerca dos padrões de expressão dos genes deve fornecer um melhor entendimento dos complexos sistemas regulatórios e irá, provavelmente, levar à identificação de genes relevantes para novos processos biológicos ou implicados em doenças. Existem cinco principais métodos que são de uso comum para a quantificação da transcrição: *Northern Blotting* e hibridização *in situ* (Parker e Barnes, 1999), ensaios de proteção de ribonuclease (EPR; Hod, 1992; Saccomanno et al., 1992), transcrição reversa da reação de cadeia da polimerase (RT-PCR; Weis et al., 1992) e microarranjos. Estes métodos têm sua utilização limitada devido ao elevado custo (Bucher, 1999).

Dois desses métodos desenvolvidos para mensurar os transcritos têm adquirido muita popularidade e são frequentemente aplicados. A técnica de microarranjos permite a análise em paralelo de milhares de genes em duas populações de RNA marcados (Schena et al., 1995), enquanto o RT-PCR em tempo real fornece a mensuração simultânea da expressão gênica em diferentes amostras para um número limitado de genes, e é especialmente desejável quando apenas um pequeno número de células está disponível (Higuchi et al., 1993; Heid et al., 1996; Fink et al., 1998). Ambas as técnicas têm a vantagem da velocidade e do alto grau de automação potencial quando comparadas a métodos tradicionais de quantificação, como as análises de *Northern blot*, hibridização *in situ* e ensaio de proteção de ribonuclease.

No que diz respeito ao estudo da foliculogênese, as técnicas de biologia molecular, aplicadas isoladamente ou em associação, podem fornecer dados essenciais para fundamentar a base do conhecimento sobre a expressão de RNAm tanto de ligantes quanto de receptores associados aos processos por meio das técnicas de RT-PCR, *Northern blot*, hibridização *in situ* e ensaio de proteção de ribonuclease. Para identificação da presença de sequências específicas nos diversos tipos celulares presentes nos folículos, podem ser utilizadas técnicas como *Southern blot* e PCR. A expressão de proteínas pode ser avaliada por meio do *Western blot*, enquanto a presença de milhares de genes simultaneamente em células foliculares pode ser mensurada por meio da técnica de microarranjos de DNA.

A localização de proteínas, RNAm e seus receptores auxilia a compreensão do papel de cada hormônio e fator de crescimento em cada fase do desenvolvimento folicular, uma vez que possibilita identificar a localização e o quanto cada uma das substâncias presentes no ovário estão sendo produzidas. Muitas atuações das células foliculares ovarianas relacionadas à sobrevivência, ao crescimento e à diferenciação são refletidas na alteração dos padrões da expressão gênica. Desta forma, a capacidade de quantificar os níveis de transcrição de genes específicos é fundamental para qualquer investigação das funções foliculares (Zamorano et al., 1997). Neste contexto, a biologia molecular destaca-se como modelo importante para o estudo da foliculogênese. Seu conjunto de técnicas fundamenta-se principalmente no estudo das interações entre os vários mecanismos celulares, partindo da relação entre o DNA, o RNA e a síntese de proteínas, bem como o modo como essas interações são reguladas.

#### Hibridização *in situ*

Hibridização *in situ* é um método de localização e detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos (DNA e RNA) de secções de tecidos preservados ou preparados de células por meio da hibridização de uma banda complementar de uma sonda específica de nucleotídeo (DNA ou RNA) da sequência de interesse (Cox et al., 1984; Mattei et al., 1985). As sondas são sequências de nucleotídeos complementares desenvolvidas

a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA que se deseja identificar. Para permitir a visualização da reação entre as moléculas de DNA ou RNA em um estudo, as sondas podem ser associadas a moléculas radioativas, fluorescentes ou biotiniladas (Nakamura, 1990).

A hibridização *in situ*, apesar de ser um método complexo, permite uma localização de transcrições de células específicas dentro de um tecido (Melton et al., 1984). Os princípios básicos para a hibridização *in situ* são os mesmos para DNA ou RNA, variando quanto ao tipo de células e tecidos que se pretende estudar, os quais requerem sondas adequadas para detectar sequências nucleotídicas específicas dentro das células e dos tecidos. A sensibilidade da técnica é tal que o limiar dos níveis de detecção estão na região de 10/20 cópias de RNAm por célula, ou seja, é capaz de detectar ácidos nucleicos mesmo em quantidades muito pequenas (Nakamura, 1990).

Um fator importante a ser considerado é o tipo de sonda utilizada e qual a melhor forma de marcá-la para dar o melhor nível de resolução com o mais alto rigor. Algumas dessas escolhas são dependentes do tipo de análise que se deseja, do tipo de instalações disponíveis e como se deseja avaliar os resultados, ou seja, de forma qualitativa ou quantitativa (Lawrence e Singer, 1985). Os principais tipos de sondas empregadas são de oligonucleotídeos, DNA de fita simples ou dupla e de RNA (Nakamura, 1990). A técnica de detecção empregada deve estar de acordo com a maneira como a sonda foi marcada, podendo ser por filme ou emulsão fotográfica.

Hampton et al. (2004), utilizando a hibridização *in situ* para estudar a expressão de receptores de andrógenos em ovários bovinos, verificaram que, em folículos primordiais, não foi detectada a sua presença, sendo esses receptores, no entanto, identificados em células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais. Dentre os folículos antrais, os receptores para andrógenos são expressos exclusivamente nas células da granulosa de pequenos folículos e tanto nas células da granulosa quanto nas células da teca de grandes folículos.

Para testar a hipótese de que o óvulo comanda o desenvolvimento folicular, Eppig et al. (2002), trabalhando com ovários de camundongos, transferiram óvulos isolados de folículos secundários para folículos primordiais. Por meio da hibridização *in situ* para o RNAm para o receptor de LH, verificaram que os folículos primordiais que receberam os óvulos de folículos secundários tiveram suas taxas de crescimento e diferenciação dobradas, demonstrando que o óvulo coordena o desenvolvimento folicular e que a taxa de desenvolvimento folicular está relacionada intimamente com o desenvolvimento oocitário.

#### *Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) e Reação de Transcriptase Reversa de Cadeia de Polimerase (RT-PCR)*

O advento da biologia molecular foi certamente um dos maiores passos das ciências biológicas durante o século XX. A descoberta da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) trouxe enormes benefícios e desenvolvimento científico, como, por exemplo, o sequenciamento de genomas, a expressão de genes em sistemas recombinantes, o estudo de genética molecular, a determinação rápida da paternidade e o diagnóstico rápido de doenças infecciosas.

Esta técnica permite amplificar um segmento específico de uma molécula de DNA usando dois *primers* ou iniciadores (sequências curtas de nucleotídeos) complementares às extremidades do segmento que se quer amplificar e uma DNA polimerase. Na reação, a molécula de DNA é inicialmente desnaturada pelo aumento de temperatura: as fitas se separam. A temperatura é, então, diminuída, permitindo que cada *primer* pareie ou hibridize com sua sequência complementar presente nas extremidades do segmento a ser copiado. A DNA polimerase sintetiza a seguir o trecho de fita complementar a cada uma das fitas originais a partir do *primer*. O ciclo de desnaturação, hibridização e extensão se repete muitas vezes, resultando em milhares de cópias do segmento desejado. É importante observar que o conjunto de *primers* escolhido é o responsável pela definição do segmento de DNA que vai ser amplificado. Outros fatores influenciam a especificidade da reação, como a temperatura de pareamento, a concentração de magnésio, o conteúdo de bases C e G do *primer*, entre outros (Andrade et al., 2001).

