

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas



Trabalho de Conclusão de Curso

**Estresse oxidativo relacionado à expressão
do gene HSP70 durante a maturação
in vitro de oócitos equinos**

Cristian Kaefer

Pelotas, 2009

CRISTIAN KAEFER

**Estresse oxidativo relacionado à expressão
do gene HSP70 durante a maturação
in vitro de oócitos equinos**

Trabalho acadêmico apresentado ao curso de Ciências Biológicas (Bacharelado) da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Tiago Collares, Dr.
Co-Orientador: Priscila Marques de Leon, Msc.

Pelotas, 2009

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

K11e Kaefer, Cristian

Estresse oxidativo relacionado à expressão do gene HSP70 durante a maturação *in vitro* de oócitos equinos / Cristian Kaefer ; orientador Tiago Collares ; co-orientador Priscila Marques Moura de Leon. – Pelotas, 2010. – 53f. : il. – Monografia (Conclusão de curso). Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Biologia. 2.Expressão gênica. 3.qRT-PCR. 4.Células do cumulus. 5.Oócitos equinos. 6.PCR em tempo real. I.Collares, Tiago. II.Leon, Priscila Marques Moura de III.Título.

CDD: 636.10821

Banca examinadora:

Prof. Dr. Tiago Collares

Prof^a. Dra. Fabiana Seixas

Msc. Priscila Marques Moura de Leon

Msc. Vinicius Farias Campos

Agradecimentos

*A **Deus**, pela vida e por tudo o que Ele tem me dado.*

*À minha **família**, em especial minha tia **Laci** e à minha mãe, **Cleci**, que não se contentou em me presentear apenas com a vida e abriu portas para meu futuro. A vocês que contribuíram para construir a pessoa que me tornei, me apoiaram e tornaram tudo isso possível.*

*Ao meu orientador **Tiago Collares**, pelos muitos ensinamentos, pela confiança e apoio dedicados ao meu trabalho. E também pela construção de um pensamento científico, profissional e pessoal.*

*À minha co-orientadora **Priscila Marques de Leon**, que tornou a realização desse trabalho possível. Obrigado pelo tempo e amizade dedicados, pelo exemplo de profissional e ensinamentos passados.*

*Ao professor **João Carlos Deschamps**, pelo exemplo de pesquisador, pelas oportunidades que me foram apresentadas, pelas boas conversas e os momentos de reflexão.*

*Aos colegas do Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal que compartilharam comigo bons momentos, **Vinicius Farias Campos, Thaís Collares, Marta Amaral, Evelise Sampaio, Ingrid Amaral, Elisa Fortes, Elias Berneira, Breno Gonçalves e Fabrício Domenech Nunes**. Enfim, a todos vocês do EMTA que fizeram do tempo que passamos juntos não só um tempo de aprendizado, mas também momento de prazer e descontração.*

*À minha amiga **Karine Rech Begnini** pela amizade e apoio dedicados durante essa jornada. Sua alma extraordinária sempre pronta a ajudar a uma pessoa rara. Obrigado, pois tua amizade fez e fará parte da minha história.*

*Aos meus colegas e amigos por terem estado sempre comigo nos momentos de descontração e estudo. Em especial ao meu amigo **Vinicius de Moraes**, à querida amiga **Daniela Cassol** e às inesquecíveis componentes do*

quarteto, **Karine Begnini, Laura Moreira, Vanessa dos Anjos e Evelise Sampaio.**

Obrigado pelos vários ótimos momentos!

*Ao **Frigorífico Miramar**, por ter aberto suas portas para que fosse possível a coleta dos ovários durante a realização do experimento.*

A todas as pessoas que, apesar de não mencionadas, contribuíram com este trabalho.

MUITO OBRIGADO!

Resumo

KAEFER, Cristian. **Expressão do gene HSP70 relacionado ao processo de estresse oxidativo durante a maturação *in vitro* de oócitos equinos**. 2009. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Biologia. Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As biotécnicas reprodutivas de maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) tem apresentado baixa eficiência para a espécie eqüina. As taxas de MIV de oócitos equinos são baixas quando comparadas com outras espécies, obtendo-se entre 40 e 60% de oócitos atingindo o estágio de metáfase II. As razões para a falha dos oócitos equinos em completar a meiose durante a MIV são desconhecidas. A alta tensão de oxigênio prejudica gravemente o desenvolvimento de embriões *in vitro*, estimulando a produção de radicais livres de oxigênio e aumentando o grau de lesões no DNA. O gene Hsp 70 desempenha um papel importante na resposta adaptativa protegendo células contra a apoptose induzida por estresse oxidativo. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão do gene HSP70 em células do *cumulus* e oócitos equinos imaturos e maturados *in vitro* através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Os complexos *cumulus* oócito foram obtidos através de aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouro. Os oócitos foram divididos em dois grupos (Grau 1 e Grau 2), de acordo com características morfológicas, em *pools* de 62 oócitos. Os CCOs foram maturados durante de 40h em estufa a 20% de O₂, 38,7°C e 5% de CO₂. Através da qRT-PCR para a avaliação da transcrição de HSP70, foi encontrada uma maior expressão em células do *cumulus* e ócitos imaturos de Grau 2 do que em Grau 1. Não houve variação na expressão do gene HSP70 entre os grupos imaturos e maturados *in vitro*, tanto em oócitos como em células do *cumulus*, demonstrando uma estabilidade gênica durante o processo de maturação *in vitro* de oócitos equinos em fluido folicular.

Palavras chave: Expressão gênica. qRT-PCR. Células do *cumulus*. Oócitos. PCR em tempo real.

Abstract

KAEFER, Cristian. **Expressão do gene HSP70 relacionado ao processo de estresse oxidativo durante a maturação *in vitro* de oócitos equinos**. 2009. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Biologia. Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The reproductive biotechniques for *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) has a low efficiency for the equine species. The rates of IVM equine oocytes are low compared with other species, ranging from 40 to 60% of oocytes reaching the metaphase II stage. The reasons for the failure of equine oocytes to complete meiosis during IVM are still unknown. The high oxygen tension impairs the *in vitro* development of embryos, by stimulating production of oxygen free radicals and increasing the degree of lesions in DNA. The HSP70 gene plays an important role in adaptive response to protect cells against apoptosis induced by oxidative stress. This study aims to evaluate the expression of HSP70 gene in cumulus cells and immature and *in vitro* matured equine oocytes by the Real-Time quantitative PCR (qRT-PCR). The *Cumulus Oocyte Complexes* were obtained by follicular aspiration from ovaries derived from slaughterhouse. The oocytes were divided into two groups (Grade 1 and Grade 2), according to morphological characteristics, in pools of 62 oocytes. The CCOs were matured for 40h in an incubator at 20% O₂, 38.7°C and 5% CO₂. Evaluation of HSP70 transcription by qRT-PCR showed a higher expression in cumulus cells and immature oocytes Grade 2 than Grade 1. There was no change in HSP70 gene expression between groups immature and *in vitro* matured, both in oocytes and in cumulus cells, demonstrating a genetic stability during the process of *in vitro* maturation of equine oocytes in follicular fluid.

Keywords: Gene expression. qRT-PCR. Cumulus cells. Oocytes. Real-Time PCR.

Lista de Figuras

Figura 1	Projeções das células do <i>cumulus</i> que se estendem através da zona pelúcida e oócito.....	20
Figura 2	Oócitos com células do <i>cumulus</i> expandidas coletados de ovários provenientes de abatedouro (Grau 1).....	20
Figura 3	Oócitos com células do <i>cumulus</i> compactas coletados de ovários provenientes de abatedouro (Grau 2).....	21
Figura 4	Oócitos desnudos coletados de ovários provenientes de abatedouro (Grau 3).....	21
Figura 5	Oócitos desnudos coletados de ovários provenientes de abatedouro.....	22
Figura 6	Corpúsculo polar em oócito equino em MII	24
Figura 7	Diagrama esquemático do gene HSP70.....	30
Figura 8	Aspiração dos folículos ovarianos com auxílio de seringa.....	31
Figura 9	Curva de amplificação produzida por qRT-PCR para o <i>primer</i> HSP70.....	37
Figura 10	Curva de dissociação produzida por qRT-PCR para o <i>primer</i> GAPDH.....	38
Figura 11	Expressão relativa de HSP70 em oócitos equinos.....	39

Figura 12 Expressão relativa de HSP70 em células do *cumulus* de oócitos equinos.....

Lista de Tabelas

Tabela 1	Detalhes dos <i>primers</i> utilizados na reação de qRT-PCR.....	34
Tabela 2	Quantificação de RNA total presente nas amostras com o uso do fluorômetro QuBit®	36

Lista de Abreviaturas e Siglas

ARTs – Técnicas de Reprodução Assistida
CCO – Complexo Cumulus Oócito
cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CP – Corpúsculo Polar
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
eGF – Fator de Crescimento Epitelial
EMMI – Meio de Maturação Equina I
FIV – Fertilização *In Vitro*
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH – Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase
GIFT – Transferência Intrafalopiana de Gametas
GSH – Glutathiona
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HSP70 – Proteína de Choque Térmico 70
HSPs – Proteínas de Choque Térmico (*Heat Shock Protein*)
ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
LH – Hormônio Luteinizante
MII – Metáfase II
MIV – Maturação *In Vitro*
mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro
OH – Radical Hidroxil
PIV – Produção In Vitro de Embriões
PVA – Poli Vinil Álcool
pvs – espaço perivitelínico
QVG – Quebra de Vesícula Germinativa
RNA – Ácido Ribonucleico
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
TCM – Meio de Cultura de Tecidos (*Tissue Culture Medium*)
VG – Vesícula Germinativa
zp – zona pelúcida
µl – Microlitro

Sumário

1 Introdução	13
2 Objetivos	17
2.1 Objetivos gerais.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 Revisão de literatura	18
3.1 Manuseio e o transporte dos ovários de abatedouros.....	18
3.2 Coleta dos oócitos.....	19
3.3 Avaliação morfológica dos complexos <i>cumulus</i> -oócito	20
3.4 Maturação de oócitos	23
3.5 Maturação <i>in vitro</i> de oócitos equinos	26
3.6 Estresse oxidativo	27
3.7 HSP70	30
4 Material e métodos.....	32
4.1 Coleta e seleção dos oócitos.....	32
4.2 Grupos experimentais	33
4.3 Maturação <i>in vitro</i>	33
4.4 Extração de RNA total e confecção de cDNA	34
4.5 PCR em tempo real.....	34
4.6 Análise estatística	35
5 Resultados e discussão.....	37
5.1 Quantificação de RNA	37
5.2 Expressão do gene HSP70	38
6 Conclusões.....	43
Referências	44

1 Introdução

O Brasil um plantel de 5,5 milhões de equinos segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2008). Embora o potencial econômico seja pouco conhecido, a equinocultura forma hoje uma importante interação com setores ligados ao lazer, cultura e turismo, sendo uma das cadeias produtivas que oferece mais oportunidades de trabalho, conquistando posição de destaque na economia nacional, empregando diretamente mais de 600mil pessoas. (CNA, 2003).

A inseminação artificial e a coleta e transferência de embriões são comumente utilizadas na equinocultura, porém técnicas como a superovulação de éguas, congelamento de embriões, fertilização *in vitro* (FIV), transferência de oócitos, transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e congelamento de oócitos, ainda não são comercialmente disponíveis sendo consideradas emergentes. Contudo, são técnicas ideais para a utilização em éguas de performance (hipismo, pólo, adestramento, provas de rédeas, entre outras) e, éguas senis de alto valor, que não possuam bons históricos reprodutivos e capacidade de levar uma gestação a termo (SQUIRES, 2003).

