

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas



Monografia de Conclusão de Curso

Expressão do gene Bcl-2 relacionado a apoptose em oócitos equinos e células do *cumulus*

Karine Rech Begnini

Pelotas, 2010

KARINE RECH BEGNINI

Expressão do gene Bcl-2 relacionado a apoptose em oócitos equinos e células do *cumulus*

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

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

Pelotas, 2010

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

B417e Begnini, Karine Rech
Expressão do gene Bcl-2 relacionado a apoptose em
oócitos equinos e células do cumulus / Karine Rech Begnini ;
orientador Tiago Collares ; co-orientador Priscila Marques
Moura de Leon. – Pelotas, 2010. – 45f. – Monografia
(Conclusão de curso). Instituto de Biologia. Universidade
Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Biologia. 2.Apoptose. 3. maturação *in vitro*.
4.Expressão gênica. 5.Oócitos equinos. 6.Bcl-2. 7.Real-time
PCR. I.Collares, Tiago. II.Leon, Priscila Marques Moura de
III.Título.

CDD:

636.10821

Banca examinadora:

Prof. Dra. Fabiana Kommling Seixas

Prof. Dr. Tiago Collares

Msc. Priscila Marques Moura de Leon (Doutoranda em Biotecnologia)

Msc. Vinícius Farias Campos (Doutorando em Biotecnologia)

AGRADECIMENTOS

A quem chamamos de Deus, pela vida, proteção e suporte psicológico nos momentos difíceis.

Aos meus amados pais Henrique e Eliana, pela educação que me foi dada, pelo apoio, por acreditarem em meus sonhos e tornar sua realização possível, muito obrigada!

Aos meus amados irmãos Guilherme e Eduardo, pelo apoio e carinho, mesmo que a distância.

Ao meu orientador Tiago Collares, por acreditar em meu potencial, pela oportunidade, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade, muito obrigada!

À minha co-orientadora Priscila Marques Moura de Leon, pelos ensinamentos, conversas, por tornar a realização desse trabalho possível e pela amizade, obrigada!

Ao professor João Carlos Deschamps, pelas conversas sempre proveitosas e pelos ensinamentos acadêmicos e de vida.

Ao querido amigo e colega Cristian Kaefer, pela paciência, ensinamentos, risadas e companheirismo.

Ao colega Vinícius Farias Campos, pela valiosa ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho, principalmente da análise estatística.

Aos colegas do Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Breno Gonçalves, Elias Berneira, Elisa Fortes, Evelise Sampaio da Silva, Fabrício Domenech Nunes, Ingrid Amaral, Marta Amaral e Thaís Collares, pela ajuda na execução dos experimentos e por tornar os dias de trabalho mais divertidos.

À direção e funcionários do frigorífico Miramar pela disponibilidade e ajuda na coleta do material utilizado na realização deste trabalho.

Às amigas, Daniela Cassol, Evelise Sampaio da Silva, Laura Lemons Moreira e Vanessa dos Anjos, pela amizade sincera e por dividir alegrias e angústias, tornando a vida longe de casa mais fácil.

Ao meu amor Guilherme Reissig, pelo carinho nos momentos de dúvida e angústia e pela compreensão durante minhas ausências.

A todos que de uma forma ou outra auxiliaram no desenvolvimento deste projeto, fazendo parte dessa etapa de minha vida, muito obrigada.

EPÍGRAFE

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que se está sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que seremos interrompidos antes do final. Fazer da interrupção um novo caminho, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino

RESUMO

BEGNINI, Karine Rech. **Expressão do gene Bcl-2 relacionado a apoptose em oócitos equinos e células do cumulus**. 2009. 44f. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A reprodução assistida é hoje uma prática comum na produção animal. Embriões produzidos *in vitro* são menos viáveis ao desenvolvimento que aqueles produzidos *in vivo*, sendo seu potencial de desenvolvimento dependente da qualidade dos oócitos dos quais se originam. A apoptose é definida como uma auto-destruição celular controlada por efeitos fisiológicos e constitui um processo essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase dos tecidos. É um dos principais fatores que afetam o potencial de desenvolvimento embrionário, pois parece ter seus níveis de ocorrência aumentados devido às condições de cultivo *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de expressão do gene Bcl-2, associado ao processo de apoptose, em grupos morfológicos de oócitos e células do *cumulus* equino submetidos à maturação *in vitro*, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Complexos *Cumulus* Oócito (CCO) foram obtidos através de aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouro e divididos em dois grupos de viabilidade morfológica. No grupo 1 (G1) ficaram os oócitos considerados morfológicamente saudáveis, ou seja, possuidores de *cumulus* compacto com mais de 3 camadas de células, citoplasma homogêneo e zona pelúcida íntegra. No segundo grupo (G2) ficaram os oócitos que não apresentaram alguma ou nenhuma dessas características. Os CCOs foram submetidas à maturação *in vitro* em líquido folicular e/ou submetidas à extração de RNA total. O RNA extraído foi submetido a síntese de cDNA através da reação de transcriptase reversa. O cDNA obtido foi utilizado como DNA template na reação de qRT-PCR. Os resultados deste trabalho mostraram que oócitos considerados morfológicamente menos viáveis possuem maior nível de transcrição do gene Bcl-2 do que aqueles considerados morfológicamente saudáveis. Além disso, esses oócitos menos viáveis apresentam acréscimo transcricional do gene quando submetidos à maturação *in vitro*, se comparados aos do grupo com maior viabilidade. Resultado semelhante foi encontrado nas células do *cumulus*, onde maior nível de expressão foi encontrado naquelas pertencentes ao grupo morfológico considerado menos saudável. Assim, oócitos considerados com menor potencial de desenvolvimento possuem elevados níveis de transcrição do gene anti-apoptótico Bcl-2, e que a maturação *in vitro* altera as taxas de expressão gênica de Bcl-2 em oócitos equinos e células do *cumulus*.

Palavras-chave: apoptose, expressão gênica, oócitos equinos, Bcl-2, Real-time PCR, maturação *in vitro*.