A técnica denominada RT-PCR permite amplificar os trechos codificantes diretamente a partir de moléculas de RNAm. Após a extração do RNA, sintetiza-se uma fita única de DNA complementar ao RNAm (DNAc) empregando-se a enzima transcriptase reversa de origem viral. A fita de RNA do híbrido RNA/DNA é digerida com RNase, e a fita de DNAc é replicada por uma DNA polimerase. A partir do DNAc, emprega-se o método de PCR usual para amplificação (Silva e Andrade, 2001).

A RT-PCR é um método *in vitro* utilizado para amplificar enzimaticamente determinadas sequências de RNA (Rappolee et al., 1988), sendo a técnica mais sensível para a detecção e quantificação de RNAm atualmente disponível. Comparada com as outras duas técnicas comumente usadas para quantificar RNAm, análise de *Northern blot* e ensaio de proteção de RNase, a RT-PCR pode ser utilizada para a quantificação de RNAm em amostras muito menores. De fato, esta técnica é sensível o suficiente para permitir a quantificação aproximada de RNA a partir de uma única célula. É o mais sensível e mais flexível método de quantificação (Wang e Brown, 1999) e pode ser usado para comparar quantidades de RNAm em diferentes populações de amostras, para caracterizar os padrões de expressão de RNAm, para discriminá-lo entre RNAm estreitamente relacionados e para analisar a estrutura do RNA (Bustin, 2000). RT-PCR também pode contornar etapas demoradas e de grande exigência técnica e geração de reagentes, tais como inserções da cadeia completa de

DNA complementar (DNAc) para clonagem (Borson et al., 1992).

Ultimamente, uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada PCR em tempo real, vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de obter resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida em relação à PCR que, apresenta somente resultados qualitativos (Novais et al., 2004).

O advento do PCR e RT-PCR em tempo real mudou drasticamente o campo da mensuração da expressão gênica. Atualmente, a técnica mais utilizada para quantificar a expressão de RNAm é a RT-PCR em tempo real (Kreuzer e Massey, 2002). O PCR em tempo real é uma técnica de coleta de dados durante a reação de PCR, assim combina amplificação e quantificação em uma mesma etapa. Isso foi alcançado utilizando-se uma variedade de produtos químicos fluorescentes que correlacionam a concentração do produto do PCR com a intensidade da fluorescência (Higuchi et al., 1993). As reações são caracterizadas por um momento na reação (ou ciclo do PCR) em que a amplificação-alvo é inicialmente detectada. Esse valor é usualmente referido como *cycle threshold* (Ct), que vem a ser o momento em que a intensidade da fluorescência é maior que a fluorescência basal (*background*). Consequentemente, quanto maior a quantidade de DNA-alvo no material inicial, mais rápido e significante será o aumento do sinal que irá aparecer, identificando um menor Ct (Heid et al., 1996).

Em resumo, o sistema da PCR em tempo real baseia-se na detecção e quantificação de um fluoróforo (Lee et al., 1993; Livak, 1995). Este sinal aumenta em proporção direta à quantidade de produto da PCR em uma reação. Por meio do registro da quantidade de emissão de fluorescência a cada ciclo, é possível acompanhar a reação de PCR durante a fase exponencial, em que o primeiro aumento significativo da quantidade de produto PCR se correlaciona com a quantidade inicial da sequência-alvo. Quanto maior o número inicial de cópias do ácido nucleico-alvo, mais cedo será observado um aumento significativo na fluorescência.

A PCR em tempo real determina a quantidade inicial de um ácido nucleico de maneira mais específica, sensível e com maior reprodutibilidade, sendo, então, preferível em relação a outras formas de PCR semi-quantitativo, as quais detectam a quantidade de produto final amplificado ao fim do processo (Freeman et al., 1999; Raeymaekers, 2000). A reação de RT-PCR em tempo real, uma variante da RT-PCR convencional, permite uma análise precisa da quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica. Esse método utiliza um sistema fluorescente em plataforma, capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação de um determinado gene no momento real da amplificação (Bustin, 2002).

Em estudos utilizando as técnicas de PCR e suas variações, a hipótese de que o óvulo é uma força motriz do desenvolvimento além da fase de folículo primário foi conhecida (De la Fuente e Eppig, 2001). Esta premissa é centrada nas ações do fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), um membro específico da família dos fatores de crescimento transformante  $\beta$ . O GDF-9 parece estar relacionado intimamente aos fatores reguladores ovarianos, tais como BMPs (Vitt et al., 2002), e, em ratos, o padrão de expressão do GDF-9 é coincidente com o de BMP-15 (Dube et al., 1998). A expressão do RNAm do GDF-9 foi descoberta nos folículos primários de camundongos, ratos e humanos (McGrath et al., 1995; Aaltonen et al., 1999; Hayashi et al., 1999; Jaatinen et al., 1999) e em estádios de folículos primordiais e subsequentes em bovinos e ovinos (Bodensteiner et al., 1999). A infertilidade em ratas fêmeas deficientes de GDF-9 é resultado do atraso do desenvolvimento folicular na fase de folículo primário, uma vez que, embora os óvulos em ratas sem o GDF-9 cresçam de forma acelerada, seus folículos não se desenvolvem além da fase primária (Dong et al., 1996). Este bloqueio é coincidente com o início da expressão do GDF-9 e BMP-15, onde ambos são detectados em óvulos de folículos primários até o estádio de folículo pré-ovulatório. Enquanto ratos continuam expressando BMP-15, este parece ser incapaz de promover o crescimento oocitário, talvez indicando uma ação combinada dos dois, ou duas funções biológicas distintas. O GDF-9 também pode agir para promover progressão do folículo pela estimulação da expressão de *kit ligand* nas células da granulosa. Porém, a relação entre o GDF-9 e o *kit ligand* parece ser regulada de forma bastante complexa, muito embora Elvin et al. (1999) tenham informado a existência de aumento na expressão do gene do *kit ligand* em folículos de ratos sem GDF-9.

Silva et al. (2004) identificaram, por meio da técnica de RT-PCR, a presença de RNAm para ativina (sub-unidade  $\beta$ A), folistatina e receptores de ativina (ActR-IA, -IB, IIA e IIB) em todos as categorias foliculares presentes no ovário caprino, com exceção da ActR-IIB, que não foi encontrada em folículos pré-antrais. A mesma equipe, também utilizando o RT-PCR, verificou que o RNAm do *kit ligand* foi encontrado em todos os estádios de desenvolvimento folicular (primordial, primário, secundário, pequenos e grandes folículos antrais), bem como nos corpos lúteos e superfície epitelial e medular do ovário. Além disso, o RNAm para seu receptor (c-Kit) foi encontrado em todos os compartimentos celulares de folículos antrais (Silva et al., 2006b). Também na espécie caprina, foi identificado o RNAm para EGF em todas as categorias foliculares e na superfície do epitélio ovariano. Em folículos antrais, o RNAm para EGF foi encontrado no óvulo e células do *cumulus oophorus*, teca e granulosa murais. O RNAm para o receptor para EGF (EGF-R) foi identificado em todos os compartimentos foliculares em todas as categorias, ainda em corpos lúteos e superfície do epitélio ovariano, mostrando a importância desse fator de crescimento para o processo de foliculogênese (Silva et al., 2006a).