Estudos científicos na produção *in vitro* (PIV) de embriões, utilizando o equino como modelo experimental permitem elucidar a fisiologia embrionária de animais de interesse comercial e até mesmo do homem. Além de permitir a produção de embriões em larga escala, pois, com aumento da popularidade de esportes equestres no Brasil, torna-se oportuna a utilização de biotécnicas reprodutivas pelos criatórios, possibilitando acelerar a seleção animal e o melhoramento genético, como também facilitando a comercialização nacional e internacional de equinos.

Apesar da maturação *in vitro* (MIV) e FIV serem biotécnicas usuais na espécie humana e em diversas espécies domésticas, pouco sucesso tem sido alcançado na espécie equina (CARNEIRO, 2002) havendo o registro de apenas dois potros produzidos por FIV convencional, ambos resultado da fertilização de oócitos maturados *in vivo* (SQUIRES *et al.*, 2003). O escasso número de abatedouros equinos próximos aos laboratórios que realizam pesquisas na área e dificuldades na recuperação dos oócitos dos folículos são os principais entraves no desenvolvimento das Técnicas de Reprodução Assistida (ARTs – *Assisted Reproductive Technologies*) nesta espécie.

As taxas de MIV de oócitos equinos são baixas, quando comparadas com outras espécies domésticas, como bovinos e suínos, obtendo-se entre 40 e 60% de oócitos atingindo o estágio de metáfase II (DELL'AQUILA *et al.*, 1997; CARNEIRO *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2006). As razões para a falha dos oócitos equinos em completar a meiose durante a MIV são desconhecidas, podendo estar ligadas a alterações na cascata bioquímica envolvida na meiose (GOUDET *et al.*, 1998; FERNANDES, 2004).

Vários fatores podem influenciar o ambiente de maturação de oócitos, tais como: composição do meio, presença de soro fetal, a quantidade de embriões por volume de meio e a atmosfera gasosa (KHURANA; NIEMANN, 2000). Dentre esses fatores o estresse oxidativo causado pela alta tensão de oxigênio utilizada durante a PIV tem recebido especial atenção nos últimos anos (ALI *et al.*, 2003, BEDAIWY *et al.*, 2004, FATEHI *et al.*, 2005).

Uma das grandes diferenças entre o ambiente *in vivo* e o *in vitro* é a tensão de oxigênio, visto que no oviduto e no útero a tensão de oxigênio é menor do que a utilizada nos sistemas de cultivo embrionário *in vitro* (VAN SOOM *et al.*, 2002). Recentes evidências demonstram que na PIV de bovinos a alta tensão de oxigênio prejudica gravemente o desenvolvimento dos embriões, estimulando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no citoplasma das células dos embriões (GUÉRIN *et al.*, 2001) e aumentando o grau de lesões no Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (TAKAHASHI *et al.*, 2000, YUAN *et al.*, 2003); um melhor conhecimento dos efeitos moleculares do estresse ambiental poderia melhorar significativamente o êxito final do cultivo de embriões.

As ROS são importantes moléculas resultantes do metabolismo normal da célula que podem ser tanto prejudiciais quanto benéficas para os organismos vivos. Em concentrações baixas ou moderadas elas são importantes para muitos processos fisiológicos, mas em condições de estresse oxidativo, ROS podem danificar lipídeos celulares, proteínas ou DNA, afetando a sua função normal (VALKO et al,2007). O estado de estresse oxidativo ocorre quando existem muitas ROS em relação aos antioxidantes disponíveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Oócitos eqüinos têm como característica grande quantidade de gotas de lipídeo em seu citoplasma em associação com mitocôndrias formando unidades metabólicas que tendem a se acumular no córtex do oócito (AMBRUOSI et al, 2009). Essas observações sugerem que os oócitos e os embriões desta espécie sejam mais sensíveis ao estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A proximidade das células do *cumulus* com o oócito indica uma interação contínua entre eles e, de fato, existem evidências de que as células do *cumulus* agem como uma ferramenta de sinais adicionais para o oócito (MATOS et al, 2009). Elas dão suporte à maturação citoplasmática do oócito através de uma extensa rede de junções gap entre células do *cumulus* e entre as células do *cumulus* e oócito (TANGHE et al, 2002). Além disso, estas células protegem os oócitos de entrarem em apoptose induzida pelo estresse oxidativo (TATEMOTO, 2000).

A resposta ao estresse no nível celular tem sido observada em quase todos os organismos, e sua principal característica é a indução de proteínas do choque térmico (Heat Shock Proteins - HSPs) (BASU et al., 2001). Entre essas, a proteína do choque térmico 70 (HSP70) atua como uma chaperona molecular, mediando a configuração e localização correta de outras proteínas. Desta forma, ela desempenha um importante papel na resposta adaptativa através da proteção das células contra a apoptose induzida por estresse térmico, estresse oxidativo, radiação e toxinas químicas. A HSP70 pode interferir diretamente com a maquinaria apoptótica de uma variedade de formas, mas os mecanismos responsáveis pelos efeitos protetores da HSP70 na injúria produzida por estresse permanecem desconhecidos (ZAO et al., 2007).

A análise da expressão de genes, que estão envolvidos no desenvolvimento inicial embrionário, fornece uma ferramenta importante na evolução de biotecnologias da reprodução assistida. O estudo do RNA mensageiro (mRNA) é

emergente na embriologia, os produtos de genes relacionados a vários processos biológicos necessitam ser estudados quanto as diferenças apresentadas na expressão dos genes *in vivo* e *in vitro*, e sob diferentes meios de cultivo (WRENZYCKI et al., 2005; RIZOS et al., 2008). Neste sentido, a análise da expressão gênica de oócitos e de embriões equinos é de fundamental importância para avaliar os processos de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

O desenvolvimento do presente trabalho é estratégico pelo aproveitamento das potencialidades locais; devido à presença do abatedouro de equinos na cidade de Pelotas e a proximidade da região da campanha, sede de vários haras importantes com material genético de elite na espécie equina.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão do gene relacionado ao processo de estresse oxidativo, HSP-70, em células do *cumulus* e oócitos equinos imaturos e maturados *in vitro* através da biotécnica molecular de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se os níveis de expressão do gene HSP70 são maiores em oócitos maduros, quando comparados aos oócitos imaturos;
- avaliar se ocorre alteração nos níveis de transcrição de HSP70 nos grupos morfológicos de oócitos e células do *cumulus* após a maturação *in vitro*;
- avaliar se existe diferença de expressão do gene HSP70 nos grupos morfológicos de oócitos e células do *cumulus* em estado imaturo.

3 Revisão de literatura

3.1 Manuseio e o transporte dos ovários de abatedouros

Os meios utilizados para o transporte de ovários do abatedouro até o laboratório são cristalóides complementados com antibióticos, solução de fosfato tamponada (PBS), meio de cultivo de tecidos 199 (TCM-199) ou soluções comerciais de lavagem de embriões (FRANZ et al., 2003; PREIS et al., 2004).

Os períodos de armazenamento para transporte variando de 1 a 24 h foram estudados e tem sido demonstrado que o armazenamento de até 15 h não afeta a competência meiótica de oócitos (GUIGNOT et al. , 1999). No entanto, as altas taxas de maturação relatadas por laboratórios onde o tempo de transporte era mínimo sugerem que tempo de transporte dos ovários do abatedouro até o laboratório pode influenciar a qualidade dos oócitos e sua posterior retomada da meiose (LOVE et al., 2003; HINRICHS et al., 2005).

A temperatura de transporte também foi pesquisada. Baseada em estudos morfológicos das células do *cumulus* e a apoptose dessas, tem sido sugerido que os ovários transportados entre 20°C - 30°C e 35°C - 37°C, deveriam idealmente ser processada dentro de 3 h e 2 h, respectivamente (PEDERSEN et al., 2004). Outro estudo mostrou que as taxas de maturação (Metáfase I + II) após 24 h foram maiores em oócitos coletados imediatamente do que para aqueles recuperados após o armazenamento adicional dos ovários por 15 a 18 h a 4°C ou em temperatura ambiente (LOVE et al. 2003). Este estudo também sugere que 4°C é provavelmente uma temperatura muito baixa para um ideal de armazenamento de ovários, exceto quando um longo tempo entre a coleta dos ovários e recuperação dos oócitos não

pode ser evitado. Entretanto, a temperatura mais apropriada para o armazenamento de ovários não foi determinada.

Uma alternativa ao transporte dos ovários é o transporte dos oócitos isolados em uma incubadora portátil na qual os oócitos podem ser colocados em condições de maturação e passam pela MIV durante o seu transporte para o laboratório (LOVE et al., 2003). Devido às suas dificuldades técnicas (instrumentos de coleta no abatedouro, transporte sob temperatura e atmosfera controlada), esse método não é muito difundido, mas poderia otimizar as taxas de maturação de oócitos provenientes de abatedouro (CAILLAUD et al., 2008).

3.2 Coleta dos oócitos

A coleta de oócitos pode ser tecnicamente desafiadora em equinos. A fim de preservar a qualidade de oócitos, cada etapa requer uma preocupação constante para as condições de higiene, temperatura, pH e qualidade dos meios.

Os oócitos podem ser aspirados (SHABPAREH et al., 1993) com uma agulha de calibre 18 e um sistema de aspiração ou uma bomba de vácuo (100-150 milímetros de mercúrio). Alternativamente, os folículos podem ser aspirados e raspados simultaneamente com a ponta de uma agulha de injeção. O ovário pode ser cortado em pequenos pedaços para conseguir acesso a folículos mais profundos no estroma ovariano.

Na égua, o folículo apresenta uma camada de células da teca logo abaixo da junção do *cumulus* à parede folicular. Esta estrutura é caracterizada por processos celulares emitidos pelas células da granulosa para o interior da camada de células tecais. Desta forma, os processos das células da granulosa, bem como a posição da camada de células tecais e a estrutura do componente polissacarídeo desta funcionam como uma âncora para o oócito na parede folicular (HAWLEY et al., 1995). Os oócitos são, portanto, difíceis de separar da parede folicular interferindo na eficiência dos métodos de coleta. Conseqüentemente, a recuperação de oócitos equinos requer incisão dos folículos, raspagem da parede do folículo com o bisel da agulha e lavagem para separar o oócito e suas células vizinhas. Taxas de coleta mais altas, aproximadamente 80%, foram alcançadas usando esta técnica (DEL CAMPO et al., 1995). A maior parte dos oócitos intactos são envolvidos por

camadas de células da granulosa, formando os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) (HINRICHS et al., 1993). Inversamente, os oócitos aspirados muitas vezes só mantêm as células que os envolvem imediatamente (HINRICHS, 1991).

Apesar da raspagem e lavagem, a recuperação de oócitos continua a ser bastante baixa (3-5 oócitos/ovário), sendo 6 a média do número de folículos presentes em um ovário equino (HINRICHS, 1991; DEL CAMPO et al., 1995). Isto também se reflete em um aumento de dez vezes no tempo e equipe de trabalho necessários para a coleta de oócitos equinos versus a de bovinos (GALLI et al., 2007). Todas essas dificuldades técnicas e a escassa disponibilidade de ovários de abatedouro representam grandes limitações para a investigação fundamental em oócitos equinos e, conseqüentemente, para todas as tecnologias que dependem do seu sucesso.