ABSTRACT

BEGNINI, Karine Rech. **Expressão do gene Bcl-2 relacionado a apoptose em oócitos equinos e células do cumulus**. 2009. 46f. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Assisted reproduction is a common practice in animal production. *In vitro* produced embryos are less viable to develop than those *in vivo* produced and the potential development of these embryos depends of oocytes quality from which they originate. Apoptosis is defined as a self-destruction of cells controlled by the physiological effects and is an essential process for the development and maintenance of tissue homeostasis. It is one of the main factors that affect the developmental potential, it seems to have their risk levels increased due to growing conditions *in vitro*. The aim of this study was to evaluate the expression levels of Bcl-2 gene, related to the apoptosis process in morphological groups of equine oocytes and *cumulus* cells *in vitro* matured by the Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). COCs were obtained by follicular aspiration of ovaries from slaughterhouse and divided into two groups of morphological viability (G1 and G2). On the first group (G1) were considered oocytes morphologically healthy, ie, owners of compact cumulus with more than 3 layers of cells and homogeneous cytoplasm. On the second oocytes group (G2) that was not make any or none of these features. CCOs from each group were collected and *in vitro* matured on follicular fluid and / or transferred to polypropylene microtubes and immediately frozen in liquid nitrogen at -196 ° C. After thawing was performed mRNA extraction and subsequent synthesis of cDNA by reverse transcriptase reaction. The cDNA obtained was used as template in qRT-PCR reaction. The results showed that morphologically less viable oocytes (G2) have higher levels of Bcl-2 transcription than those considered morphologically healthy (G1). Moreover, these less viable oocytes have a higher increase in transcriptional activity when subjected to *in vitro* maturation, as compared to the group with higher viability. A similar result was found in *cumulus* cells, where higher expression levels was found in morphological G2 group, however, after maturation, a significant expression variation was found in the morphological G1 group. In conclusion, lower developmental potential oocytes have high levels of gene transcription of anti-apoptotic Bcl-2, and *in vitro* maturation change the rates of Bcl-2 gene expression in equine oocytes and *cumulus* cells.

Keywords: apoptosis, gene expression, equine oocytes, Bcl-2, Real-time PCR, *in vitro* maturation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Membros da família de genes Bcl-2 anti e pró-apoptóticos.....	22
Figura 2 – Aspiração de folículos de ovário equino e COCs selecionados para o grupo morfológico G1.....	24
Figura 3 – Quantificação relativa da expressão gênica do gene Bcl-2 em grupos morfológicos de oócitos equinos.....	29
Figura 4 – Gel de agarose 1% confirmando a amplificação dos genes Bcl-2 e GAPDH.....	30
Figura 5 – Curva de dissociação do gene GAPDH.....	30
Figura 6 – Quantificação relativa da expressão gênica do gene Bcl-2 frente à maturação <i>in vitro</i> de oócitos equinos.....	31
Figura 7 – Quantificação relativa da expressão gênica do gene Bcl-2 frente a células do cumulus equino.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação de RNA presente nas amostras de oócitos e células do cumulus.....	25
Tabela 2 – Detalhes dos <i>primers</i> utilizados na reação de Real-time RT-PCR.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bcl-2 - *B-cell lymphoma protein 2*

CC – Células do *cumulus*

cDNA – Ácido Desoxirribonucléico Complementar

CIV – Cultivo *in vitro* de embriões

COC – Complexo *Cumulus* Oócito

Ct - Threshold cycle

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

FIV – Fertilização *in vitro*

GAPDH - Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozóide

MIV – Maturação *in vitro*

mRNA – RNA mensageiro

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PIV – Produção *in vitro* de embriões

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa em
Tempo Real

RNA – Ácido ribonucléico

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa

µl – microlitro

g – grama

min – minuto

ml – mililitro

mm – milímetro

pb – pares de bases

s – segundo

UI – Unidade Internacional

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
2. Revisão de Literatura.....	14
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	14
2.2 PIV equina.....	15
2.3 Seleção de Oócitos.....	16
2.4 Apoptose.....	19
2.5 Apoptose em Oócitos.....	20
2.6 Família de Genes Bcl-2.....	20
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1 Coleta e Seleção de Oócitos.....	23
3.2 Extração de mRNA.....	24
3.3 Confecção de cDNA.....	25
3.4 Desenho e Teste dos <i>Primers</i>	25
3.5 Real-Time PCR.....	26
3.6 Análise estatística.....	27
4. Resultados.....	28
5. Discussão.....	33
6. Conclusão.....	36
7. Referências.....	37

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do mundo, sendo a criação de cavalos responsável por 1,2 milhões de empregos no país (CNA, 2003). Embora o potencial econômico seja pouco conhecido, essa atividade forma hoje uma importante interação dos setores ligados ao lazer, cultura e turismo, sendo uma das cadeias produtivas zootécnicas que oferece mais oportunidades de trabalho, conquistando posição de destaque na economia nacional (CURCIO, 2005).

A produção animal vem sendo fortemente incrementada pelo emprego do melhoramento e pela utilização de técnicas reprodutivas como a inseminação artificial, a transferência de embriões, a fecundação *in vitro*, a clonagem e a transgenia animal (NICACIO et al., 2006). A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma das biotécnicas reprodutivas mais utilizadas em animais da espécie bovina e, apesar dos custos ainda elevados, a América do Sul, particularmente Brasil e Argentina, responde por aproximadamente 50% do total das transferências de embriões produzidos *in vitro* no mundo (VIANA, 2006).

Embriões produzidos *in vitro* apresentam uma série de características que os tornam menos viáveis ao desenvolvimento que aqueles produzidos *in vivo* (MOTA, 2008). Aspectos morfológicos, metabólicos, incidência de apoptose, padrões de expressão gênica e cariótipo são exemplos de características que sofrem alterações devido às condições de cultivo *in vitro* (POMAR et al., 2005; LONERGAN et al., 2006). Além disso, evidências indicam que o potencial de desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* depende da qualidade dos oócitos dos quais se originam, estando essa qualidade relacionada às taxas de desenvolvimento embrionário e prenhez (MOTA, 2008).

Técnicas de análise de expressão gênica constituem uma poderosa ferramenta de detecção de transcritos relacionados com a qualidade de oócitos e embriões (WARZYCH et al., 2007). A reação em cadeia da polimerase combinada à

transcrição reversa (RT-PCR) é uma maneira valiosa de análise de quantificação da expressão gênica e vêm sendo adaptada para execução em tempo real (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). O Real-time PCR (qRT-PCR) é um sistema capaz de fornecer informações a cerca do conteúdo de RNA mensageiro (mRNA) de um único embrião ou de um conjunto de oócitos (WARZYCH et al., 2007). Embora o monitoramento dos níveis de mRNA seja considerado uma forma indireta de avaliação da qualidade, esses dados geram importantes informações sobre a maneira como um oócito/embrião sobrevive em um dado sistema de cultivo *in vitro* (LIU et al., 1997; PARK et al., 2006).