### Técnicas de Blotting (Transferência de DNA, RNA ou proteínas)

Identificar e mensurar proteínas específicas em misturas biológicas complexas, como sangue, tem sido um dos principais objetivos nas práticas científicas e de diagnóstico. As técnicas de *Blotting* são utilizadas para identificar proteínas únicas ou sequências de ácidos nucleicos. Elas foram desenvolvidas para serem altamente específicas e sensíveis e se tornaram ferramentas importantes tanto em biologia molecular quanto em investigação clínica (Bittner et al., 1980).

Os métodos de *Blotting* são bastante simples e, geralmente, consistem em quatro fases distintas: iniciam com a separação por eletroforese de proteínas ou de fragmentos de ácidos nucleicos da amostra; sendo posteriormente realizada a transferência e imobilização das moléculas-alvo em um suporte de papel; em seguida, estas moléculas-alvo se ligam a sondas analíticas, permitindo a visualização das proteínas ou de fragmentos de ácidos nucleicos (Hayes et al., 1989).

As moléculas da amostra são inicialmente separadas por eletroforese e, então, transferidas para diferentes tipos de anteparos ou membranas de fácil manipulação (Tab. 1).

Tabela 1. Anteparos utilizados para fixação das moléculas-alvo em técnicas de *Blotting* e suas principais aplicações.

Anteparo de suporte	Macromoléculas ligantes
Papel de nitrocelulose	DNA, RNA e proteínas
Papel de diazofenil	DNA, RNA e proteínas
Folhas de <i>nylon</i> com carga modificada	Proteínas
Membrana de polivinilideno difluorido	Proteínas
Fibra de vidro	
Aminopropil	Proteínas
Amônio quaternário	Proteínas
Fenilenodiisotiocianato	Proteínas

Fonte: Adaptado de Hayes et al., 1989.

Isso imobiliza os fragmentos de DNA ou as proteínas e proporciona uma réplica fiel da separação original, o que facilita a posterior análise bioquímica. Após a transferência para o anteparo, as proteínas ou os fragmentos de ácidos nucleicos imobilizados são localizados por meio de sondas, tais como anticorpos, RNA ou DNA, que se ligam especificamente à molécula de interesse. Finalmente, a posição da sonda que está ligada à molécula de interesse é visualizada, geralmente por autoradiografia (Hahn, 1983).

As três principais técnicas de *Blotting* que foram desenvolvidas são comumente chamadas de *Southern*, *Northern* e *Western Blotting*, e possibilitam a identificação de DNA, RNA e proteínas, respectivamente.

O *Southern blotting* (Southern, 1975) permite que os fragmentos de DNA sejam identificados com sondas de DNA, os quais hibridizam por ligação com hidrogênio para formar fragmentos complementares de DNA cromossômico. Antes da realização da análise de *Southern blotting*, os fragmentos de DNA devem ser produzidos a partir de cromossomos por digestão enzimática com endonucleases de restrição. Estas enzimas são obtidas a partir de microrganismos e digerem o DNA de fita dupla em locais específicos determinados pela sequência de ácidos nucleicos. Como as endonucleases de restrição dividem (clivam) o DNA nos locais específicos, cada enzima produz um número característico de fragmentos a partir de um único comprimento específico de DNA. Variantes alélicas de um gene específico podem ser detectadas se as diferenças na sequência do ácido nucleico incluírem os locais de clivagem, uma vez que a digestão pela enzima de restrição adequada trará diferentes fragmentos de genes alelos. Assim, mutações podem resultar tanto em perda dos locais de clivagem quanto na introdução de novos, ou seja, locais adicionais de clivagem. Essas diferenças nos fragmentos produzidos a partir de um gene são conhecidas como polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs; Botstein et al., 1980).

Após digestão enzimática do DNA cromossômico, os fragmentos de DNA resultantes são submetidos à eletroforese em agarose, separando-se os fragmentos de acordo com o tamanho. O gel de eletroforese é, então, coberto com uma folha de nitrocelulose, sobre a qual o DNA é absorvido. Antes da hibridização, uma desnaturação leve em solução alcalina garante que o DNA marcado seja de fita simples. Em seguida, a folha de nitrocelulose é incubada com o gene sonda, que normalmente é um DNA clonado (Miles e Wolf, 1989). O gene sonda terá sido radiomarcado e hibridizado por ligação com hidrogênio ligando-se a fragmentos de DNA cromossômico de fita simples que contenham sequências de ácidos nucleicos complementares. A folha de nitrocelulose é seca e coberta por uma película fotográfica ou de raios X para permitir localização do gene em estudo (Hayes et al., 1989; Fig.1).

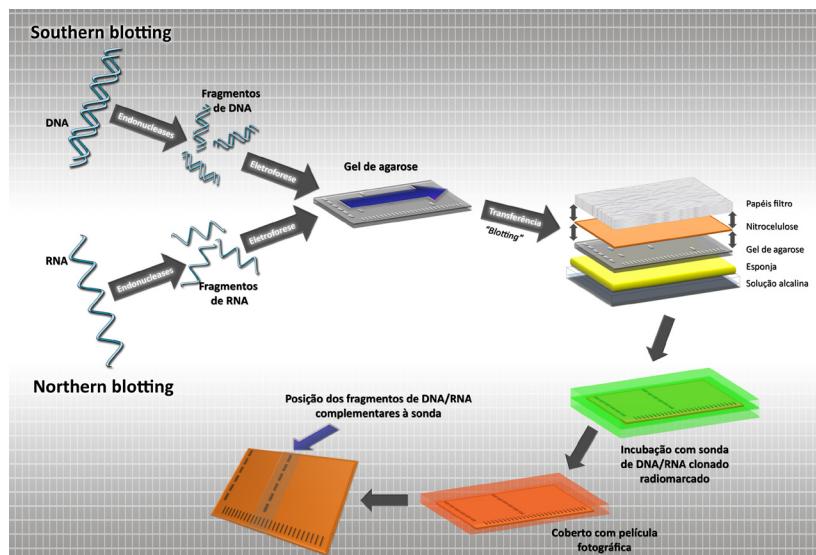


Figura 1. Técnicas de *Southern* e *Northern blotting* para isolamento e identificação de DNA e RNA, respectivamente.

A análise de *Northern blotting* emprega basicamente o mesmo processo descrito para *Southern blotting*, exceto pelo fato de que DNA complementar é utilizado para sonda de RNA. A técnica de *Northern blotting* (Thomas, 1983) permite que moléculas individuais de RNA mensageiro (RNAm) sejam identificadas e medidas após a hibridação de suas sequências de DNA correspondentes. O RNA mensageiro é inicialmente separado por eletroforese em função de sua dimensão e então transferido para papel antes dos genes sondas que são utilizados para localizar o RNA de interesse. Com este método, as transcrições de genes específicos podem ser estudadas e avaliadas (Hayes et al., 1989; Fig.1).

O *Western blotting* permite que proteínas específicas sejam identificadas com anticorpos específicos utilizados como sondas analíticas (Towbin e Gordon, 1984). Para realização da análise de *Western blotting*, são necessários os anticorpos específicos para a proteína em análise. As fontes destes anticorpos podem ser amostras de soro (por exemplo, de pacientes com infecções conhecidas), preparações de anticorpo policlonal purificado, ou os anticorpos monoclonais (Rovatti et al., 1996; Durlinger et al., 2002; Tajima et al., 2002).