3.3 Avaliação morfológica dos complexos *cumulus*-oócito

Os oócitos coletados podem ser desnudos, entretanto, eles geralmente são cercados por várias camadas de células do *cumulus*. Granulosa e células do *cumulus* são semelhantes em textura. As células *cumulus* mais próximas têm inúmeras projeções penetrando na zona pelúcida e estabelecem contato estreito com o citoplasma (Fig. 1) (GRONDAHL et al., 1995). Os CCOs podem ser caracterizados com base no seu grau de expansão (HINRICHS et al., 1993; GOUDET et al., 1997a; HINRICHS; WILLIAMS, 1997), que está correlacionada com a maturação nuclear do oócito (GOUDET et al., 1997a; GABLE; WOODS, 2001). Os CCOs podem ser classificados de acordo com as células do *cumulus* como: (Grau 1) compacto, camadas de células compactamente dispostas que envolvem completamente o oócito; (Grau 2) expandida, uma camada granular ou expandida de células do *cumulus* que envolve completamente o oócito, ou (Grau 3) desnudos, apenas uma parte do *cumulus* presente ou totalmente ausente (Fig. 2,3,4) (HINRICHS, 1993). Esta bem estabelecido que os folículos são responsáveis pela interrupção meiótica do oócito e isso também foi confirmado em equinos (HINRICHS et al., 1995). Como eles sofrem atresia, os folículos perdem sua capacidade de manter essa interrupção meiótica (BLONDIN; SIRARD, 1995).

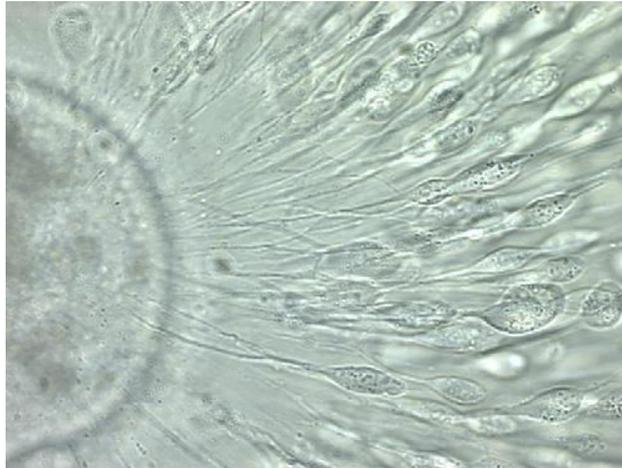


Figura. 1 – Projeções das células do *cumulus* que se estendem através da zona pelúcida e oócito.

Fonte: CARNEVALLE; MACLELLAN, 2006.



Figura 2 – Oócitos coletados de ovários provenientes de abatedouro com células do *cumulus* expandidas (Grau 1).

Fonte: Próprio autor, 2010.

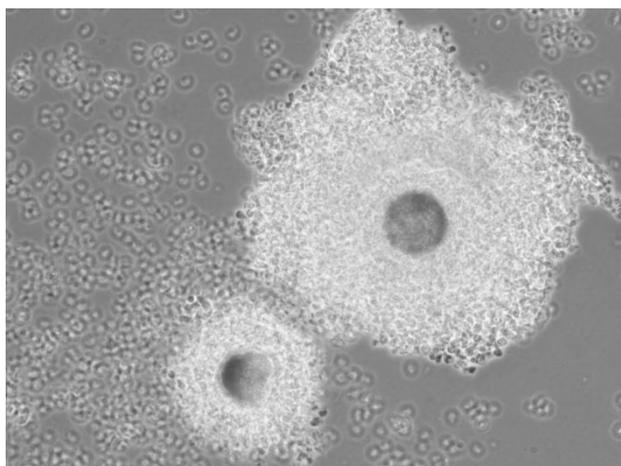


Figura 3 – Oócitos coletados de ovários provenientes de abatedouro com células do *cumulus* compactas (Grau 2).

Fonte: Próprio autor, 2010.



Figura 4 – Oócitos desnudos coletados de ovários provenientes de abatedouro (Grau 3).

Fonte: Próprio autor, 2010.

As células *cumulus* diretamente ao redor do oócito são chamadas de corona radiata; estas células são frequentemente as últimas a expandir resultando em uma imagem típica de um anel celular em volta do oócito (Fig. 5). As células do *cumulus* desempenham um papel essencial na maturação dos oócitos e no desenvolvimento embrionário inicial. Exceto para a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), a sua presença é necessária para todas as técnicas que envolvem a

transferência de oócitos, tornando a avaliação morfológica do oócito difícil de ser executada.

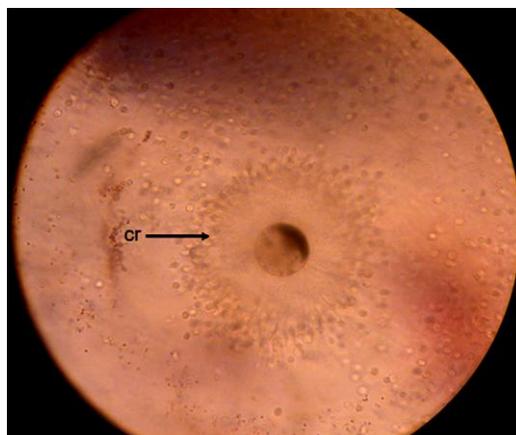


Figura 5 – Oócito equino exibindo as células da corona radiata (cr) expandidas.

Fonte: CARNEVALLE; MACLELLAN, 2006.

O oócito pode ter o seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado pela aparência do CCO. Morfologicamente, os oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar citoplasma homogêneo com granulações finas, de coloração marrom e completamente envolvidos por várias camadas de células do *cumulus* dispostas de forma compacta. Entretanto, há grandes variações quanto aos padrões morfológicos da qualidade de oócito entre as espécies. Por exemplo: oócitos viáveis de camundongos apresentam citoplasma claro, quase sem granulações, enquanto que em eqüinos, suínos e cães, observa-se citoplasma escuro e as granulações podem apresentar-se de forma heterogênea devido à quantidade e distribuição dos lipídeos citoplasmáticos (CARNEIRO et al., 2002a).

3.4 Maturação de oócitos

A transição do oócito do estágio de vesícula germinal (VG) até metáfase II (MII) é referida como maturação oocitária. Este processo consiste em uma complexa sequência de eventos nucleares e citoplasmáticos que preparam o oócito para a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (FISSORE et al., 2002) e ocorre

em duas fases. A primeira fase que confere ao oócito a capacidade de reiniciar a meiose é conhecida como fase de crescimento (CRAN; MOOR, 1990). O oócito é ativado provavelmente pela transmissão de sinais estimulatórios diretamente pelas células do *cumulus*. A ativação oocitária causa uma intensa atividade transcricional de Ácido Ribonucleico (RNA), excedendo a necessidade momentânea da célula. Desta forma a maior parte deste RNA não é traduzido e sim estocado no citoplasma sob uma forma estável, ou seja, sem a poliadenilação que é requerida para tradução. A tradução das informações contidas no RNA ocorre imediatamente antes e após a fertilização, dando suporte a finalização da meiose e ao desenvolvimento embrionário (PAYNTON; BACHVAROVA, 1990; CRAN; MOOR, 1990). Desta maneira, durante esta fase de crescimento, a alta atividade de transcrição acumula macromoléculas e a pequena quantidade de RNA que é traduzida, suporta e regula a síntese de proteínas e a formação de organelas, tais como: mitocôndrias, ribossomos, grânulos corticais e vesículas contendo fontes energéticas, diferenciando a célula em um gameta funcional (PAYNTON; BACHVAROVA, 1990; EPPIG, 1991). Durante esta fase de crescimento a célula germinativa feminina apresenta um aumento de cinco vezes em seu diâmetro (100 a 120 μ m de diâmetro), permanecendo no estágio meiótico de diplóteno ou vesícula germinativa na prófase I (CRAN; MOOR, 1990).

Caracterizada pelo reinício da meiose, a segunda fase é normalmente denominada de maturação final e ocorre após a puberdade no folículo pré-ovulatório. Esta fase envolve modificações nucleares e citoplasmáticas que irão resultar na formação de um gameta com capacidade de ser fertilizado (SATHANANTHAN, 1994). Entende-se como maturação nuclear as mudanças que ocorrem no núcleo do oócito, mais especificamente a duplicação e divisão do DNA, e é iniciada pela condensação da cromatina e dissolução da membrana nuclear. Este processo também é conhecido como quebra da vesícula germinativa (QVG). Ocorre a duplicação dos centríolos e os cromossomos, em pares diplóides, que encontravam-se livres no citoplasma, migram para região equatorial (metáfase I). O ovócito primário sofre então duas divisões meióticas. Na primeira divisão, duas células filhas são formadas, mas uma delas contém quase todo citoplasma e constitui o oócito propriamente dito. A outra, muito menor, é expulsa para o espaço perivitelino, sendo conhecida como corpúsculo polar (CP), que além de

cromossomos, contém uma variedade de organelas, incluindo mitocôndrias, ribossomos e grânulos corticais. Inicia-se, então, o segundo período de repouso da divisão meiótica que só será completada com a penetração espermática e extrusão do segundo CP e finalização da meiose (GORDON, 1994). A observação do CP sob estereomicroscópio é difícil, mas ocasionalmente pode ser visto no espaço perivitelínico (Fig. 6). A coloração específica de DNA, como com Hoechst 33258, pode ser realizada permitindo o exame da cromatina (HINRICHS et al., 1993; GOUDET et al., 1998b).

A fertilização de um oócito exige tanto a sua maturação nuclear quanto citoplasmática. A maturação nuclear é alcançada quando estágio de metáfase II da meiose é atingido e ela pode reiniciar espontaneamente quando oócitos são retirados do seu ambiente inibitório folicular. O critério fundamental de competência oocitária é sua capacidade de ser fecundado e desenvolver um embrião viável. A falta de um sistema eficiente de produção *in vitro* de embriões limitou a avaliação da maturação nuclear de oócitos. Alguns estudos investigaram as alterações citoplasmáticas observadas durante a maturação nuclear, como a migração de grânulos corticais ou mitocôndrias (GRONDAHL et al., 1995; GOUDET et al., 1997a; AGUILAR et al., 2002; CARNEIRO et al., 2002), porém, eles não mediram a sua significância para a competência de desenvolvimento do oócito.



Figura 6 – O corpúsculo polar (pb) é visível na oócito na MII. O citoplasma adjacente ao corpúsculo polar é achatado, e o espaço perivitelínico (pvs) é visível. Zona pelúcida (zp).

Fonte: CARNEVALLE; MACLELLAN, 2006.

A maturação citoplasmática depende do acúmulo de proteínas e mRNA (GRONDAHL et al., 1993). Como já mencionado, uma vez que os oócitos são retirados do seu meio ambiente folicular há a perda do efeito inibitório da meiose e eles condensam sua cromatina. Isto pára a transcrição e subseqüentemente a produção de proteína. Conseqüentemente, as proteínas e mRNA armazenados devem obviamente estar completos antes do reinício da meiose e que a quebra da vesícula germinativa seja induzida (SIRARD, 2001). Com base nessa observação, oócitos bovinos foram cultivados sob condições que mantêm temporariamente a inibição meiótica, mas que permitem a maturação citoplasmática, o que se traduziu em uma melhoria na competência de desenvolvimento (FOULADI NASHTA et al., 1998, HASHIMOTO et al., 2002). Uma abordagem semelhante tem sido considerada para equinos (FRANZ et al., 2003), mas o efeito sobre a maturação citoplasmática foi apenas estudado em pequeno número (HINRICHS et al. 2006; HINRICHS et al., 2007). Uma melhor compreensão dos mecanismos de controle da inibição meiótica poderia certamente levar a novas estratégias de MIV baseada em uma melhor sincronização dos eventos de maturação nuclear e citoplasmática *in vitro*.