Para a espécie equina, as técnicas de reprodução assistida vêm sendo desenvolvidas, no entanto a baixa eficiência das mesmas tem limitado sua aplicação comercial (SQUIRES et al., 2003). As técnicas de Maturação de Oócitos (MIV), Fertilização (FIV) e Cultivo *in vitro* (CIV) mostram-se inadequadas para a espécie (TREMOLDA et al., 2003; SQUIRES et al., 2003), sendo as baixas taxas de eficiência da PIV equina associadas principalmente a falhas durante a maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos *in vitro* (LUCIANO et al., 2006). Até o momento tem-se registro na literatura de apenas dois potros nascidos de FIV convencional, sendo estes provenientes de oócitos maturados *in vivo* (PALMER et al., 1991; BÉZARD, 1992).

A criopreservação de oócitos é uma das tecnologias com aplicabilidade mais pertinente, pois possibilita a difusão do material genético superior dos animais em larga escala (SQUIRES et al., 2003; CURCIO, 2005). Além disso, favorece o armazenamento do material por longos períodos com reduzida perda da capacidade de desenvolvimento (NICACIO et al., 2006). As principais técnicas utilizadas para criopreservação de oócitos são o congelamento tradicional e a vitrificação (MELLO et al., 2001).

A vitrificação é uma técnica simples, prática e econômica para a criopreservação de embriões de muitas espécies de animais (MELLO et al., 2001), sendo utilizada principalmente para criopreservar oócitos e blastocistos (ORIEF & SCHULTZE-MOSGAU, 2005). Consiste na submissão do material a altas concentrações de crioprotetores com a finalidade de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares, possibilitando sua passagem do estado líquido ao estado vítrio (gel amorfo) sem a formação de cristais de gelo (GREEN, 2005). Este fenômeno é possível devido a um aumento extremo na viscosidade combinado a

uma rápida taxa de resfriamento, baseado na desidratação do oócito/embrião através de sua breve exposição a soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido (ORIEF & SCHULTZE-MOSGAU, 2005; VAJTA, 2000).

A vitrificação de oócitos é uma técnica muito utilizada em diversas espécies de mamíferos, porém pouco sucesso tem sido obtido na vitrificação de oócitos eqüinos. A sensibilidade a baixas temperaturas, alterações que ocorrem na zona pelúcida e a necessária remoção das células do *cumulus* são fatores que dificultam o sucesso da criopreservação dos oócitos nesta espécie (MACLELLAN et al., 2002).

A apoptose é definida como uma auto-destruição celular controlada por efeitos fisiológicos (LI et al., 2008) e constitui um processo essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase dos tecidos. Ocorre com o intuito de remover células lesadas, infectadas ou senescentes, sem que haja alteração no microambiente celular ou resposta inflamatória (ANTONSSON & MARTINOU, 2000; EMANUELLI, 2005). Ademais, a apoptose parece ser um dos principais fatores que afetam o potencial de desenvolvimento embrionário (ANGUITA et al., 2007), devido ao aumento nos níveis de ocorrência em condições de cultivo *in vitro* (WARZICH et al., 2006).

A morte celular programada ocorre pela transcrição de genes e ativação de enzimas específicas que desencadeiam um processo de autodigestão controlada por proteases endógenas denominadas caspases (EMANUELLI, 2005). Estes mecanismos podem ser desencadeados por estímulos externos, mediante ligação com receptores específicos na superfície celular, ou por estímulos internos de estresse intracelular, como lesão de DNA, alterações no ciclo celular e nas vias metabólicas, sendo ativada por diversas rotas e diferentes famílias de genes (CHANG et al., 2002).

As proteínas intracelulares que regulam diretamente o processo de ativação das caspases constituem a denominada família BCL-2 (DESAGHER; MARTINOU, 2000). Os membros dessa família podem ser divididos em moléculas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, sendo que o equilíbrio relativo entre essas diferentes proteínas define a via de atuação sobre o mecanismo de morte celular programada (FARIA et al., 2006).

A proteína *B-cell lymphoma protein 2* (Bcl-2) é uma molécula de sobrevivência que reside no envelope nuclear e na mitocôndria (FARIA et al., 2006;

MAZOOCHI et al., 2009). Acredita-se que Bcl-2 desempenhe papel fundamental na inibição da rota apoptótica em células da granulosa, pois existe uma correlação entre a diminuição dos níveis de expressão de Bcl-2 e a incidência de apoptose nestas células, quando cultivadas *in vitro* sob diferentes condições (CHOI et al., 2004). Além disso, tem sido demonstrado que oócitos considerados morfológicamente saudáveis possuem elevados níveis de expressão de Bcl-2 e menores índices apoptóticos (KIM & TILLY, 2004).

Hipótese:

Assim, acredita-se que o nível de expressão do gene Bcl-2 deverá ser maior em oócitos equinos considerados morfológicamente saudáveis, quando comparados àqueles considerados menos saudáveis; e os níveis de expressão tendem a diminuir com a submissão dos mesmos à maturação *in vitro*.

Objetivo:

Avaliar os níveis de expressão do gene Bcl-2, relacionada ao processo de apoptose, em grupos morfológicos de oócitos e células do *cumulus* equino submetidos à maturação *in vitro*, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).

Objetivos específicos:

- Avaliar se os níveis de expressão do gene Bcl-2 são maiores em oócitos considerados morfológicamente saudáveis, quando comparados aos morfológicamente menos saudáveis, verificando sua viabilidade;
- Avaliar se ocorre alteração nos níveis de transcrição de Bcl-2 nos grupos morfológicos de oócitos e células do *cumulus* após a maturação *in vitro*;
- Avaliar se existe diferença de expressão do gene Bcl-2 nos grupos morfológicos de oócitos e células do *cumulus* em estado imaturo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção *in vitro* de embriões

O uso da reprodução assistida é hoje uma prática comum na produção animal. Pesquisas nos campos celular, molecular e genético promoveram novas oportunidades para o desenvolvimento tecnológico da pecuária, principalmente, na área de reprodução (ABADIA, 2006). As biotécnicas da reprodução possuem grande importância no manejo reprodutivo assistido, pois são ferramentas com grande potencial de auxílio ao entendimento dos mecanismos fisiológicos, além de permitirem o aproveitamento de gametas de animais com características fenotípicas e genotípicas desejáveis e o intercâmbio de material genético (EMANUELLI, 2005).

A produção *in vitro* de embriões é uma das tecnologias reprodutivas com maior aplicabilidade devido ao grande potencial para produção de embriões em escala comercial e por ser ferramenta de grande utilidade para o melhoramento genético (CAMARGO et al., 2009). Constitui uma das biotecnologias mais utilizadas para a espécie bovina, com cerca de 250.000 embriões produzidos em todo o mundo, no ano de 2005 (MOTA, 2008), sendo o Brasil responsável por quase 50% do total desses embriões PIV produzidos mundialmente (VIANA; CAMARGO, 2007).