Como consequência da interação do antígeno com o anticorpo, a proteína-alvo (o antígeno), quando imobilizada no papel, pode ser identificada. A mistura contendo a proteína sob investigação tem primeiramente seus componentes revelados por eletroforese em gel de poliacrilamida, e as proteínas são, então, transferidas para o papel de nitrocelulose. O anticorpo primário se liga à proteína-alvo e é imobilizado no papel. O complexo antígeno-anticorpo pode assim, ser identificado com os anticorpos para os anticorpos primários, que são marcados com iodo radioativo e, dessa forma, podem ser visualizados pelo procedimento de autorradiografia (Haves e Stockman, 1989; Fig.2).

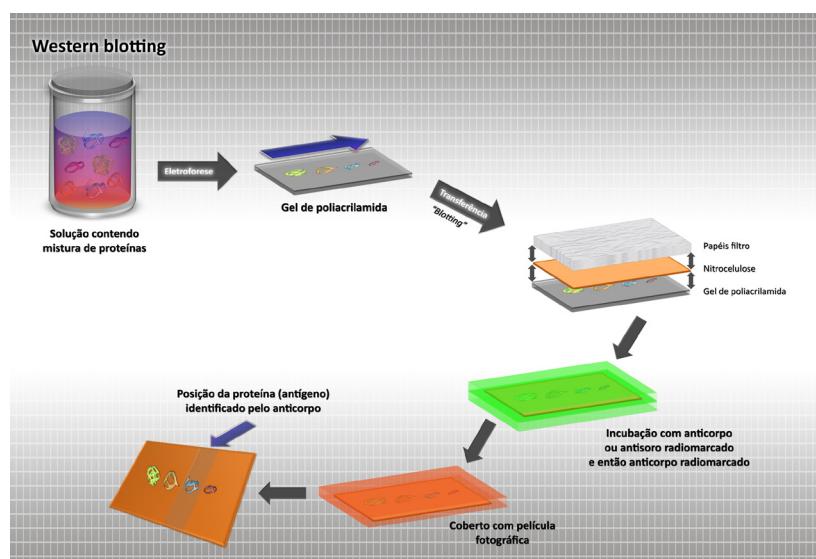


Figura 2. Técnica de *Western blotting* para isolamento e identificação de proteínas.

Markkula et al. (1996), por meio da técnica de *Southern blotting* associada à RT-PCR, identificaram a produção da subunidade  $\beta$  do receptor do FSH em óvulos de ratos transgênicos, evidenciando um controle paracrino da função ovariana nesta espécie. Com a mesma associação de técnicas, Zhang e Roy (2004), estudando o efeito de FSH endógeno e exógeno sobre a expressão do receptor para FSH em ovários de hamster, verificaram que, após o pico de LH, tanto o FSH endógeno quanto o exógeno inibem a expressão de RNAm para receptores de FSH, correlacionando essas duas gonadotrofinas à ciclicidade e ao crescimento folicular.

Minegishi et al. (1997), utilizando uma associação das técnicas de *Northern blotting*, hibridização *in situ* e RT-PCR, estudaram o receptor do FSH em humanos e observaram, por meio do *Northern blotting*, que este é abundante em folículos pré-ovulatórios e que tal nível de expressão cai pela metade nos corpos lúteos. Além disso, os pesquisadores identificaram pelo menos dois transcritos para esse receptor. Na hibridização *in situ*, o receptor foi localizado confinado às células da granulosa de folículos em crescimento, e, com a PCR, foi avaliada a expressão das diferentes isoformas nos corpos lúteos e na placenta.

Com a técnica de *Western Blotting*, Dattatreymurty et al. (1994) observaram que o fluido folicular humano contém proteínas, presumivelmente derivadas das células da granulosa, as quais competem pelo domínio extracelular do receptor para FSH modulando sua ação. Com esta técnica e avaliando a expressão da proteína do VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), em um estudo de ovários de ratos, Danforth et al. (2003) verificaram que o VEGF estimula o desenvolvimento de folículos pré-antrais e é regulado pelo estrógeno, podendo ser um dos fatores que participam da regulação do início do crescimento folicular nesta espécie.

Orisaka et al. (2006), utilizando as técnicas de *Western Blotting* e PCR em tempo real, verificaram que o GDF-9 tem ação antiapoptótica em folículos pré-antrais e protege as células da granulosa da apoptose via ativação da via fosfatidilinositol 3-quinase/Akt e que um nível adequado de GDF-9 é necessário para a expressão do RNAm para o receptor do FSH. Desta forma, o GDF-9 atua favorecendo a sobrevivência e o crescimento folicular durante o início da transição de folículo pré-antral para antral por meio da supressão da apoptose das células da granulosa e da atresia folicular.

#### *Microarranjos de DNA – Chips de DNA*

Diversas metodologias foram desenvolvidas para a identificação em larga escala de genes diferencialmente expressos. Dentre as mais utilizadas, a técnica de microarranjos, que se baseia na quantificação dos RNAm produzidos pela célula (produtos de expressão gênica), fornece uma poderosa plataforma de análise do padrão de expressão de milhares de genes simultaneamente, o que possibilita a comparação entre diferentes amostras, podendo ser estas representativas de diferentes estádios do desenvolvimento, diferentes tipos celulares ou histológicos, diferentes sensibilidades a drogas ou entre tecidos normais e patológicos (Piatetsky-Shapiro e Tamayo, 2003; Brandon et al., 2008).

A técnica inicia-se com a construção dos microarranjos, feita a partir de uma lâmina de vidro de dimensões mínimas (na ordem de cm a mm). Esta lâmina é processada para apresentar uma coleção de pequenos “poros”, onde uma amostra específica de DNA, que representa um gene específico, é depositada. Para facilitar a adesão do DNA ao “poro” da lâmina, são utilizados adesivos de superfície como aminosilanos ou poli-l-lisina. Dispositivos robotizados são responsáveis pelo depósito do DNA, fixado por aplicação de raios ultravioleta, que causam interações dos aminosilanos com o DNA para fixação. Cada amostra em um “poro” representa um gene. Os tipos de DNA depositados variam de DNAc a oligonucleotídeos sintetizados *in situ* (Yang et al., 2002).

O ensaio nos microarranjos é um experimento de hibridização. Inicialmente é feita a extração do RNAm dos tecidos a serem estudados comparativamente. Os RNAm são transformados em DNAc. Cada grupo de DNAc é marcado com grupamentos de natureza fluorescente. Após a marcação, as amostras nos microarranjos são desnaturadas por calor. Os DNAc estudados são agrupados e colocados em contato com os microarranjos por submersão do “chip” em uma solução de hibridização. Tanto os DNAc dos tecidos estudados como os “poros” da lâmina estão na forma de fita simples. Se houver complementaridade entre as sequências, as fitas de DNAc marcadas irão hibridizar com os DNAc de um “poro” da lâmina. Após lavagem e secagem do “chip”, este é levado a uma câmara escura e irradiado com laser. Os marcadores fluorescentes irão absorver a radiação. Cada marcador emite radiação em um comprimento de onda diferente, permitindo a quantificação de DNAc hibridizado em qualquer “poro” da lâmina. Como se sabe qual gene está fixado em cada um dos “poros”, pode-se saber a expressão de um tecido controle em relação ao variante. Cores são atribuídas computacionalmente às faixas de emissão de cada um dos marcadores, e as variações entre as cores determinam os níveis de expressão (Yang et al., 2002; Fig.3).