3.5 Maturação *in vitro* de oócitos equinos

Apesar da MIV e FIV serem biotécnicas usuais na espécie humana e em diversas espécies domésticas, há registro de apenas dois potros produzidos por FIV convencional, ambos resultado da fertilização de oócitos maturados *in vivo* (PALMER et al., 1991). Considerando que oócitos equinos adquirem competência para fertilização *in vitro* após maturados *in vivo*, o processo de maturação parece ser um ponto crítico na produção *in vitro* de embriões equinos.

A maioria dos meios utilizados para a MIV de oócitos equinos são derivados daqueles utilizados na espécie bovina. Desde o primeiro oócito equino maturado *in vitro*, uma variedade de meios incluindo meios de cultura de tecidos sintéticos como o TCM-199 (GALLI et al. 2001), ou Ham's F10 (SHABPAREH et al., 1993) foram investigados. A maioria dos meios de MIV atuais são baseados no TCM-199, meio de maturação equina I (EMMI) e na adição de soro fetal bovino e de vários hormônios como o estradiol, Hormônio Luteinizante (LH) e Hormônio Folículo Estimulante (FSH) (CARNEVALE et al., 2004b) ou fator de crescimento epidérmico

(EGF) (GOUDET et al. 1998a; LORENZO et al., 2002). Alguns estudos investigaram os efeitos de coculturas na MIV (HINRICHS et al., 1995, LI et al., 2001, CHOI et al., 2002b; TREMOLEDA et al., 2003) proporcionando uma melhor compreensão dos mecanismos de controle da inibição meiótica dentro do folículo, mas não conseguiram demonstrar uma melhora significativa na maturação dos oócitos.

No equino, como em outras espécies de mamíferos, uma nova síntese de proteínas é necessária para a passagem de metáfase I a metáfase II. Isto inclui as proteínas necessárias para completar a Metáfase I - extrusão do corpúsculo polar – e o recomeço da meiose II. (ALM; TORNER, 1994). A retomada da meiose envolve além da síntese, a fosforilação de proteínas, e a cicloheximida, a qual inibe a peptidil transferase e suprime reversivelmente a maturação oocitária por bloqueio na síntese de proteínas estágio específicas. São poucos os trabalhos em equinos enfatizando o efeito da supressão meiótica do oócito. Sabe-se que com a supressão, o oócito permanece mais tempo na fase de crescimento, acumulando RNA para as fases seguintes (HINRICHS et al., 1995).

As razões para a falha dos oócitos equinos em completar a meiose durante a maturação *in vitro* são desconhecidas, mas podem estar ligadas a uma alteração da cascata bioquímica envolvida na meiose (GOUDET et al., 1998a).

3.6 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas a partir das reações de redução do oxigênio (O_2) e constituem parte dos radicais livres. As principais ROS são os radicais superóxido (O_2^-) e hidroxil (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que correspondem à redução por um, três e dois elétrons, respectivamente (GUÉRIN et al., 2001). A produção de radicais livres faz parte da fisiologia da célula, porém em excesso podem causar danos às mesmas, levando ao estresse oxidativo.

A produção de ROS pode ter origem diretamente a partir de gametas e embriões ou através do ambiente. Vários fatores podem contribuir para aumentar a produção das ROS, entre eles pode-se destacar a concentração de oxigênio, o contato com a luz, o excesso de manipulação e os espermatozoides (GUÉRIN, 2001).

O oxigênio chega ao embrião por difusão passiva, que é regulada principalmente pela tensão de oxigênio no ambiente. O oxigênio é um substrato para a fosforilação oxidativa e à medida que mais oxigênio está disponível, a integridade dos complexos da membrana mitocondrial é comprometida quando os elétrons de alta energia são indevidamente transferidos para outras moléculas à medida que são canalizados ao longo da cadeia de transporte de elétrons, gerando ROS. Maiores níveis de ROS são expostos aos complexos da membrana causando estresse oxidativo e danos ao DNA mitocondrial em níveis que podem estacionar o desenvolvimento embrionário (CATT; HENMAN, 2001).

A tensão de O_2 utilizada nos sistemas de cultivo pode ser até quatro vezes maior que a do oviduto, elevando a atividade das oxidases, e conseqüentemente a quantidade de radicais O_2^- no meio (GUÉRIN et al., 2001), o que pode afetar a quantidade dos embriões produzidos. Para avaliar o efeito da tensão de oxigênio na produção de embriões suínos, Kitagawa et al. (2004) utilizaram 5 % e 20% de O_2 no cultivo *in vitro* e encontraram maior taxa de produção quando a tensão foi menor. Neste mesmo estudo, a produção de ROS também foi avaliada nos dois ambientes de cultivo através da quantificação de H_2O_2 produzida no meio, que se apresentava em menor concentração quando o cultivo foi feito sob 5% de O_2 . Yuan et al. (2003), também avaliaram a produção de embriões bovinos sob 5% e 20% de O_2 e seus resultados mostraram maior taxa de produção até a fase de mórula, sob alta tensão de oxigênio, sendo que em D7 os resultados se inverteram, resultando numa maior produção de blastocistos sob baixa tensão de O_2 , além disso, a quantidade de células apoptóticas nos embriões produzidos sob 20% de O_2 foi maior.

Estudos mostram que o cultivo *in vitro* altera a expressão de genes imprintados em embriões de murinos (DOHERTY et al., 2000) e bovinos (BERTOLINI et al., 2002). Calabrese et al. (2005) sugerem que os efeitos epigenéticos e a perturbação do metabolismo mitocondrial podem influenciar os fatores de transcrição devido à geração de ROS e dano oxidativo. O ambiente de cultivo *in vitro* pós-fertilização no qual o embrião está se desenvolvendo pode ter sérios efeitos no desenvolvimento (FEIL et al., 2006), com a concentração de oxigênio utilizada durante o cultivo *in vitro* de embriões citada como exercendo grande influência sobre o desenvolvimento do embrião e da expressão genética deste (HARVEY et al., 2004).

O estresse oxidativo é responsável por diferentes tipos de danos nas células dos embriões e estes danos podem alterar várias moléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. O aumento na produção de ROS induz a peroxidação lipídica (com efeito direto nas divisões celulares, no transporte de metabólitos e disfunção mitocondrial), levando à oxidação de proteínas, e automaticamente à inativação de enzimas, além de induzir a fragmentação do DNA nuclear. As consequências desses danos oxidativos podem ser evidenciados no desenvolvimento retardado dos embriões, nas disfunções metabólicas e até mesmo no aumento e aceleração da apoptose (GUÉRIN et al., 2001). Kitagawa et al. (2004), avaliando a fragmentação do DNA de embriões suínos sob diferentes tensões de O₂ e na presença de antioxidantes (β -mercaptoetanol e vitamina E), verificaram que danos menores ocorreram nos embriões produzidos sob baixa tensão de oxigênio. Entretanto, a presença dos antioxidantes no meio reduziu os danos oxidativos quando os embriões foram cultivados em alta tensão de O₂.

Substâncias como o fluido folicular, fluido do oviduto ou enzimas podem ser adicionados aos meios durante o processo de produção dos embriões atuando como defesas antioxidantes. Antioxidantes são definidos como qualquer substância que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação deste. Os antioxidantes podem ser divididos em compostos não-enzimáticos (glutathiona/GSH, taurina e hipotaurina e piruvato, entre outros) e enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase) (GUÉRIN et al., 2001).

Os compostos tióis de baixo peso molecular, como a cisteamina e β -mercaptoetanol, quando presentes na MIV de oócitos bovinos e ovinos, estimulam a síntese de glutathiona (GSH), aumentando os índices de desenvolvimento embrionário (DE MATOS et al., 1996, 2003). A GSH presente nas células de mamíferos tem o importante papel de proteção contra o dano produzido pelo estresse oxidativo. Em trabalho realizado por Leon et al. (2007), a adição de cisteamina, na concentração de 100 μ M, ao meio de MIV de oócitos equinos aumentou a taxa de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II.

3.7 HSP70

A resposta ao estresse ao nível celular tem sido observada em quase todos os organismos, e sua principal característica é a indução de proteínas do choque térmico (Heat Shock Proteins - HSPs) (BASU et al., 2001). A proteína do choque térmico 70 (HSP70) desempenha um papel importante na resposta adaptativa protegendo células contra a apoptose induzida por estresse térmico, estresse oxidativo, radiação e toxinas químicas.

A síntese das HSPs ocorre rapidamente após a exposição do organismo a estresses externos, térmicos ou não, com o objetivo de manter a homeostase celular e a conformação das proteínas intracelulares, bem como evitar a desnaturação e a má formação de proteínas durante sua síntese, além de proverem a organização, translocação e ação de chaperonas acompanhantes de proteínas até seus sítios definitivos (FEHRENBACH; NIESS, 1999).

As HSPs estão entre as mais abundantes e conservadas proteínas na natureza possuindo uma elevada conservação da sua sequência de aminoácidos. Suas funções em diferentes organismos são geralmente similares, assim como suas características estruturais e seus pesos moleculares (QUEIROZ, 2001). Elas atuam como chaperonas moleculares, mediando o correto dobramento, montagem, reparação, translocação através da membrana celular e degradação de outras proteínas (MAK, 1998).

As HSP70 contêm dois domínios principais. O domínio N-terminal ATPase é mais conservado (cerca de 64% entre HSP70 de eucarióticos) enquanto que a parte C-terminal é ocupada por um domínio mais variável que liga peptídeos. As regiões são ligadas por sítios protease-sensível (Fig. 7) (MAK, 1998).

As proteínas pertencentes à família das HSP70 tanto auxiliam para garantir um dobramento adequado de cadeias de polipeptídeo quanto desempenham uma função essencial na importação de proteínas para as mitocôndrias e para o retículo endoplasmático se ligando à proteína precursora, sem sua conformação nativa, durante o transporte. A liberação de polipeptídeos recentemente sintetizados da família HSP70 necessita de hidrólise de ATP, e justifica parcialmente a dependência desse gasto de energia durante os estágios subsequentes de importação para a mitocôndria (MAK, 1998).

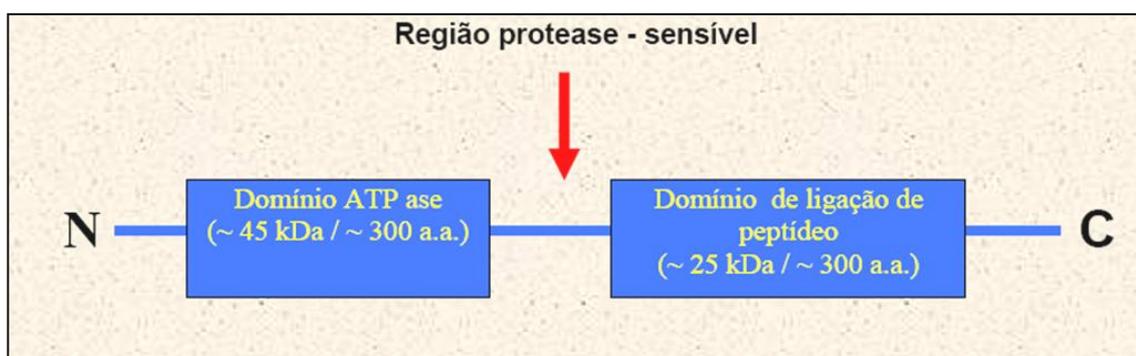


Figura 7 – Diagrama esquemático do gene HSP70.