A PIV é desenvolvida rotineiramente em laboratórios mediante técnicas de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* de embriões (CIV) até o estágio de blastocisto (EMANUELLI, 2005). Embora os protocolos de desenvolvimento dessas técnicas tenham sido aprimorados nos últimos anos, somente 20 a 40% dos oócitos fecundados *in vitro* tornam-se embriões aptos a serem transferidos a receptoras (MERTON et al., 2003). Aspectos morfológicos, metabólicos, incidência de apoptose, padrões de expressão gênica e cariótipo são exemplos de características que sofrem alterações devido às condições de cultivo *in vitro* (POMAR et al., 2005; LONERGAN et al., 2006), tornando os embriões PIV

menos viáveis quando comparados àqueles produzidos *in vivo* (MOTA, 2008). Diversos fatores contribuem para a diminuição da qualidade dos embriões produzidos e das taxas de transferência embrionária, entre eles a composição dos meios de maturação e cultivo *in vitro* (THOMPSON; PETERSON, 2000; LONERGAN & FAIR, 2008), a fertilidade do sêmen (CAMARGO et al., 2002), e a qualidade dos oócitos selecionados para maturação (CAMARGO et al., 2009).

2.2 PIV Equina

O aumento da popularidade de esportes equestres no Brasil, como o Salto, Pólo e Enduro, torna oportuna a utilização de biotécnicas reprodutivas na espécie, possibilitando acelerar a seleção genética e alcançar maior desempenho dos animais. As técnicas de reprodução assistida vêm sendo desenvolvidas na espécie equina, no entanto a baixa eficiência das mesmas tem limitado sua aplicação comercial (SQUIRES et al., 2003).

Uma das limitações para o desenvolvimento de PIV em equinos é o fato de que os oócitos utilizados para pesquisa são geralmente provenientes de ovários de abatedouro. Além do limitante de número de abatedouros de animais dessa espécie, informações importantes, como procedência, idade, fase do ciclo estral das éguas e histórico de disfunções reprodutivas não são fornecidas (COLLEONI; LUCIANO; GANDOLFI, 2004; CURCIO, 2005).

As técnicas de Maturação de Oócitos (MIV), Fertilização e Cultivo de embriões *in vitro* (CIV) mostram-se inadequadas em equinos (TREMOLDA et al., 2003; SQUIRES et al., 2003). As taxas de maturação *in vitro* de oócitos eqüinos são baixas, quando comparadas às de outras espécies domésticas, somente 40 a 60% atingem Metáfase II (DELL'AQUILA et al., 1997; CARNEIRO et al., 2001; PEREIRA et al., 2006), enquanto em bovinos esses índices chegam a 97% (EMANUELLI, 2005). As razões para a falha dos oócitos equinos em completar a meiose durante a MIV são desconhecidas, podendo estar ligadas a fatores como alterações na cascata bioquímica envolvida na meiose (GOUDET et al., 1998; FERNANDES, 2004), dificuldade na coleta dos oócitos, tempo de incubação e meio de cultivo utilizado (CURCIO, 2005).

Os métodos utilizados na coleta de oócitos eqüinos são: aspiração folicular, “fatiamento” do ovário (*slicing*) (CHOI et al., 1993) e a curetagem da parede folicular (*scraping*) (HINRICHS et al., 1993). No entanto, o índice de recuperação de oócitos

na espécie equina é inferior do que em outras espécies devido à presença do *cumulus oophorus* mais aderido à parede do folículo e a localização dos mesmos no folículo (SHABPARED *et al.*, 1993; BRÜCK *et al.*, 1999; HAWLEY *et al.*, 1995).

A fertilização *in vitro* também constitui uma barreira na PIV equina e a padronização de técnicas específicas para a espécie faz-se necessária para incrementar a produção de embriões *in vitro* e torná-la eficiente. Até o presente, tem-se registro na literatura de apenas dois potros nascidos de FIV convencional, sendo estes provenientes de oócitos maturados *in vivo* (PALMER *et al.*, 1991; BÉZARD, 1992). Embora a qualidade dos oócitos submetidos à maturação *in vitro* seja variável, tendo em vista que estes são geralmente oriundos de ovários de abatedouro (COLLEONI, LUCIANO & GANDOLFI, 2004), a maior barreira para a realização de FIV convencional em equinos parece estar relacionada com a penetração do espermatozóide na zona pelúcida, sendo as taxas de fertilização aumentadas com a remoção parcial ou total da zona (HINRICHS *et al.*, 2002).

Tem sido demonstrado que a FIV em equinos é ineficiente tanto com oócitos maturados *in vivo* quanto *in vitro*, e que oócitos maturados *in vitro* e transferidos para ovidutos de fêmeas inseminadas são capazes de serem fertilizados a taxas equivalentes às obtidas por acasalamento natural. Dessa forma, tem sido sugerido que as baixas taxas de penetração espermática em FIV são correlacionadas com a incapacidade de hiperativação e/ou capacitação do esperma equino *in vitro* (MCPARTLIN *et al.*, 2009).

Uma alternativa a FIV convencional seria a Injeção Intracitoplasmática de Esperma (ICSI) para a fertilização. Há registros na literatura do nascimento de muitos potros fertilizados por ICSI, porém, grande parte desses zigotos foi transferida logo após a clivagem (SQUIRES *et al.*, 1996; GALLI *et al.*, 2001), não passando pelo processo de cultivo *in vitro*.

2.3 Seleção de oócitos

A seleção de oócitos utilizados para PIV baseia-se principalmente em aspectos morfológicos, como número e compactação das camadas de células do *cumulus*, tamanho dos folículos e presença ou ausência de grânulos e/ou vacúolos citoplasmáticos (MOTA, 2008). Oócitos considerados com maior viabilidade apresentam mais de três camadas de células compactas que os envolvem completamente, e o citoplasma homogêneo (CORRÊA, 2006). No entanto, as baixas

taxas de sucesso da MIV demonstram que os critérios morfológicos utilizados são subjetivos e podem apresentar relativa variação quanto a real capacidade de desenvolvimento oocitário (DE LOOS et al., 2002).

A maturação oocitária é regulada por uma combinação de fatores extracelulares, como: células foliculares, hormônios esteróides, gonadotrofinas e fatores de crescimento (SATHANANTHAN, 1991). O processo de expansão do *cumulus* é acompanhado de modificações nas junções GAP, essas junções são canais que fazem a ligação do *cumulus* ao oócito e são formadas por hexâmeros de proteínas provenientes da família das conexinas. Células do *cumulus* de eqüinos e suínos expressam a proteína conexina 43. A retomada da meiose nessas espécies está relacionada à redução do nível dessa proteína no *cumulus* (GRAZUL-BILSKA et al., 1997; MARCHAL et al., 2003).