As aplicações desta técnica são amplas, variando desde a análise de patologias como câncer, estudo de efeito de fármacos à análise de tecidos submetidos à determinada condição de estresse (Fathallah-Shaykh, 2005). No entanto, apesar do sucesso da utilização da técnica na identificação de genes diferencialmente expressos, a utilização de lâminas de microarranjos possui algumas limitações. A quantidade de genes analisados se restringe ao painel gênico fixado na lâmina. Além disso, a produção de lâminas de microarranjos de DNAc é laboriosa e demanda alto investimento financeiro para a aquisição de *scanners* e do robô utilizado para a fixação do DNA na

lâmina. É necessária a participação de profissionais especializados para a realização da normalização e análise estatística dos dados gerados pelas hibridizações, além de haver grande dificuldade na comparação entre experimentos diferentes (Brown e Botstein, 1999).

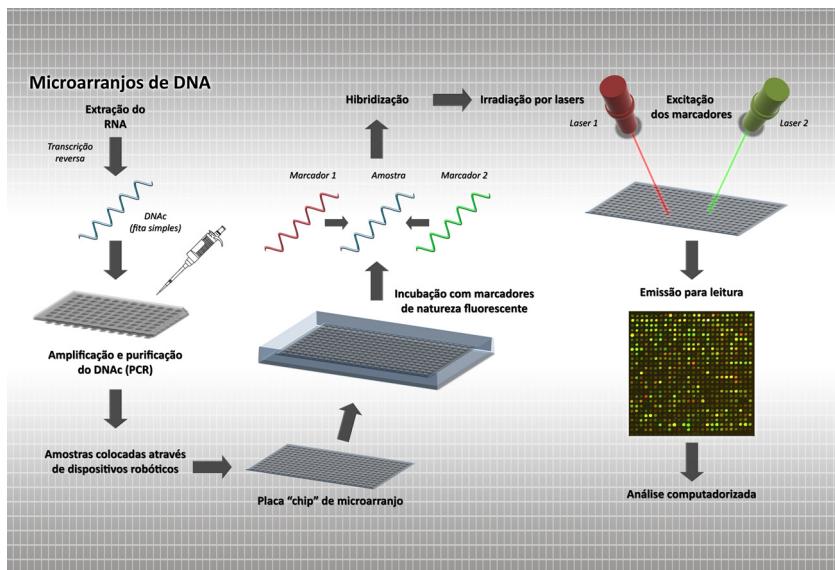


Figura 3. Representação esquemática da técnica de microarranjos de DNA.

Por meio da técnica de microarranjos de DNA, Caetano et al. (2004) puderam verificar alterações na dinâmica de crescimento e maturação folicular em suínos selecionados pela sua alta taxa de ovulação e sobrevivência embrionária ao longo de 11 gerações de genes envolvidos com a síntese de esteroides, remodelação do tecido ovariano e apoptose. Em um estudo do gene *Nobox* (expresso em óócitos e essencial para o processo de oogênese) em camundongas recém-nascidos *knockout* para esse gene, Choi et al. (2007) verificaram que ocorre um aumento da expressão de genes relacionados à determinação do sexo masculino, observando que o óóbito atua suprimindo a expressão desses genes. Estudando esse mesmo gene, Rajkovic, et al. (2004) verificaram que genes preferencialmente expressos em óócitos, como o GDF-9, têm sua expressão inibida em camundongas *knockout*, enquanto a expressão de outros genes, como o BMP-4, *Kit ligand* e *Bax*, permanece inalterada.

Ao se verificar, por meio da análise de microarranjos, mudanças nos transcriptomas (RNAs transcritos de DNA), foi constatado que o fator neurotrófico derivado da linhagem celular glial (GDNF) promove o desenvolvimento de folículos primordiais e medeia as interações parácrinas e autócrinas das células foliculares durante o início da foliculogênese (Dole et al., 2008).

Com vistas a elucidar as mudanças de expressão de genes coordenados no crescimento inicial de folículos ovarianos, foi realizada a análise de microarranjos em RNA obtido de células germinativas primordiais, folículos primordiais e primários de ovários de ratos recém-nascidos. Foi observado que existem pelo menos 2332 genes comuns aos três estádios foliculares, sendo 146 específicos para células germinativas primordiais, 94 para folículos primordiais e 151 para folículos primários. Destes genes, 148 têm aumentada sua expressão e 50 têm expressão diminuída na transição de célula germinativa primordial para folículo primordial e na transição de folículo primordial para primário. De folículo primordial para primário, 80 genes aumentam sua expressão e 44 diminuem. A identificação de cada um dos genes e as relações entre seus transcritos é fundamental para a compreensão da foliculogênese inicial (Kezele et al., 2005).

#### Ensaios de proteção de ribonuclease (EPR)

A EPR é uma ferramenta poderosa que pode ser empregada em uma variedade de configurações específicas para medir a expressão de moléculas RNAm em uma mistura complexa de RNA total. Embora trabalhosa, pode ser utilizada para analisar até 25 amostras em um único ensaio e examinar até 10-15 genes em cada amostra (Rottman, 2002). A EPR é mais útil para o mapeamento das sequências inicializadoras e finalizadoras da transcrição, bem como para os limites de íntrons e exons, além de discriminar entre os RNAm de tamanho semelhante, que migram em posições semelhantes no *Northern blotting* (Lee et al., 2002).

Na sua forma mais simples, o EPR é útil para medir a expressão de um RNAm alvo específico em uma mistura de RNA total (Gilman, 1993). Um fragmento de DNA que codifica para uma porção do RNAm-alvo é clonado em um plasmídeo adjacente a um promotor bacteriófago. A enzima DNA-dependente RNA polimerase é

então, adicionada à mistura de reação contendo plasmídeo, tampões, nucleotídeos (ATP, GTP, CTP e UTP – adenosina, guanina, citosina e uracila trifosfato, respectivamente), e 32P-UTP (trifosfato de uridina – marcador radioativo). A polimerase liga-se ao promotor e começa a transcrever o fragmento de DNA sonda em RNA de fita simples (portanto, transcrição reversa), incorporando 32P-UTP (Sambrook et al., 1989). Adicionalmente à transcrição da seqüência da sonda desejada, a polimerase invariavelmente continua atuando, fazendo transcrição reversa adicional irrelevante das seqüências derivadas do plasmídeo até que se atinja um sinal de parada (*stop códon*), ou seja, ponto específico da seqüência que determina a parada da transcrição. O produto da reação de síntese da sonda é uma molécula radioativa de RNA de fita simples cuja seqüência é o RNAm alvo a ser detectado. Normalmente, esse processo produz uma sequência de RNA extra um pouco mais longa do que o necessário (Hod, 1992; Saccomanno et al., 1992).