Fonte: MAK, 1998.

Pretheeban et al. (2009) verificaram uma expressão do gene HSP70 mais abundante em embriões grau I de novilhas em comparação a vacas maduras. Além disso, uma expressão mais baixa foi observada em embriões de grau II de novilhas do que em embriões grau I de novilhas. Isso indica uma possível correlação entre embriões de boa qualidade e aumento da expressão de HSP70 em vacas leiteiras.

Em relação à expressão de HSP70 em embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*, alguns resultados contrários foram publicados. Knijn et AL. (2002) não encontraram diferenças, enquanto que Wrenzycki et al. (2001) detectaram aumento no nível de transcrição após cultivo *in vitro*. Em adição, a variação na abundância relativa de HSP70 em embriões cultivados *in vitro* em diferentes meios de cultura tanto como com diferentes suplementos foram descritos (WRENZYCKI et AL., 2001).

Quando a HSP70 é expressa sob várias condições de estresse, a sua síntese aumenta a capacidade das células estressadas a enfrentar o aumento da concentração de proteínas desdobradas ou desnaturadas. HSP70 também foi mostrada inibindo a apoptose, aumentando assim a sobrevivência de células expostas a uma ampla gama de estímulos letais por interagir diretamente com vários elementos de morte celular programada (PARCELLIER et al., 2003).

4 Material e métodos

4.1 Coleta e seleção dos oócitos

Os CCOs foram coletados de ovários procedentes de abatedouro localizado na cidade de Pelotas/RS. O tempo decorrente entre o abate e a coleta foi de aproximadamente 1 hora. Os ovários foram transportados em recipiente térmico com solução 0,9% de NaCl estéril à 32 – 35°C, até o laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, localizado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPel.

Folículos com tamanhos entre 10 a 30mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de seringa de 20ml e agulha 40 x 1.2, e colocado em tubos falcon de 50ml para decantação (Fig. 8).



Figura 8 – Aspiração dos folículos ovarianos com auxílio de seringa.

O material celular decantado foi colocado em placa de petri para procura dos CCOs em lupa estereomicroscópica sendo mantidos em fluido folicular. Logo após a

coleta, os oócitos foram avaliados quanto ao número de camadas e grau de compactação das células do *cumulus*, homogeneidade do citoplasma e integridade da zona pelúcida, sendo divididos em dois grupos: Grau 1, considerados morfológicamente saudáveis (oócitos com *cumulus* compacto e mais de 3 camadas de células, citoplasma homogêneo e zona pelúcida íntegra) (Fig.3), e Grau 2, considerados morfológicamente menos viáveis (oócitos que apresentarem menos de 3 camadas de células do *cumulus* e/ou *cumulus* expandido, zona pelúcida fragmentada e/ou citoplasma heterogêneo) (Fig.4).

4.2 Grupos experimentais

Foram selecionados *pools* de 62 oócitos para cada grupo morfológico (Grau 1 e Grau 2), sendo cada *pool* considerado como uma unidade amostral. Os *pools* foram divididos em dois grupos: imaturos, os quais foram submetidos aos processos iniciais de extração de RNA logo após a coleta; e maturos, os quais foram submetidos a maturação *in vitro* seguida dos procedimentos iniciais de extração de RNA (imersão em nitrogênio líquido).

De cada *pool* de oócitos foram coletadas células do *cumulus*, sendo separadas dos oócitos através de pipetagem com solução de 80UI de hialuronidase Tipo I-S (Sigma[®]- Aldrich, Alemanha). Cada grupo de células (Grau 1, Grau 2, imaturo e maturo) foi submetido às mesmas condições de maturação *in vitro* e/ou extração de RNA que os oócitos equinos correspondentes.

4.3 Maturação *in vitro*

A maturação *in vitro* foi realizada em placa de petri 35 x 10mm tratadas com polistireno (Nunc[®], Dinamarca), contendo um número máximo de 20 oócitos em cada gota. Os CCOs foram maturados em gotas com 200µl de fluido folicular submersas em óleo mineral (BØGH et al., 2002). Os oócitos foram incubados durante 40 horas em estufa a 38,7°C e 5% de CO₂ em atmosfera umidificada (HealForce[®] HF160W, China). Após este período de incubação, os CCOs tiveram

suas células do *cumulus* retiradas por pipetagem em solução de 80UI de hialuronidase Tipo I-S (Sigma[®]- Aldrich, Alemanha).

4.4 Extração de RNA total e confecção de cDNA

Após o período de maturação *in vitro*, foi realizada a extração de RNA das amostras de CCOs para avaliação da expressão do gene HSP70 por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). A extração do RNA total das amostras foi realizada utilizando o Reagente de *TRIzol*[®] (Invitrogen, EUA) segundo protocolo proposto por Kang et al. (2009), com modificações. Os *pools* de oócitos foram submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido com 100µl de reagente *TRIzol*[®]. Após o período de armazenamento, foram acrescentados a essa solução 500µl de *TRIzol*[®] e 200µl de Clorofórmio (Sigma[®]- Aldrich, Alemanha) sendo logo após submetidos a centrifugação a 12.000g por 15 min a 4°C. Em seguida, a fase aquosa contendo RNA foi coletada e precipitada com 250µl de Isopropanol (Sigma[®]- Aldrich, Alemanha). Foi realizada nova centrifugação a 12.000g por 10 min a 4°C, após a qual o *pellet* foi lavado com etanol a 75% e novamente submetido a centrifugação (7.500g por 5 min a 4°C). O excesso de etanol foi removido a temperatura ambiente e o *pellet* foi ressuscitado em 25µl de água DNase e RNase free. O RNA extraído foi quantificado com o fluorômetro QuBit™ (Invitrogen[®], EUA).

As amostras de RNA foram, então, submetidas à reação de transcriptase reversa (RT-PCR) para obtenção de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) seguindo as instruções do manual do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*[®] (Applied Biosystems, EUA). O cDNA sintetizado foi então utilizado como template na reação de qRT-PCR.

4.5 PCR em tempo real

Os *primers* HSP70 (ZHANG et al., 2009) e HSP70.1 (CAMARGO et al., 2007) específicos para o gene HSP70 em bovinos foram selecionados. Porém, não houve amplificação para *primer* HSP70.1 em testes de padronização através de

PCR padrão com oócitos equinos, sendo usado no estudo o *primer* desenhado por Zhang. et al. (2009).

A qRT-PCR foi realizada utilizando o termociclador 7300 Real-Time PCR System[®] (Applied Biosystems, EUA) e protocolo de detecção baseado na amplificação com SYBR[®] Green (Applied Biosystems, EUA). A reação foi otimizada seguindo os seguintes parâmetros: 94° C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de 94° C por 10 segundos, 61,5° C por 35 segundos e 72° C por 2 minutos. A Quantificação Relativa da reação foi feita utilizando-se o gene endógeno Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase (GAPDH) (OPIELA et al., 2008) como normalizador da reação (Tab. 1). Foi realizada Eletroforese em Gel de Agarose a 1% para confirmação do tamanho dos produtos amplificados e detecção de amplificações inespecíficas e dímeros de *primer*. Para o gene HSP70 o tamanho esperado para o produto de amplificação é de 425pb e de 150pb para o gene GAPDH. Cada amostra de cDNA foi amplificada independentemente na mesma placa e nas mesmas condições experimentais, em duplicata. O nível de expressão do gene alvo normalizado pela referência foi calculado através do software REST 2008 v2.0.7 (Corbett Research, Austrália).

Tabela 1 – Detalhes dos *primers* utilizados na reação de qRT-PCR

<i>Primer</i>	Sequência	Tam. do produto	Nº de acesso ao GeneBank
GAPDH	F 5'-GCC GTA ACT TCT GTG CTG TG-3' R 5'-AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG-3'	150 pb	DQ403064.1
HSP70 (ZHANG et al., 2009)	F 5' -TACAAAGGGGAGACCAAGGC-3' R 5'-TTCCTCTTGA ACTCCTCCAC-3'	425 pb	XM_001492096.1
HSP70.1 (CAMARGO et al., 2007)	F 5'-ACAAGATCACCATCACCAACG-3' R 5'-TCC TTC TCC GCC AAG GTG TTG-3'	275 pb	XM_001491883.1

4.6 Análise estatística

Os dados da expressão gênica foram analisados através do REST 2008 v2.0.7 (Corbett Research, Austrália) a partir dos valores de Ct (threshold cycle)

obtidos na reação de qRT-PCR. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados como diferença estatística significativa. Os cálculos foram feitos para comparar a abundância de transcrição do gene analisado em: (a) oócitos imaturos em relação aos maduros; (b) oócitos de Grau 1 em relação ao Grau 2; (c) oócitos imaturos de Grau 1 com relação aos maduros de Grau 1; (d) oócitos imaturos de Grau 2 com relação aos maduros de Grau 2; (e) oócitos imaturos de Grau 1 com relação aos imaturos de Grau 2; e (f) oócitos maduros de Grau 1 com relação aos maduros de Grau 2. O programa estatístico GraphPad Prism v5.01 (GraphPad, EUA) foi utilizado para confecção dos gráficos.

5 Resultados e discussão

5.1 Quantificação de RNA

Com o objetivo de padronizar a quantidade de oócitos em cada *pool* foi realizada a quantificação de RNA buscando o número mínimo de oócitos que permitisse esta quantificação através do fluorômetro QuBit®. Os resultados das concentrações de RNA total para as amostras estão demonstrados na Tab. 2. As amostras de oócitos e células do *cumulus* do Grupo 1 possuem concentração maior de RNA proporcional que seus correspondentes no Grupo 2, indicando que oócitos e células do *cumulus* Grau 1 possuem maior número de transcritos podendo estar mais ativos.

Tabela 2 – Quantificação de RNA total presente nas amostras com o uso do fluorômetro QuBit®.

Amostra	Número de oócitos	ng/ml	µg/ml
Oócitos Maturados Grau 1	31	133	2,65
Oócitos Maturados Grau 2	53	123	2,47
Oócitos Imaturos Grau 1	25	157	3,15
Oócitos Imaturos Grau 2	39	87,4	1,79
<i>Cumulus</i> maduros Grau 1	provenientes de 31 CCOs	790	16
<i>Cumulus</i> maduros Grau 2	provenientes de 53 CCOs	309	6,18
<i>Cumulus</i> imaturos Grau 1	provenientes de 25 CCOs	27,2	0,545
<i>Cumulus</i> imaturos Grau2	provenientes de 39 CCOs	< 20	< 0,5

Em amostras com menos de 30 oócitos a baixa concentração de RNA não pode ser realizada a quantificação de RNA. De acordo com grupos previamente formados e com os valores de concentração de RNA que estão demonstrados na Tab. 2 determinou-se o número de 62 oócitos para cada unidade amostral.