A expansão total das células do *cumulus* está diretamente relacionada à maturação citoplasmática do oócito em humanos e camundongos (TESTART et al., 1983; CHEN et al., 1993). Em bovinos, a expansão do *cumulus* no momento da recuperação do oócito, está associada à atresia folicular, sendo um critério de exclusão na seleção de CCOs que serão submetidos à MIV (BLONDIN; SIRARD, 1995). Sendo assim, a permeabilidade das junções entre as células do *cumulus* e o oócito constitui um parâmetro relevante para a avaliação da qualidade dos mesmos (COLLEONI; LUCIANO; GANDOLFI, 2004).

O número de camadas e o grau de compactação das células do *cumulus* estão diretamente associados à qualidade do oócito. Porém, alguns autores vêm demonstrando que oócitos com qualidade intermediária (poucas camadas de células do *cumulus* – 1 a 3 – e citoplasma com grânulos finos e de tamanhos moderados) possuem capacidade de desenvolvimento e taxas de clivagem semelhantes às daquelas de oócitos de alta qualidade (HAWK & WALL, 1992; PEREIRA et al., 2007). Além disso, Galli et al. (2007) observou que oócitos equinos com *cumulus* expandido possuem taxas normais de maturação e potencial de desenvolvimento semelhante ou maior que aqueles com *cumulus* compacto.

Oócitos possuem consideráveis reservas de energia endógena, utilizadas durante a maturação meiótica, a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (AMBRUOSI et al., 2009). Isso é particularmente evidente em oócitos de mamíferos domésticos, onde elevados níveis de grânulos de lipídeos citoplasmáticos têm sido encontrados (MCEVOY & COUL, 2000). A quantidade e a forma de distribuição

desses grânulos constituem uma maneira de classificação morfológica de oócitos, pois parecem ter implicações importantes sobre a sensibilidade desta célula a procedimentos de maturação e cultivo *in vitro* (STURMEY et al, 2006), sendo o padrão de distribuição e tamanho definido para cada espécie. Em equinos, oócitos considerados saudáveis possuem grânulos agrupados de forma semi-lunar próximo ao fuso mitótico, dando ao ooplasma uma aparência característica de meia lua (GRONDAHL et al., 1995). Ambruosi et al., (2009), no entanto, demonstrou que a maioria dos oócitos equinos morfológicamente normais apresentam agregação de lipídeos de forma polar no citoplasma, indicando que a granulação não pode ser utilizada como único critério de avaliação da competência de desenvolvimento dos oócitos.

O potencial de desenvolvimento oocitário é determinado pela interação de múltiplos fatores e, embora a seleção morfológica apresente resultados satisfatórios, pode não demonstrar a real qualidade do oócito quanto à competência nuclear, citoplasmática e molecular (DODE, 2006). Ademais, existem evidências de que a manipulação de oócitos esteja relacionada a modificações epigenéticas do DNA, o que promove diminuição da sua viabilidade (WRENZYCKI et al., 2007). Alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, promovem alterações no padrão de expressão gênica, não sendo associadas a mudanças na sequência de nucleotídeos. Acredita-se que alterações persistentes nos padrões de expressão gênica possam acarretar a diminuição do potencial de desenvolvimento embrionário (WALKER; HARTWICH; SEAMARK, 1996), sem que sejam identificadas morfológicamente.

Diferentes genes possuem padrões diferenciados de expressão de acordo com a característica da célula na qual está inserido (WRENZYCKI et al., 2007). A manipulação de oócitos e os meios de maturação *in vitro* alteram os padrões de expressão de mRNA, possuindo forte impacto sobre o potencial de desenvolvimento destes e a qualidade dos embriões produzidos (BOELHAUVE, 2005; WARZYCH, 2007).

Técnicas de análise de expressão gênica podem constituir uma poderosa ferramenta de detecção de transcritos relacionados com a qualidade de oócitos e embriões (WARZYCH et al., 2007). A reação em cadeia da polimerase combinada à transcrição reversa (RT-PCR) constitui uma maneira de análise de quantificação da expressão gênica e vêm sendo adaptada para execução em tempo real (LIVAK &

SCHMITTGEN, 2001). O Real-time PCR (qRT-PCR) é um sistema capaz de fornecer importantes informações a cerca do conteúdo de mRNA de um único embrião ou de conjunto de oócitos (WARZYCH et al., 2007). Embora o monitoramento dos níveis de RNA mensageiro seja considerado uma forma indireta de avaliação da qualidade, esses dados são capazes de gerar informações sobre a maneira como um oócito/embrião sobrevive em um dado sistema de cultivo *in vitro* (LIU et al., 1997; PARK et al., 2006).

2.4 Apoptose

A apoptose ou morte celular programada é um processo fisiológico essencial para a manutenção da homeostase dos tecidos (ANTONSSON; MARTINOU, 2000). Definida como uma autodestruição celular controlada por efeitos fisiológicos, a apoptose ocorre com o intuito de remover células lesadas, infectadas, ou senescentes, sem que haja alteração no microambiente celular ou resposta inflamatória (EMANUELLI, 2005).

O termo apoptose define todos os mecanismos e processos envolvidos antes, durante e após a morte celular (TILLY, 1996). Pode-se dizer que a apoptose é constituída por quatro estágios: estímulo, sinalização, regulação e fase efetora, sendo um processo reversível até que a célula atinja o estágio final da fase reguladora (MOTITA; TILLY, 1999). As células que iniciam esse processo diminuem seu volume citoplasmático mantendo suas organelas intactas. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma vesículas, denominadas corpúsculos apoptóticos, que contém fragmentos do núcleo e algumas organelas. Esses corpúsculos apoptóticos são rapidamente reconhecidos e englobados por fagócitos e/ou células adjacentes, onde são degradados e reciclados (BETTS; KING, 2001; KERR et al., 1994; MATWEE et al., 2000).

A indução da apoptose ocorre de maneira diferente dependendo do tipo de célula e do estágio em que esta se encontra. Entretanto, depois de desencadeado esse mecanismo, os caminhos percorridos por todas as células são comuns, sendo um processo irreversível após o início da ativação das caspases efetoras (CRYNS; YUAN, 1998).

As caspases se classificam em duas classes principais: (1) caspases iniciadoras, que interagem com proteínas adaptadoras específicas tendo a função de ativar diretamente ou indiretamente as caspases efetoras (BRATTON et al., 2000;

MUZIO et al., 1998); e (2) caspases efetoras, as quais realizam clivagem de proteínas estruturais e regulatórias (KOTHAKOTA et al., 1997; KWIATKOWSKI, 1999). Várias proteínas são apontadas como alvos das caspases, mas ainda não foi estabelecida uma relação direta entre o corte dessas proteínas e a morte celular (BRATTON et al., 2000).