Por meio de métodos tradicionais, o RNA total é, então, isolado do tecido ou células de interesse. A sonda radioativa é adicionada à amostra do RNA e liga-se ao RNAm-alvo, formando parcialmente RNA de fita dupla (RNAfd). Em seguida, os RNAfd híbridos são digeridos com RNase, que eliminam qualquer porção de fita simples não hibridizada do RNAfd (incluindo a porção extra da sonda de RNA), resultando em fragmentos RNAfd (fragmentos protegidos), que são posteriormente purificados. Os fragmentos protegidos de RNAfd constituem uma pequena amostra da sonda original e são, então, adicionados para diferentes camadas de poliacrilamida desnaturante e separados por eletroforese em gel. As condições de desnaturação fazem o RNAfd dissociar-se em fitas simples. Após a eletroforese, o gel é seco e exposto a uma tela de *phosphorimage* (dispositivo de imagem quantitativa de armazenamento de fósforo que usa a tecnologia de maneira mais rápida e precisa que os raios X) para quantificar o sinal radioativo. O fragmento protegido é identificado pelo seu peso molecular; a intensidade do sinal radioativo gerado é diretamente proporcional à quantidade de RNAm-alvo específico na amostra original de RNA total (Fig. 4). O fragmento protegido da sonda (camada 2) é significativamente menor do que o original da sonda (camada 1) por causa da digestão do RNA extra (Brown e Botstein, 1999).

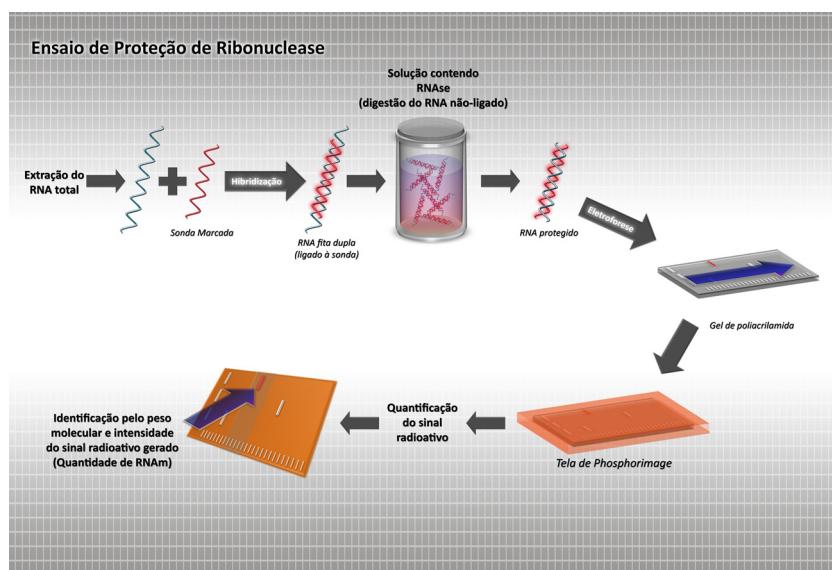


Figura 4. Representação esquemática da técnica de ensaio de proteção de ribonuclease.

Watanabe e Nakanishi (2001), utilizando a técnica de EPR, demonstraram que, na espécie bovina, em cultivos de complexos *cumulus oophorus* (CCOs), nem o FSH nem o LH têm efeito sobre a expressão do gene da zona pelúcida e que esse gene pode ser independente do mecanismo de maturação nuclear do óvulo. Liu et al. (2000), em estudo da expressão de receptores para gonadotrofinas (FSH e LH), enzimas esteroidogênicas (citocromo P450 17a-hidroxilase e aromatase P450), IGF-I e IGF-II com seus respectivos receptores, proteínas ligantes (IGFBP-2 e -4) e receptor para o hormônio do crescimento (GH) em folículos dominantes suínos, identificaram que, durante um rápido período de crescimento folicular, foram observados: uma correlação positiva entre a capacidade esteroidogênica desses folículos com a expressão de IGF-II e receptores para LH; uma correlação negativa entre o crescimento folicular e a expressão do receptor para FSH, GH, além da proteína ligante IGFBP-2; uma correlação positiva com a expressão do IGF-I; e o aumento da expressão, após pico de LH do IGFBP-4 e receptor de IGF tipo II.

Por meio do EPR associado ao PCR, foi verificado que a expressão de RNAm para receptores de andrógenos aumenta à medida que os folículos primordiais entram no grupo de folículos em crescimento. A

expressão do RNAm para receptores de andrógenos é ausente em folículos primordiais, mas presente nas células da granulosa de folículos primários, sendo ainda mais significativa em células da granulosa de folículos secundários, o que evidencia que a expressão de RNAm para receptores de andrógenos aumenta durante o início do crescimento folicular (Hampton et al., 2004).

### Considerações finais

As técnicas de biologia molecular possibilitam a identificação da expressão de genes e/ou proteínas relacionados ao processo de foliculogênese. Cada uma das técnicas de biologia molecular citadas anteriormente, utilizadas isoladamente ou em associação, fornece uma série de resultados relevantes para a compreensão da foliculogênese. De posse dessas informações acerca da expressão diferencial para fatores de crescimento e/ou hormônios relacionados direta ou indiretamente com a foliculogênese, podem-se elaborar estratégias para o desenvolvimento de sistemas de cultivo de folículos pré-antrais que permitam determinar um momento ótimo de adição das substâncias em concentrações adequadas ao meio de cultivo (meios dinâmicos) visando melhorar as taxas de viabilidade, crescimento e maturação de óocitos oriundos de folículos pré-antrais.

### Referências bibliográficas

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppä L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Bützow R, Hovatta O, Dale L, Ritvos O.** Human growth differentiation factor 9 (GDF9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, v.84, p.2744-2750, 1999.
- Alm H, Katska-Ksiazkiewicz L, Ryńska B, Tuchscherer A.** Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, v.65, p.1422-1434, 2006.
- Andrade, ASR, Gomes, RF, Fernandes O, Melo MN.** Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop*, v.78, p.261-267, 2001
- Bao B, Garverick HA.** Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci*, v.76, p.1903-1921, 1998.
- Barnett KR, Schilling CCR, Greenfield CR, Tomic D, Flaws JA.** Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod*, v.10, p.1-19, 2006.
- Bittner MK, Lupferer P, Morris CF.** Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal Biochem*, v.102, p.459-471, 1980.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR.** Molecular cloning of the ovine GDF-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod*, v.60, p.381-386, 1999.
- Borson ND, Salo WL, Drewes LR.** A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *PCR Methods Appl*, v.2, p.144-148, 1992.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, v.32, p.314-331, 1980.
- Brandon ML, Dailey RA, Inskeep EK, Vernon MW, Poole DH, Rhinehart JD, Yao J.** Microarray analysis of gene expression in granulosal cells from persistent follicles in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.405-413, 2008.
- Brown PO, Botstein D.** Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genet*, v.21, suppl.1, p.33-37, 1999.
- Bucher P.** Regulatory elements and expression profiles. *Curr Opin Struct Biol*, v.9, p.400-407, 1999.
- Buratini Jr J, Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MGL, Giometti C, Barros CM, Cao M, Nicola ES, Price CA.** Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, v.130, p.343-350, 2005.
- Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, v. 25, p.169-193, 2000.
- Bustin SA.** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, v.29, p.23-39, 2002.
- Caetano AR, Johnson RK, Ford JJ, Pomp D.** Microarray profiling for differential gene expression in ovaries and ovarian follicles of pigs selected for increased ovulation rate. *Genetics*, v.168, p.1529-1537, 2004.
- Campbell BK, Souza C, Gong JG, Webb R, Kendall N, Marsters P, Robinson G, Mitchell A, Telfer EE, Baird DT.** Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction Suppl.*, n.61, p.429-443, 2003.
- Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E, Gosden RG.** Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fertil*, v.90, p.321-327, 1990.
- Chand AL, Ponnampalam AP, Harris SE, Winship IM, Shelling AN.** Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertil Steril*, v.86, p.1009-1012, 2006.