5.2 Expressão do gene HSP70

Os níveis de transcrição de genes importantes no desenvolvimento podem ser ligados à qualidade oocitária e conseqüentemente usados para a avaliação das condições de cultivo (WRENZYCKI et al., 2005). Neste trabalho, o gene HSP70 foi investigado em células do *cumulus* e oócitos equinos maturados *in vitro* em líquido folicular.

A curva produzida pela reação do *primer* específico para o gene HSP70 está exemplificada na Fig. 9.

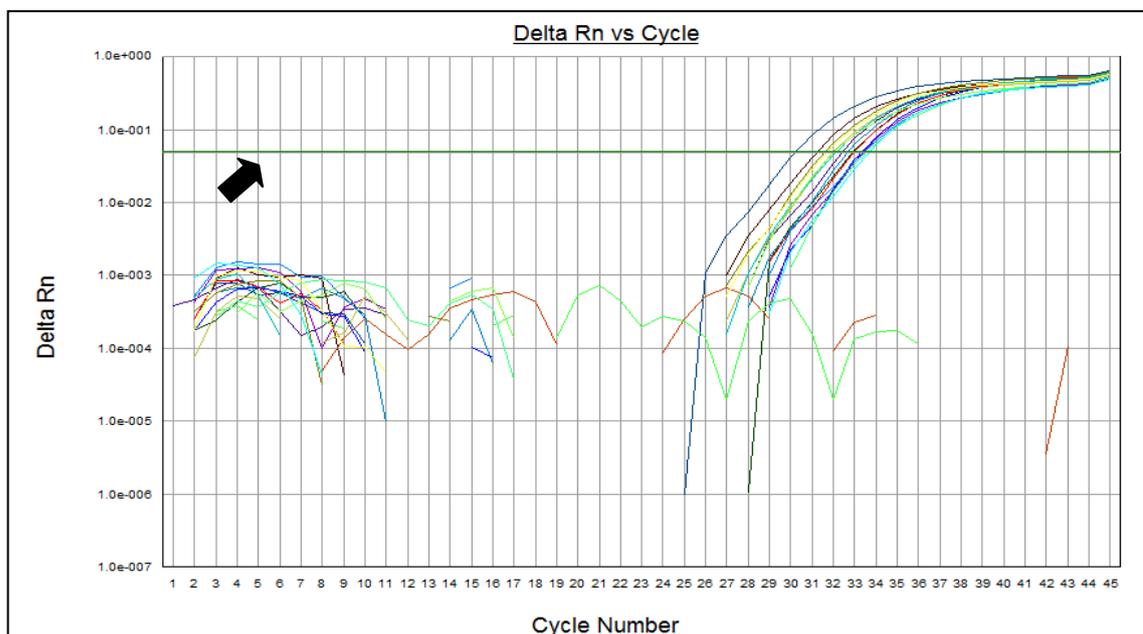


Figura 9 – Curva de amplificação produzida por qRT-PCR para o *primer* HSP70 através do programa *Sequence Detection Software*[®] (Applied Biosystems, EUA). A linha verde (*threshold*) indicada pela seta marca o valor da intensidade de fluorescência durante a fase de amplificação exponencial em que todas as amostras foram comparadas. O ciclo em que cada curva atravessa o limiar de fluorescência (Ct) serve como base para a comparação entre as amostras.

A curva de dissociação para o *primer* GAPDH é mostrada na Fig. 10 evidenciando a presença de apenas um pico resultante de uma amplificação específica.

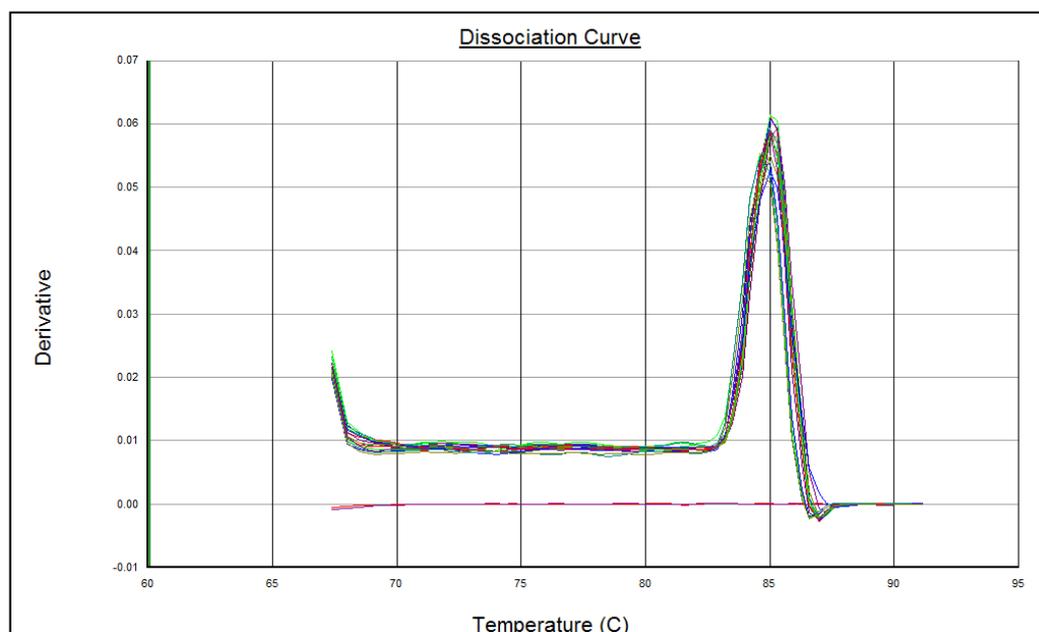


Figura 10 – Curva de dissociação produzida por qRT-PCR para o *primer* GAPDH através do programa *Sequence Detection Software*[®] (Applied Biosystems, EUA). Apenas um pico é evidenciado resultante da amplificação específica com este *primer*.

Os níveis de transcrição de genes importantes no desenvolvimento podem ser ligados à qualidade oocitária e conseqüentemente usados para a avaliação das condições de cultivo (WRENZYCKI et al., 2005). Neste trabalho, a expressão do gene HSP70 foi analisada em células do *cumulus* e oócitos equinos imaturos e maturados *in vitro* em líquido folicular.

Neste estudo foram utilizados 248 oócitos divididos nos grupos amostrais em *pools* contendo 62 oócitos cada. Foram realizados dois experimentos em momentos diferentes para avaliar o padrão de expressão do gene HSP 70.

A análise da expressão relativa do gene HSP 70 em oócitos equinos não demonstrou diferença estatística entre o grupo imaturo e aquele que foi maturado *in vitro* (Fig. 11a), demonstrando uma estabilidade gênica durante o processo de maturação em fluído folicular. Em trabalho realizado por Warzych et al (2007) com maturação de oócitos bovinos em meio TCM199 foram encontrados níveis

constantes dos transcritos de HSP70 em oócitos imaturos e maturados *in vitro*. Porém, com oócitos maturados em meio suplementado com soro fetal bovino um aumento no nível de mRNA em comparação com a suplementação com Poli Vinil Álcool (PVA) foi observada (WRENZYCKI, 2005b).

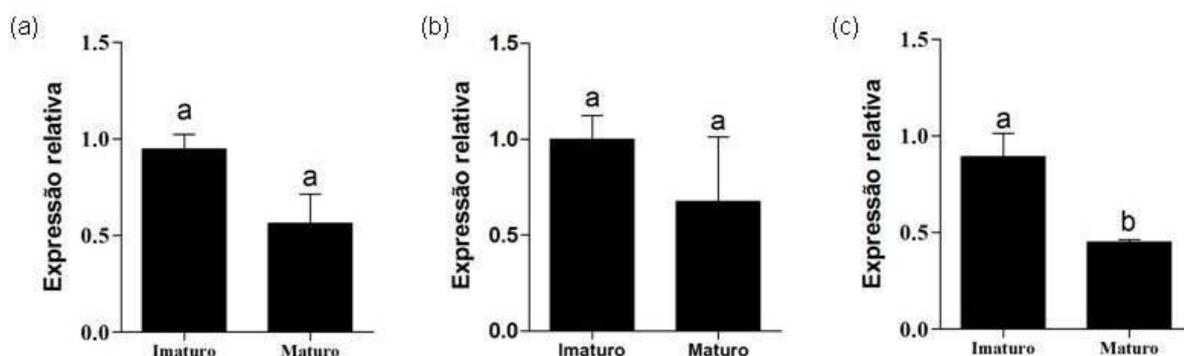


Figura 11 – Expressão relativa de HSP70 em oócitos equinos. (a) Expressão do gene HSP70 quanto ao estágio de maturação do oócito. (b) Expressão do gene HSP70 em oócitos Grau 1. (c) Expressão do gene HSP70 em oócitos Grau 2.

Não houve diferença significativa na expressão de HSP70 entre oócitos Grau 1 imaturos e maturados *in vitro* (Fig. 11b). Entretanto, nos oócitos Grau 2 verificou-se uma maior expressão em oócitos imaturos do que em oócitos maturados *in vitro* (Fig. 11c). A maior expressão nos oócitos Grau 2 pode ser devida a excesso de força mecânica durante a aspiração e lavagem dos folículos, fazendo com que oócitos competentes perdessem toda ou a maior parte das suas camadas de células do *cumulus*. Estes CCOs lesados podem ter sido classificados como Grau 2, aumentando os índices para este grupo quando poderia não haver diferença nos níveis de expressão entre os Grau 1 e Grau 2.

Atualmente, a avaliação da qualidade dos oócitos para a produção *in vitro* de embriões é baseada em critérios morfológicos que são substancialmente subjetivos e são, então, imprecisos (MATOS, 2009). Eles provavelmente participam nos baixos resultados nas taxas de sucesso da maturação *in vitro* de oócitos equinos, as quais alcançam em média 50% (BOGH et al, 2002; DELEUZE et al, 2009), sendo consideradas baixas quando comparadas com outras espécies como bovinos, caprinos e suínos ($\geq 90\%$) (GOUDET, 2000).

Foi comprovado por Lánská et al (2006) que oócitos suínos ao fim da fase de crescimento da maturação possuem uma grande quantidade de HSP70 e que estes oócitos são incapazes de induzir nova síntese de HSP70 devido a parada meiótica. Isto sugerindo que a HSP70 é importante para a maturação meiótica, e que oócitos em maturação quando expostos à condições de estresse, utilizam as proteínas previamente sintetizadas para a proteção dos seus processos celulares.

Com relação à expressão de HSP70 nas células do *cumulus*, não foi observada diferença na expressão entre as células derivadas de oócitos imaturos e aquelas que passaram pelo processo de maturação *in vitro* (Fig. 12a) acompanhando o resultado obtido em oócitos. TESFAYE et al (2009) observaram um aumento na expressão de HSP70 e de HSP90, outra proteína também relacionada com a resposta celular ao estresse, em células do *cumulus* de oócitos bovinos que foram maturados *in vitro* comparando-se estas com a expressão em células do *cumulus* provenientes de oócitos bovinos imaturos. Entretanto, neste trabalho não foi analisada a expressão destes genes nos oócitos.