2.5 Apoptose em oócitos

Complexos *Cumulus* Oócito (COCs) são controlados por vários mecanismos apoptóticos (TILLY, 1996). Durante a vida reprodutiva da fêmea, a maioria dos folículos ovarianos torna-se atrésico e seu respectivo oócito se degenera. Os folículos que não se submetem ao processo de atresia continuam a crescer até a ovulação. Após a ovulação, se a fertilização não ocorrer dentro de um determinado tempo, o oócito perde sua capacidade fertilizante e começa a se degenerar (TAKASE et al., 1995; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002). Embora os mecanismos envolvidos neste processo de degeneração ainda não estejam muito bem elucidados, é provável que no oócito este processo ocorra por apoptose (YANG; RAJAHAMENDRAN, 2002).

A presença de alterações apoptóticas encontradas em compartimentos foliculares é altamente variável, e mesmo em folículos morfológicamente semelhantes podem ser encontradas variações nos níveis de apoptose de suas células (ZEUNER et al., 2003). A possibilidade de células do *cumulus* apoptóticas, influenciarem a maturação nuclear, citoplasmática e o desenvolvimento oocitário e do embrião *in vitro*, vem sendo estudada (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000a). Um incremento apoptótico em oócitos maturados com a presença de células do *cumulus*, em relação aos oócitos maturados sem as CC (desnudos), foi demonstrado em camundongos, evidenciando a possibilidade de indução de apoptose pelas CCs (PERES; TILLY, 1997). Em bovinos, no entanto, não foi observado apoptose neste tipo celular (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000b).

Os mecanismos de morte celular programada podem ser ativados por estímulos externos, mediante ligação com receptores específicos da superfície celular, ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA, perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas (CHANG et al., 2002).

2.6 Família de genes Bcl-2

O processo de apoptose ocorre pela transcrição de genes e ativação de enzimas específicas que desencadeiam um processo de autodigestão controlada por proteases endógenas denominadas caspases (EMANUELLI, 2005). Existem diversas famílias de genes envolvidas nesse processo, e uma dessas famílias é a do gene *BCL-2*. Os membros dessa família estão divididos em moléculas pró-apoptóticas (BAX, BAK, BCL-xS, BAD, BID, BIK, HRK, BIM e BOK) e antiapoptóticas (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, BFL-1, BRSAG-1, MCL-1, A1, E1B19K, LMW5-HL e EBV BHRF1), e o equilíbrio relativo entre essas moléculas define a via de atuação do mecanismo de morte celular programada (FARIA et al., 2006).

A família de genes Bcl-2 é composta por proteínas que compartilham estruturas homólogas dos domínios BH1, 2, 3 e 4, embora nem todos os membros possuam todos os domínios (Fig. 1). Os domínios BH1 e BH2 dos antagonistas são necessários para heterodimerizar com os agonistas da morte e, inversamente, o domínio BH3 dos agonistas da morte é requerido para que ocorra a heterodimerização com os antagonistas da morte para promover a morte celular (GROSS et al., 1999, YIN et al., 1994).

As proteínas da família BCL-2 estão inseridas na membrana mitocondrial, na forma de dímeros ou polímeros, e sua estrutura quaternária está diretamente relacionada com seu poder de ativar ou inibir a apoptose (KROEMER, 1997). A proteína *B-cell lymphoma protein 2* (BCL-2), a primeira integrante da família gênica Bcl-2, é codificada por um gene localizado no cromossomo 18q21 e favorece a sobrevivência celular através do impedimento do escape do citocromo-c para o citosol, possivelmente pela formação de heterodímeros com moléculas pró-apoptóticas como a proteína Bax (FARIA et al., 2006). Em oócitos, acredita-se que a razão da taxa de expressão de Bcl-2 para Bax possa ser usada como um marcador de apoptose, pois se tem observado níveis elevados de expressão de Bcl-2 em oócitos considerados saudáveis, e maior expressão de Bax em oócitos desnudos, considerados com menor potencial de maturação e desenvolvimento embrionário (YANG & RAJAMAHENDRAN, 2002).

A apoptose ocorre através de duas rotas principais: a rota do receptor de morte celular e a rota mitocondrial (BORNER, 2003). A rota mitocondrial é regulada pelas proteínas pró e antiapoptóticas da família de genes Bcl-2 (OPIELA et al., 2008) e ocorre através da translocação de proteínas pró-apoptóticas do citosol para a

mitocôndria, resultando na liberação do citocromo-c, presente no espaço existente entre a membrana mitocondrial externa e interna, para o citosol (GROSS et al, 1999; HENGARTNER, 2000; SMAILL et al., 2003). No citosol, o citocromo-c forma um complexo com o fator ativador da apoptose 1, o apoptossoma, levando à ativação da caspase 9, que ativa caspases efetoras (GREEN; EVAN, 2002; HENGARTNER, 2000).