- Choi Y, Qin Y, Berger MF, Ballow DJ, Bulyk ML, Rajkovic A.** Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking nobox. *Biol Reprod*, v.77, p.312-319, 2007.
- Cox KH, Deleon DV, Angerer LM, Angerer RC.** Detection of mRNAs in sea urchin embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol*, v.101, p.485-502, 1984.
- Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI.** Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol Reprod*, v.68, p.1736-1741, 2003.
- Dattatreyamurty B, Schweder CA, Reichert Jr LE.** Identification in human ovarian follicular fluid of proteins that share an epitope region unique to the extracellular domain of the follicle-stimulating hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, v.79, p.1303-1309, 1994.
- De La Fuente R, Eppig JJ.** Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol*, v.229, p.224-236, 2001.
- Dole G, Nilsson EE, Skinner MK.** Glial-derived neurotrophic factor promotes ovarian primordial follicle development and cell-cell interactions during folliculogenesis. *Reproduction*, v.135, p.671-682, 2008.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM.** Protein growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v.383, p.531-535, 1996.
- Drummond AE.** The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*, v.4, p.16, 2006.
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM.** The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol*, v.12, p.1809-1817, 1998.
- Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karel B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JTHJ, Grootegoed JA, Themmen APN.** Anti-müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, v.143, p.1076-1084, 2002.
- Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM.** Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol*, v.13, p.1035-1048, 1999.
- Eppig JJ.** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals *Reproduction*, v.122, p.829-838, 2001.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL.** The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.2890-2894, 2002.
- Erickson GF.** An analysis of follicle development and ovum maturation. *Semin Reprod Endocrinol*, v.4, p.233-254, 1986.
- Fathallah-Shaykh HM.** Microarrays: Applications and Pitfalls. *Arch Neurol*, v.62, p.1669-1672, 2005.
- Figueiredo JR, Hulshof SCJ, Beckers JF.** Nova biotecnologia: isolamento, caracterização e cultura de folículos ovarianos pré-antrais em bovinos. In: Simpósio Nacional de Biotecnologia da Reprodução de Mamíferos Domésticos, 1995, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: [s.n.], 1995. v.1, p.1-11.
- Figueiredo JR, Hulshof SCJ, Van den Hurk R, Ectors FJ, Fontes RS, Nusgens B, Bevers MM, Becker JF.** Development of a new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology*, v.40, p.789-799, 1993.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas, VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Roca, 2008. p.303-327.
- Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM.** Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med*, v.4, p.1329-1333, 1998.
- Fortune JE.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.135-163, 2003.
- Fortune JE, Kito S, Wandji SA, Srseen V.** Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. *Theriogenology*, v.49, p.441-449, 1998.
- Freeman WM, Gioia L.** The maturation of nucleic acid technologies. *Trends Biotechnol*, v.17, p.44-45, 1999.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE.** Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, v.26, p.112-122, 1999.
- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos, O.** Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*, v.25, p.279-283, 2000.
- Gilman M.** Ribonuclease protection assay. In: Ausubel EM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Stuhl K (Ed.). *Current protocols in molecular biology*. [s.l.]: J Wiley, 1993. p.471-478.
- Gougeon A.** The early stages of follicular growth. In: Trounson AO, Gosden RG (Ed.). *Biology and pathology of the oocyte*. New York: Cambridge University Press, 2003. p.29-43.
- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R.** Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328, 2000.
- Hahn EJ.** Autoradiography: a review of basic principles. *Am Lab*, v.15, p.64-71, 1983.
- Hampton JH, Manikkam M, Lubahn DB, Smith MF, Garverick HA.** Androgen receptor mRNA expression

- in the bovine ovary. *Domest Anim Endocrinol*, v.27, p.81-88, 2004.
- Haves JD, Stockman PK.** Electrophoresis of proteins and nucleic acids. Techniques and applications. *Br Med J*, v.299, p.907-910, 1989.
- Hayashi M, Mcgee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ.** Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, v.140, p.1236-1244, 1999.
- Hayes PC, Wolf CR, Hayes JD.** Blotting techniques for the study of DNA, RNA, and proteins. *Br Med J*, v.299, p.965-968, 1989.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.** Real time quantitative PCR. *Genome Res*, v.6, p.986-994, 1996.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, v.11, p.1026-1030, 1993.
- Hirshfield AN.** Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, v.124, p.43-101, 1991.
- Hod Y.** A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques*, v.13, p.852-854, 1992.
- Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Bekers JF, Bevers MM, Van den Hurk R.** Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Q*, v.2, n.16, p.78-80, 1994.
- Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R.** Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.461-477, 2004.
- Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo M, Ritvos O.** Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homologue GDF-9B. *Mol Cell Endocrinol*, v.156, p.189-193, 1999.
- Juengel JL, Sawyer HR, Smith PR, Quirke LD, Heath DA, Lun S, Wakefield SJ, McNatty KP.** Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol*, v.191, p.1-10, 2002.
- Kezele PR, Ague JM, Nilsson E, Skinner MK.** Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. *Biol Reprod*, v.72, p. 241-255, 2005.
- Kreuzer H, Massey, A.** *Engenharia genética e biotecnologia*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- Lawrence B, Singer RH.** Quantitative analysis of *in situ* hybridization methods for the detection of actin gene expression. *Nucleic Acids Res*, v.13, p.1777-1799, 1985.
- Lee LG, Connell CR, Bloch W.** Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* v.21, p.3761-3766, 1993.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN.** MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, v.21, p.4663-4670, 2002.
- Liu J, Koenigsfeld AT, Cantley TC, Boyd CK, Kobayashi Y, Lucy MC.** Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod*, v.63, p.942-952, 2000.
- Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y.** A comparative study on transforming growth factor- and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology*, v.140, p.2480-2485, 1999.
- Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y.** Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, v.139, p.2342-2347, 1998.
- Livak KJ.** Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5 nuclease assay . *Genet Anal*, v.14, p.143-149, 1995.
- Lucci CM, Amorim CA, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JR, Gonçalves PBD.** Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.56, p.39-49, 1999.
- Mao J, Wu G, Smith MF, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN.** Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biol Reprod*, v.67, p.1197-1203, 2002.
- Markkula M, Kananen v, Klemi P, Huhtaniemi I.** Pituitary and ovarian expression of the endogenous follicle-stimulating hormone (FSH) subunit genes and an FSH  $\beta$ -subunit promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase gene in transgenic mice; specific partial ablation of FSH-producing cells by antiherpes treatment. *J Endocrinol*, v.150, p.265-273, 1996.
- Markström E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H.** Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, v.123, p.23-30, 2002.
- Mattei MG, Philip N, Passage E, Moisan JP, Mandel JL, Mattei JF.** DNA probe localization at 18p113 band by *in situ* hybridization and identification of a small supernumerary chromosome. *Hum Genet*, v.69, p.268-271, 1985.
- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig, JJ.** Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, v.296, p.2178-2180, 2002.
- Mazerbourg S, Hsueh AJW.** Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for

- growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Hum Reprod Update*, v.12, p.373-383, 2006.
- McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ.** Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol*, v.9, p.131-136, 1995.
- Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR.** Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res*, v.7, p.7035-7056, 1984.
- Miles JS, Wolf CR.** Principles of DNA cloning. *Br Med J*, v.299, p.1019-1022, 1989.
- Minegishi T, Tano M, Igarashi M, Rokukawa S, Abe Y, Miyamoto I, Miyamoto K.** Expression of follicle-stimulating hormone receptor in human ovary. *Eur J Clin Invest*, v.27, p.469-474, 1997.
- Nakamura RM.** Overview and Principles of In-Situ Hybridization. *Clin Biochem*, v.23, p.255-259, 1990.
- Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK.** Leukeamia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol*, v.188, p.65-73, 2002.
- Nilsson EE, Parrot JA, Skinner MK.** Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, v.175, p.123-130, 2001.
- Nilsson EE, Skinner MK.** Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*, v.69, p.1265-1272, 2003.
- Novais CM, Pires-Alves M, Silva FF.** PCR em tempo real. *Rev Bioteclol Ciênc Des*, v.33, p.10-13, 2004.
- Orisaka M, Orisaka S, Jiang J, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK.** Growth Differentiation Factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol*, v.20, p.2456-2468, 2006.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson, GF, Shimasakai S.** Bone morphogenetic protein-15. *J Biol Chem*, v.275, p.39523-39528, 2000.
- Park C, Cha K, Kim K, Lee K.** Expression of cell cycle regulatory genes during primordial-primary follicle transition in the mouse ovary. *Fertil Steril*, v.83, p.410-418, 2005.
- Parker RM, Barnes NM.** mRNA: detection by *in situ* and northern hybridization. *Methods Mol Biol*, v.106, p.247-283, 1999.
- Parrott JA, Skinner MK.** Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v.140, p.4262-4271, 1999.
- Piatetsky-Shapiro G, Tamayo P.** Microarray data mining: facing the challenges. *SIGKDD Explorations*, v.5, p.1-5, 2003.
- Raeymaekers L.** Basic principles of quantitative PCR. *Mol Biotechnol*, v.15, p.115-122, 2000.
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM.** NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*, v.305, p.1157-1159, 2004.
- Rappolee DA, Brenner CA, Schultz RM, Mark D, Werb Z.** Developmental expression of PDGF, TGF-a, and TGF-b genes in preimplantation mouse embryos. *Science*, v.241, p.1823-1825, 1988.
- Reynaud K, Driancourt MA.** Oocyte attrition. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.101-108, 2000.
- Richards JS.** Perspective: the ovarian follicle: a perspective in 2001. *Endocrinology*, v.142, p.2184-2193, 2001.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.234-248, 2002.
- Rodrigues APR, Amorim CA, Lucci CM, Figueiredo JR, Goncalves de Bem PBD, de AR.** Mechanical isolation of caprine preantral follicles at different reproductive stages and ovarian situation. *Cienc Rur*, v.28, p.471-476, 1998.
- Rottman JB.** The ribonuclease protection assay: a powerful tool for the veterinary pathologist. *Vet Pathol*, v.39, p.2-9, 2002.
- Rovatti E, Corradi MP, Amicosante M, Tartoni PL, Panini W, Ancora A, Cenci AM, Zucchi L, Monno L, Angarano G, Saltini C.** Evaluation of a western blot serum test for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J*, v.9, p.288-292, 1996.
- Russe I.** Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, v.24, p.77-92, 1983.
- Saccamanno CF, Bordonaro M, Chen JS, Nordstrom JL.** A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques*, v.13, p.846-850, 1992.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Synthesis of RNA probes by in vitro transcription of double-stranded DNA templates by bacteriophage DNA-dependent RNA polymerases. In: Ford N, Nolan C, Ferguson M (Ed.). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2.ed. Cold Spring Harbour, NY: CSHL Press, 1989. p.1027-1037.
- Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT.** A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev*, v.5, p.459-478, 1993.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO.** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, v.270, p.467-470, 1995.
- Silva JRV, van den Hurk R, Figueiredo JR.** Expression of mRNA and protein localization of epidermal

- growth factor and its receptor in goat ovaries. *Zygote*, v.14, p.107-117, 2006a.
- Silva JRV, van den Hurk, R, van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR.** Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J Endocrinol*, v.183, p.405-415, 2004.
- Silva JRV, van den Hurk R, van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR.** The Kit ligand/c-Kit receptor system in goat ovaries: gene expression and protein localization. *Zygote*, v.14, p.317-328, 2006b.
- Silva NP, Andrade LEC.** Noções básicas de biologia molecular. *Rev Bras Reumatol*, v.41, p.83-94, 2001.
- Sirard MA, Blondin P.** Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.417-426, 1996.
- Southern EM.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, v.98, p.503-517, 1975.
- Tajima C, Manabe N, Inoue N, Matsui T, Kagawa N, Hondo E, Miyano T, Ratky J, Miyamoto H.** A monoclonal antibody recognizes follicular granulose cell antigens in porcine ovaries. *J Reprod Dev*, v.48, p.567-572, 2002.
- Thomas FH, Armstrong DG, Telfer EE.** Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*, v.1, p.76, 2003.
- Thomas PS.** Hybridization of denatured RNA transferred on dotted nitrocellulose paper. *Methods Enzymol*, v.100, p.255-266, 1983.
- Towbin H, Gordon J.** Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. *J Immunol Methods*, v.72, p.313-340, 1984.
- Van de Leemput EE, Vos PLAM, Zeinstra EC, Bevers MM, van der Weijden GC, Dieleman SJ.** Improved in vitro embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology*, v.52, p.335-349, 1999.
- Van den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM.** Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update*, v.6, p.457-474, 2000.
- Van den Hurk R, Zhao J.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.
- Van Wervel IL, Rodgers RJ.** Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. *Biol Reprod*, v.55, p.1003-1011, 1996.
- Vernon RK, Spicer LJ.** Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *J Anim Sci*, v.72, p.2696-2702, 1994.
- Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ.** Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod*, v.67, p.473-480, 2002.
- Wandji SA, Eppig JJ, Fortune JE.** FSH and Growth Factor Affect the Growth and Endocrine Function in vitro of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. *Theriogenology*, v.45, p.817-832, 1996.
- Wang T, Brown MJ.** mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNAse protection. *Anal Biochem*, v.269, p.198-201, 1999.
- Watanabe S, Nakanishi Y.** Effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on zona pellucida gene expression during bovine oocyte maturation *in vitro*. *J Mamm Ova Res*, v.18, p.116-118, 2001.
- Weis JH, Tan SS, Martin BK, Wittwer CT.** Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet*, v.8, p.263-264, 1992.
- Wu J, Nayudu PL, Kiesel PS, Michelmann HW.** Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicles development *in vitro*. *Biol Reprod*, v.63, p.320-327, 2000.
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP.** Normalization for cDNA addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res*, v.30, p.4-15, 2002.
- Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorich LP, Bhat GK, Brann DW.** Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology*, v.65, p.223-228, 1997.
- Zhang Y, Roy SK.** Downregulation of Follicle-Stimulating Hormone (FSH)-Receptor Messenger RNA Levels in the Hamster Ovary: Effect of the Endogenous and Exogenous FSH. *Biol. Reprod.*, v.70, p.1580-1588, 2004.
- Zhao J, Taverne MAM, Van Der Weijden BC, Bevers MM, Van Den Hurk R.** Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol. Reprod.*, v.65, p.967-977, 2001.