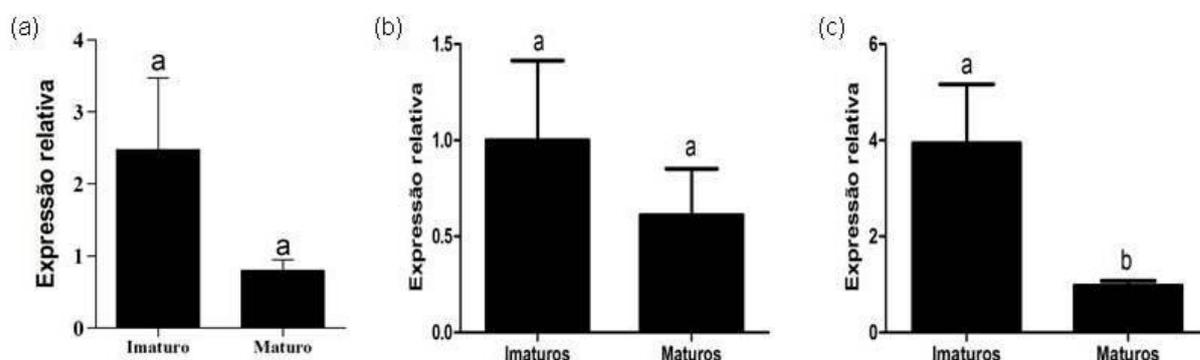


Figura 12 – Expressão relativa de HSP70 em células do *cumulus* de oócitos equinos. (a) Expressão do gene HSP70 quanto ao estágio de maturação dos oócitos dos quais as células do *cumulus* eram provenientes. (b) Expressão do gene HSP70 em células do *cumulus* derivadas de oócitos Grau 1. (c) Expressão do gene HSP70 em células do *cumulus* derivadas de oócitos Grau 2.

Não foi observada diferença na expressão de HSP70 entre células do *cumulus* provenientes de oócitos equinos imaturos e aquelas provenientes de oócitos maturados *in vitro* (Fig. 12b). Porém, células do *cumulus* de oócitos equinos Grau 2 imaturos apresentaram maior expressão de HSP70 do que células do *cumulus* de oócitos maturados *in vitro* (Fig. 12c).

O próprio cultivo, junto com a remoção das células do *cumulus*, representa um alto estresse para oócitos e células do *cumulus*, que podem responder a isso com o esgotamento da proteína HSP70 intracelular e/ou indução da síntese de HSP70 (LÁNSKÁ et al, 2006).

As células do *cumulus* cercam o oócito e, junto com o fluido folicular, fornecem um microambiente rico em proteínas e esteróides que modulam o desenvolvimento do oócito (MENDOZA et al, 2002; SKINNER, 2005). Estudos com estas células e o fluido folicular produzem conhecimentos importantes sobre saúde reprodutiva e informações úteis sobre a qualidade dos oócitos durante os processos de ART (MATOS, 2009).

6 Conclusões

Os oócitos imaturos e células do *cumulus* de equinos do grupo morfológicamente menos viável apresentaram uma maior expressão do gene HSP70.

A maturação *in vitro* de oócitos equinos em fluido folicular não interferiu na expressão do gene HSP70, demonstrando uma estabilidade gênica durante o processo de manipulação *in vitro*.

Referências

- ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS; M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEA, C.L.V. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.389-397, 2008.
- AGUILAR, J.; LOSINNO, L.; KONCURAT, M.; MIRAGAYA, M.H. Nuclear cytoplasmic and mitochondrial patterns of ovulated oocytes in young and aged mares. **Theriogenology**, n.58, p.689-692, 2002.
- AMBRUOSI, B; LACALANDRA, G.M.; IORGA, A.I.; SANTIS, T.; MUGNIER, S.; MATARRESE, R.; GOUDET, G.; DELL'AQUILA, M.E. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. **Theriogenology**, v.71, n.7, p.1093-1104, 2009.
- ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidants requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v.59, p.939-949, 2003.
- ALM, H.; TORNER, H. In vitro maturation of horse oocytes. **Theriogenology**, v.42, p.345, 1994.
- BASU, N.; NAKANO, T.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. **General and Comparative Endocrinology**, n.24, p.97-105, 2001.
- BEDAIWY, M.A.; FALCONE, T.; MOHAMED, M.S. et al. Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. **Fertility and Sterility**, v.82, n.3, p. 593-600, 2004.
- BERTOLINI, M.; BEAM, S.W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L.R.; MOYER, A.L.; FAMULA, T.R.; ANDERSON, G.B. Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, n.63, v.3, p.318-328, 2002.
- BOGH, I.B.; BÉZARD, J.; DUCHAMP, G.; BALTSSEN, M.; GÉRARD, N.; DAELS, P.; GREVE, T. Pure preovulatory follicular fluid promotes *in vitro* maturation of *in vivo* aspirated equine oocytes. **Theriogenology**, v. 57, p. 1765-1779, 2002.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, n.41, p.54-62, 1995.
- CAILLAUD, M.; REIS, A.P.; ACHARD, E.; SEIGNOBOS, F.; PALMER, E. Oocyte maturation in a portable incubator: an alternative for laboratories situated far from abattoirs. In: 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRY TRANSFER, 2008, Cambridge. **Anais do 7th International Symposium on Equine Embry Transfer**, 2008. p.10-11.

CALABRESE, V.; Lodi, R.; TONON, C.; D'AGATA, V.; SAPIENZA, M.; SCAPAGNINI, G.; MANGIAMELI, A.; PENNISI, G.; STELLA, G.; BUTTERFIELD, A. Oxidative stress mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. **Journal of the Neurological Sciences**, n.233, p.145-162, 2005.

CARNEIRO, C.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; LIU, I. Influence of insulin-like growth factor-I and interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.65, n.3, p.899-905, 2001.

CARNEIRO, G. F. Maturação *in vitro* de oócitos eqüinos. **Ciência e Tecnologia Veterinária**, v.2, n.2, p.05-10, 2002.

CARNEIRO, G.F.; LIU, I.K.M.; HYDE, D.; ANDERSON, G.B.; LORENZO, P.L.; BALL, B. A . Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. **Molecular Reproduction and Development**, v.63, p.451-458, 2002b.

CARNEVALE, E.M.; COUTINHO, M.A.; MACLELLAN, L.J.; SEIDEL, G.E.; JR., SQUIRES, E.L. Use of parentage testing to determine optimum insemination time and culture media for oocyte transfer in mares. **Reproduction**, n.128, p.623-628, 2004.

CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J. Collection, evaluation and use of oocytes in equine assisted reproduction. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, n.22, p.843-856, 2006.

CATT, J.W.; HENMAN M: Toxic effects of oxygen on human embryo development. **Human Reproduction**, n.15, p.199-206, 2000.

CHOI, Y.H.; SHIN, T.; LOVE, C.C.; JOHNSON, C.; VARNER, D.D.; WESTHUSIN, M.E.; HINRICHS K. Effect of co-culture with theca interna on nuclear maturation of horse oocytes with low meiotic competence, and subsequent fusion and activation rates after nuclear transfer. **Theriogenology**, n.57, p.1005-1011, 2002.

COLLINS, Tracey Helen, **Investigation into the Effects of Oxidative Stress on Reproductive Development**. 2007. 160f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – University of Waikato, Hamilton.

CNA. Confederação da agricultura e pecuária do Brasil cria comissão para o setor de agronegócio do cavalo. Disponível em: <<http://www.cna.org.br/AgropecuariaAgora/Agora03/ag297.htm>> Acesso em: 18 nov. 2009.

CRAN, D.G.; MOOR, R.M. Programming the oocyte for fertilization. **Fertilization in mammals**, n.4, p.35-50, 1990.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p. 451–7, 1996.

DE MATOS, D.G.; NOGUEIRA, D.; CORTVRIND, R.; HERREA, C.; ADRIAENSSENS, T.; PASQUALINI, R. S.; Capacity of adult and prepubertal mouse oocytes to undergo embryo development in the presence of cysteamine. **Molecular Reproduction and Development**, v.64, p. 214–218, 2003.

DE LOOS, F. et al. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine *cumulus* oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v.28, n.3, p.255-259, 1991.

DELEUZE, S.; GOUDET, G.; CAILLAUD, M.; LAHUEC, C.; DUCHAMP, G. Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of in vitro and in vivo matured horse oocytes. **Theriogenology**, v.72, p.203-209, 2009.

DEL CAMPO, M.R.; DONOSO, X.; PARRISH, J.J.; GINTHER, O.J. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, n.43, p.1141-1153, 1995.

DELL'AQUILA, M.E.; CHOI, Y.S.; MINOIA, P.; TRAINA, V.; LACALANDRA, G.M.; MARITATO, F. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, , n.12, p.2766-2772, 1997.

DELL'AQUILA, M.E.; CHOI, Y.S.; MINOIA, P.; TRAINA, V.; FUSCO, S.; LACALANDRA, G.M.; MARITATO, F. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matures equine oocytes. **Theriogenology**, v.47, n.6, p.1139-1156, 1997a.

DOHERTY, A.S.; MANN, M.R.; TREMBLAY, K.D.; BARTOLOMEI, M.S. and SCHULTZ, R.M. Differential effects of culture on imprinted *H19* expression in the reimplantation mouse embryo. **Biology of Reproduction**, n.62, p.1526-1535, 2000.

EPPIG, J. J. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed *in vitro* from antral follicles. **Biology of Reproduction**, v.45, p.824-830, 1991.

FAIR, T.; CARTER, F.; PARK, S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Global genes expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v.68, p.91-97, 2007.

FAOSTAT. FAO Statistics Division 2007. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/418/DesktopDefault.aspx?PageID=418>> Acesso em: 04 jul. 2009.

FATEHI, A.N.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E.J.;

GADELLA B.M.; BEVERST, M.M.; VAN DEN HURK, R. 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**, v.13, p.177-185, 2005.

FEHRENBACH, E.; NIESS, A. Role of heat shock protein in the exercise response. **Exercise Immunology Review**, n.5, n.57-77, 1999.

FEIL, D.; LANE, M.; ROBERTS, C.T.; KELLEY, L.; EDWARDS, L.J.; THOMPSON, J.G.; KIND, K.L. Effect of culturing mouse embryos under different oxygen concentrations on subsequent fetal and placental development. **Journal of Physiology**, n.572, p.87-96, 2006.

FERNANDES, Cláudia. **Maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos: comparação entre os meios TCM 199, SOFaa e HTF:BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do hormônio de crescimento eqüino por meio da transferência de ovócitos**. 2004. 129p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n 1, p.61-68, 1997.

FERREIRA, A.M.; GUIMARÃES, M.F.M.; DO VALE FILHO, V.R. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos Taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, n.68, p.626–632, 2007.

FISSORE, R.A.; KUROKAWA, M.; KNOTT, J.; ZHANG, M.; SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, v.124, p.745-754, 2002.

FOULADI, NASHTA A.A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K.H. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *In vitro*: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biology of Reproduction**, n.59, p.255-262, 1998.

FRANZ, L.C.; CHOI, Y.H.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.; JR., HINRICHS K. Effects of roscovitine on maintenance of the germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. **Reproduction**, n.125, p. 693-700, 2003.

GABLE, T.L.; WOODS, G.L. Confocal microscopy of germinal vesicle-stage equine oocytes. **Theriogenology**, n.55, p.1417-1430, 2001.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, n.55, p. 1341-1357, 2001.

GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, n.98, p.39-55, 2007.

GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. **Theriogenology**, v.54, n.9, p.1537-42, 2000.

GORDON, Ian. **Laboratory production of cattle embryos**. 7ed. Wallingford, CAB International, 1994. p. 645-663.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; GERARD, N.; PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. **Biology of Reproduction**, n.57, p.232-245, 1997.