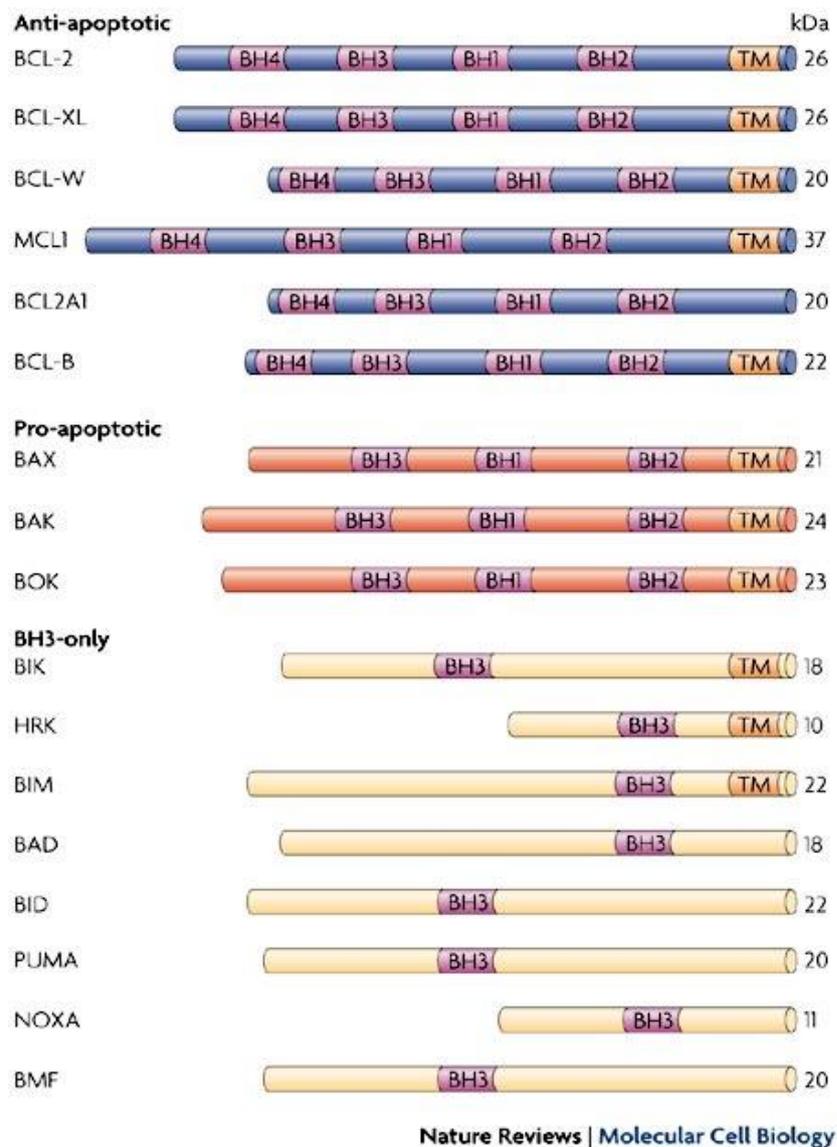


Figura 1 – Membros da família de genes Bcl-2 anti e pró-apoptóticos. Estrutura homóloga dos domínios BH1-3 mais a porção hidrofóbica carboxi-terminal (TM).

Fonte: TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e seleção dos oócitos

Foram utilizados ovários oriundos de abatedouro, localizado na cidade de Pelotas/RS. Os ovários foram coletados aleatoriamente na linha de abate, não sendo identificadas a idade, a fase do ciclo estral e a condição clínica e nutricional das éguas. O tempo decorrente entre o abate e a coleta foi de aproximadamente 1 hora, e os ovários foram transportados em recipiente térmico até o laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, localizado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPel.

Os complexos *cumulus* oócito (CCO) foram aspirados dos folículos com tamanhos entre 10 a 30mm de diâmetro (LEON et al., 2008). O conteúdo folicular foi aspirado com auxílio de seringa de 20ml e agulha 40 x 1.2 (Fig. 2), e colocado em tubos cônicos de 50ml para decantação. O depósito celular formado foi colocado em placa de petri para procura dos CCOs em lupa estereomicroscópica, e mantidos em fluído 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: G1, considerados morfologicamente saudáveis (oócitos com *cumulus* compacto e mais de 3 camadas de células, citoplasma homogêneo e zona pelúcida íntegra), e G2, considerados morfologicamente menos viáveis (oócitos que apresentarem menos de 3 camadas de células do *cumulus* e/ou *cumulus* descompacto, zona pelúcida fragmentada e/ou citoplasma heterogêneo).

Para cada grupo morfológico (G1 e G2) foi reunido *pools* de 62 oócitos, 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 imediatamente após a coleta; e maduros, os quais foram submetidos a

maturação *in vitro* em líquido folicular por aproximadamente 40 horas, após as quais foram realizados os procedimentos iniciais de extração de mRNA.

Células do *cumulus* foram coletadas de cada *pool* de oócitos, sendo removidas por pipetagem em solução de 80 UI de hialuronidase tipo IV (Sigma® - Aldrich, Alemanha). Cada grupo de células (G1, G2, imaturo e maturo) foi submetido às mesmas condições de maturação *in vitro* e/ou extração de RNA que os oócitos equinos correspondentes ao seu *pool*.

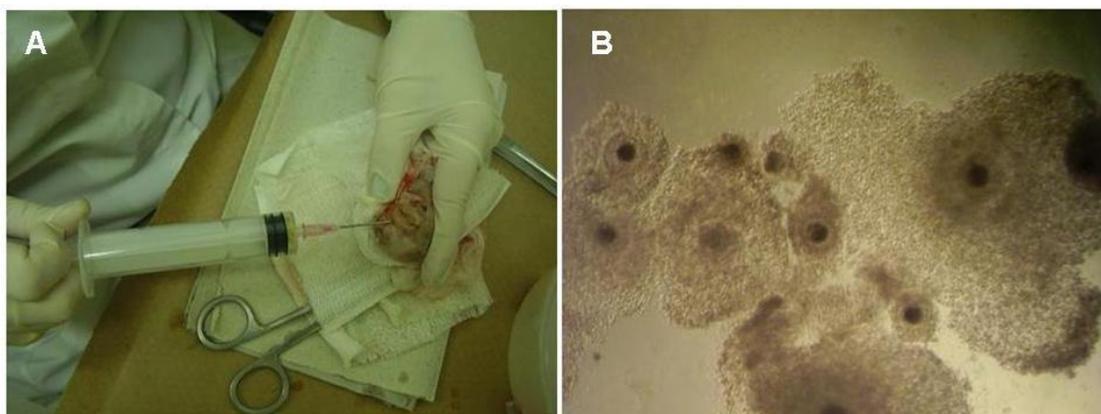


Figura 2 – Aspiração de folículos de ovário equino (A) e COCs selecionados para o grupo morfológico G1 (B).

3.2 Extração de RNA

Ao final do período de incubação as amostras foram congeladas em TRIzol para evitar a desestabilização das moléculas de RNA, e em seguida foi feita extração de RNA total das amostras de CCOs e células para avaliação das taxas de expressão do gene Bcl-2 por real time RT-PCR. A extração do RNA total das amostras foi realizada segundo protocolo com TRIzol proposto por Kang et al. (2009), com modificações.

O RNA extraído dos *pools* de oócitos e dos grupos de células foi quantificado com o fluorômetro QuBit™ (Invitrogen®, EUA), a fim de determinar a quantidade de oócitos mínima necessária em cada grupo amostral. Foram realizados testes com diferentes números de oócitos e a quantidade de RNA presente em cada um deles encontra-se ilustrado na Tab. 1.

3.3 Confecção de cDNA

O RNA extraído foi submetido à reação de transcriptase reversa para obtenção de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) seguindo as instruções

do manual do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*[®] (Applied Biosystems, USA). Ao término dessa etapa foram obtidos 20µl de cDNA que foi então utilizado como molde na reação de qRT-PCR.

Tabela 1 – Quantificação de RNA presente nas amostras de oócitos (COC) e células do cumulus (CELL). Abreviações utilizadas na tabela: G1, grupo morfológicamente viável; G2, grupo morfológicamente menos viável; IMA, oócitos imaturos; MAT, oócitos maturados *in vitro*; CCO, complexo *cumulus* oócito; CELL, células do *cumulus*.