GOUDET, G.; BELIN, F.; BEZARD, J.; GERARD, N. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. **Molecular Human Reproduction**, v.4, n.6, p.563-570, 1998.

GOUDET, G.; BELIN, F.; BEZARD, J.; GERARD, N. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Molecular Human Reproduction**, n.4, 563-570, 1998a.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; BELIN, F.; DUCHAMP, G.; PALMER, E.; GERARD, N. Oocyte competence for in vitro maturation is associated with Histone H1 Kinase Activity and is influenced by estrous cycle stage in the mare. **Biology of Reproduction**, v.59, p.456-462, 1998b.

GOUDET, G.; BELIN, F.; MLODAWSKA, W.; BEZARD, J. Influence of epidermal growth factor on in vitro maturation of equine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.56, p.483-92, 2000.

GRONDAHL, C.; GRONDAHL, N.; ERIKSEN, T.; GREVE, T.; HYTTEL, P. In vitro fertilization and initial embryogenesis in the mare. **Equine Veterinary Journal**, n.15, p.79-83, 1993.

GRONDAHL, C.; HYTTEL, P.; GRONDAHL, M.L.; ERIKSEN, T.; GOTFREDSEN, P.; GREVE, T. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. **Molecular Reproduction Development**, n.42, p.94-105, 1995.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S. El and MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 07, n.2, p.175-189, 2001.

GUIGNOT, F.; BEZARD, J.; PALMER, E. Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after in vitro maturation. **Theriogenology**, n.52, p.757-766, 1999.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th ed. New York: Oxford University Press Inc. 187. 2007

HARVEY, M.B.; ARCELLANA-PANLILIO, M.Y.; ZHANG, X.; SCHULTZ, G.A.; WATSON, A.J. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. **Biological Reproduction**, n.53, p.532-54, 1995.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; IMAI, H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. **Biology of Reproduction**, n.66, p.1696-1701, 2002.

HAWLEY, L.R.; ENDERS, A.C.; HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction Monograph Series**, n.1, p.243-252, 1995.

HINRICHS K. The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. **Theriogenology**, n.36, p.157-168, 1991.

HINRICHS, K.; SCHMIDT, A.L.; FRIEDMAN, P.P.; SELGRATH, J.P.; MARTIN, M.G. In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. **Biology of Reproduction**, n.48, p.363-370, 1993.

HINRICHS, K.; MARTIN, M.G.; SCHMIDT, A.L.; FRIEDMAN, P.P. Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, n.104, p.149-156, 1995.

HINRICHS, K.; WILLIAMS, K.A. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. **Biology of Reproduction**, n.57, p.377-384, 1997.

HINRICHS, K.; CHOI, Y.H.; LOVE, L.B.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; WALCKENAER, B.E. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. **Biology of Reproduction**, n.72, p.1142-1150, 2005.

HINRICHS, K.; CHOI, Y.H.; VARNER, D.D.; HARTMAN, D.L. Efficient production of cloned horse pregnancies using roscovitine-treated donor cells. **Animal Reproduction Science**, n.94, p.309-310, 2006.

HINRICHS, K.; CHOI, Y.H.; WALCKENAER, B.E.; VARNER, D.D.; HARTMAN, D.L. In vitro produced equine embryos: Production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. **Theriogenology**, v.68, p.521–529, 2007.

IBGE – Pesquisa Pecuária Municipal. Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ppm/default.asp?o=22&i=P>> Acesso em 15 Jan 2010.

KANG, S.; STUART, E.; DENMAN, A.R.; MORRISON, S.; YU, Z.; MCSWEENEY, C.S. An Efficient RNA Extraction Method for Estimating Gut Microbial Diversity by Polymerase Chain Reaction. **Current Microbiology**, v.58, p.464–471, 2009.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, *cumulus* cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v.54, n.5. p.741-756, 2000.

KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, n.62, p.1186-1197, 2004.

KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L.; HERRMANN, D.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S.J. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction**, n.124, p.365–375, 2002.

LÁNSKÁ, V.; CHMELÍKOVÁ, E.; SEDMÍKOVÁ, M.; PETR, J.; RAJMON, R.; JESETA, M.; ROZINEK, J. Expression of heat shock protein70 in pig oocytes: Heat shock response during oocyte growth. [Animal Reproduction Science](#), v.96, p.154-164, 2006.

LEON, P.M.M.; SANTOS, E.C.S.; RAMBO, G.; LUCIA Jr., T.; DESCHAMPS, J.C. Aumento da taxa de maturação *in vitro* de oócitos eqüinos com a adição de cisteamina ao meio. In: **V Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria**, Montevideo / Uruguai, p. 129, 2007.

LI, X.; MORRIS, L.H.; ALLEN, W.R. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Reproduction**, n.121, p.925-932, 2001.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, n.25, p.402-408, 2001.

LORENZO, P.L.; LIU, I.K.; CARNEIRO, G.F.; CONLEY, A.J.; ENDERS, A.C. Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. **Equine Veterinary Journal**, n.34, p.378-382, 2002.

LOVE, L.B.; CHOI, Y.H.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HINRICHS, K. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. **Theriogenology**, n.59, p.765-774, 2003.

MAK, P. The HSP70 Chaperone System, 1998. Disponível em <<http://pps98.cryst.bbk.ac.uk/assignments/projects/mak/main.htm>> Acesso em: 29 nov. 2009.

MATOS, L.; STEVENSON, D.; GOMES, F.; SILVA-CARVALHO, J.L.; ALMEIDA, H. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. **Molecular Human Reproduction**, n.15, v.7, p.411-419, 2009.

MENDOZA, C.; RUIZ-REQUENA, E.; ORTEGA, E.; CREMADES, N.; MARTINEZ, F.; BERNABEU, R.; GRECO, E.; TESARIK, J. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. **Human Reproduction**, v.17, p.1017–1022, 2002.

OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SŁOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYNSKA, B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. **Theriogenology**, n.69, p.546–555, 2008.

PALMER, E.; MAGISTRINI, M.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G. Gestation après fécondation *in vitro* dans l'espèce équine. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.310, p.71-74, 1991.

PARCELLIER, A.; GURBUXANI, S.; SCHMITT, E.; SOLARY, E.; GARRIDO, C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n.12, p.304-505, 2003.

PAYNTON, B.V.; BACHVAROVA, R. Changes in maternal RNAs during oocyte maturation. **Fertilization in mammals**. n.4, p.25-34, 1990.

PEDERSEN, H.G.; WATSON, E.D.; TELFER, E.E. Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. **Theriogenology**, n.62, p.468-480, 2004.

PEREIRA, G.R.; LORENZO, P.L.; CARNEIRO, G.F.; BILODEAU-OESEELS, S.; KASTELIC, J.P.; PEGORARO, L.; PIMENTEL, C.A.; ESTELLER-VICO, A.; ILLERA, J.C.; SILVAN, G.; CASEY, P.; LIU, I.K.M. Effect of equine growth hormone (eGH) on *in vitro* maturation of equine oocytes and on steroidogenesis by their cumulus–oocyte complexes. **Animal Reproduction Science**, n.94, p.364–365, 2006.

PREIS, K.A.; CARNEVALE, E.M.; COUTINHO, M.A.; CARACCILOLO, V.; GOMES, G.M.; MACLELLAN, L.J.; SQUIRES, E.L. *In vitro* maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22 degrees C. **Theriogenology**, n.61, p.1215-1223, 2004.

QUEIROZ, AFS. Avaliação do potencial vacinal da hsp70 de *Leishmania chagasi* em cães. **Dissertação de Mestrado**, UFPE, 81 p., 2001.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction Domestic Animals**, v.43, p.44-50, 2008.

SATHANANTHAN, A H. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: Unique aspects of the human oocyte. **Microscopy Research and Technique**, v.27, p.145-164, 1994.

SCOTT, T.J.; CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, C.F.; SCOGGIN, C.F. SQUIRES, E.L. Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. **Theriogenology**, v.55, p.705-715, 2001.

SHABPAREH, V.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.; JASKO, D.J. Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, n.40, p.1161-1175, 1993.

SHIOYA, Y.; KUWAYAMA, M. ;FUKUSHIMA, M.; IWASAKI, S.; HANADA, A. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. **Theriogenology**, v.30, p.489-95, 1988.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, n.55, p.1241-1254, 2001.

SKINNER, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**, v.11, p.461–471, 2005.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, n.1, p. 151-170, 2003.

SOMFAI, T.; DINNYES, A.; SAGE, D.; MAROSAN, M.; CARNWATH, J. W.; OZAWA, M.; KIKUCHI, K.; NIEMANN, H. Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated *in vitro* matured porcine oocytes after Solid Surface Vitrification (SSV). **Theriogenology**, v.66, n.2, p.415-422, 2006.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in-vitro* cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, v.54, n.1, p.137-145, 2000.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; KRUIF, A. Minireview: Functions of the *cumulus oophorus* during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.414–424, 2002.

TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. Protection of Porcine Oocytes Against Apoptotic Cell Death Caused by Oxidative Stress During *In Vitro* Maturation: Role of Cumulus Cells. **Biology of Reproduction**, v.63, n.3, p.805-810, 2000.

TESFAYE, D.; GHANEM, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; SIRARD, M.; HOELKER, M.; SCHELLANDER, K.; LONERGAN, P. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus–oocyte complexes matured either *in vivo* or *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, n.3, p. 451–461, 2009.

TREMOLEDA, J.L.; THARASANIT, T.; VAN TOL, H.T.; STOUT, T.A.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. Effects of follicular cells and FSH on the

resumption of meiosis in equine oocytes matured *in vitro*. **Reproduction**, n.125, p.565-577, 2003.

TREMOLEDA, J.L.; STOUT, T.A.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B.; GALLI, C. Effects of *in vitro* production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. **Biology of Reproduction**, v.69, n.6 p.1895–1906, 2003a.

VALKO, M; LEIBFRITZ, D; MONCOLA, J; CRONIN, MTD; MAZURA, M; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.39,p.44–84, 2007.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; MATOS, D.G. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1453-1465, 2002.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.59, n.7, p.1585-1596, 2003.

WARZYCH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO, J.; LECHNIAK, D. Maturation Medium Supplements Affect Transcript Level of Apoptosis and Cell Survival Related Genes in Bovine Blastocysts Produced *In Vitro*. **Molecular reproduction and Development**, n.74, p.280-289, 2007.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.A.; MARTINS, Jr. A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in preimplantation bovine embryos. **Human Reproduction**, n.16, p.893–901, 2001.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.A.; MARTINS, Jr. A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in preimplantation bovine embryos. **Human Reproduction**, n.16, p.893–901, 2005.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSawe, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reproduction Fertility Development**, v.17, p.23-35, 2005b.

ZHANG, J.J.; BOYLE, M.S.; ALLEN, W.R.; GALLI, C. Recent studies on *in vivo* fertilization of *in vitro* matured horse oocytes. **Equine Veterinary Journal**, n.8, p. 101-104, 1989.

ZHANG, L.; WANG, S.H.; DAI, Y.P.; LIA, N. Aberrant gene expression in deceased transgenic cloned calves. **Animal Reproduction Science**, n.112, p.182–189, 2009.

ZAO, Y.; WANG, W.; QIAN, L. Hsp70 may protect cardiomyocytes from stress-induced injury by inhibiting Fas-mediated apoptosis. **Cell Stress Chaperones**, n.12, p.83–95, 2007.