Amostra	Qtidade de cél. Amostra	ng/ml	µg/ml
CCO G1 IMA	25 cocs	157	3,15
CCO G2 IMA	39 cocs	87,4	1,79
CCO G1 MAT	31 cocs	133	2,65
CCO G2 MAT	53 cocs	123	2,47
CELL G1 IMA	proveniente dos 25 cocs	27,2	0,545
CELL G2 IMA	proveniente dos 39 cocs	< 20	-
CELL G1 MAT	proveniente dos 31 cocs	790	16
CELL G2 MAT	proveniente dos 53 cocs	309	6,18

3.4 Desenho e teste dos *primers*

Testes para verificar a eficiência de amplificação do *primer* Bcl-2 suíno e do *primer* Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase (GAPDH) (OPIELA *et al.*, 2008), normalizador da reação de qRT-PCR, na espécie equina, foram realizados. Temperaturas de anelamento entre 56 e 58°C para Bcl-2 suíno, e entre 55 a 65°C para GAPDH, foram testadas.

O *primer* para o gene GAPDH foi amplificado com êxito na espécie equina, a uma temperatura de 61,5°C, com amplificação de um fragmento de 150 pb. O *primer* possui a seguinte sequência: F 5'-GCC GTA ACT TCT GTG CTG TG-3' e R 5'-AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG-3' (OPIELA *et al.*, 2008).

Para o *primer* Bcl-2, com a seguinte sequência de nucleotídeos: F 5'-GAAACCCCTAGTGCCATCAA-3' e R 5'-GGGACGTCAGGTCAGTGAAT-3', amplificações específicas não foram adquiridas e sua utilização não foi possível na espécie equina.

Um *primer* específico para o gene Bcl-2 equino foi então construído através do programa Vector NTI advance 11 (Invitrogen, Brasil) e possui a seguinte

sequência: F 5'-GAGACCCCCAGTGCCATCAA-3' e R 5'-GGGATGTCAGGTCGCTGAAT-3'. Foram realizadas diversas técnicas de padronização da PCR para este *primer*, utilizando temperaturas de anelamento entre 56 a 58°C, sendo a reação otimizada a 57°C.

3.5 Real Time PCR

A reação de Real Time PCR foi realizada utilizando o sistema 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e protocolo de detecção com SYBR Green (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). A reação foi otimizada seguindo os seguintes parâmetros: uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95° C por 5 min, seguido de 45 ciclos de 95° C por 30 segundos, temperatura de anelamento a 57° C por 30 segundos e de extensão a 72° C por 1 minuto. A curva de melting foi feita mantendo-se a temperatura a 95° C por 15s, seguido de manutenção da temperatura de anelamento com detecção da fluorescência a cada 30s. Foi utilizado como gene normalizador da reação o Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase (GAPDH) (OPIELA *et al.*, 2008), com amplificação de 150pb. O *primer* Bcl-2 equino foi utilizado para amplificação do gene Bcl-2, e possui fragmento esperado de 196pb (tab. 2).

A confirmação dos produtos amplificados no qRT-PCR, detecção de ampliações inespecíficas e dímeros de *primer* foi realizada através da Curva de Dissociação gerada pelo software 7500 System Software (Applied Biosystems) e por Eletroforese em Gel de Agarose 1%, corada com Gel Red. Cada amostra de cDNA foi amplificada independentemente na mesma placa e nas mesmas condições experimentais, em duplicata.

Tabela 2: Detalhes dos *primers* utilizados na reação de Real-time RT-PCR.

Gene	Sequência	Fragmento	Tm	Genbank	Referência
Bcl-2 equino	F 5'-GAGACCCCCAGTGCCATCAA-3' R 5'-GGGATGTCAGGTCGCTGAAT-3'	196 pb	57°C	—	Deste trabalho
GAPDH	F 5'-GCC GTA ACT TCT GTG CTG TG-3' R 5'-AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG-3'	150 pb	57°C	DQ403064.1	OPIELA <i>et al.</i> , 2008

3.6 Sequenciamento

Os fragmentos amplificados pela reação de qRT-PCR foram submetidos a sequenciamento automático de DNA por eletroforese capilar utilizando dideoxynucleotídeos marcados com o Kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* pelo sistema de análise de DNA MegaBACE - MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Foram utilizados os mesmos *primers* e as mesmas condições de PCR para a amplificação do fragmento a ser seqüenciado.

3.7 Análise Estatística

Os dados da expressão gênica foram analisados através do programa estatístico REST 2008, calculado a partir dos valores de Ct (treshold 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 G1 em relação ao G2; (c) oócitos imaturos de G1 com relação aos maduros de G1; (d) oócitos imaturos de G2 com relação aos maduros de G2; (e) oócitos imaturos de G1 com relação aos imaturos de G2; e (f) oócitos maduros de G1 com relação aos maduros de G2. O programa GraphPad Prism 5 foi utilizado para confecção dos gráficos.

4. RESULTADOS

Foram coletados 248 oócitos a partir de ovários oriundos de abatedouro e estes foram divididos em dois grupos, de acordo com características morfológicas. Cada grupo morfológico foi dividido em dois *pools* de 62 oócitos, sendo um deles submetido à maturação *in vitro* e o outro analisado logo após a coleta. Foram coletadas células do *cumulus* correspondentes a cada grupo de COC e submetidas às mesmas condições de cultivo e/ou extração de RNA.

A análise da quantificação relativa dos transcritos do gene Bcl-2 em oócitos equinos mostrou que, com relação à viabilidade dos grupos morfológicos, não há diferença estatística significativa entre os níveis de expressão dos grupos G1 e G2 ($P=0,218$) (Fig. 3A). Quando os grupos são comparados num mesmo estágio de maturação, verifica-se maior expressão do no grupo G2, quando comparado ao G1 ($P\leq 0,05$) (Fig. 3C e 3D).

As amostras de cDNA submetidas à reação de qRT-PCR foram analisadas em eletroforese em gel de agarose a 1%, não sendo detectadas amplificações inespecíficas para os genes GAPDH e Bcl-2 (Fig. 4). A Curva de Dissociação do gene GAPDH obtida durante a reação de Real-time PCR encontra-se ilustrada na (Fig. 5) e possui apenas um pico de amplificação, indicando a presença de um único produto de PCR.

As sequências resultantes do sequenciamento foram alinhadas com outras disponíveis no Banco de Dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), sendo possuidoras de alta similaridade e confirmando a identidade dos fragmentos amplificados pelos *primers*.

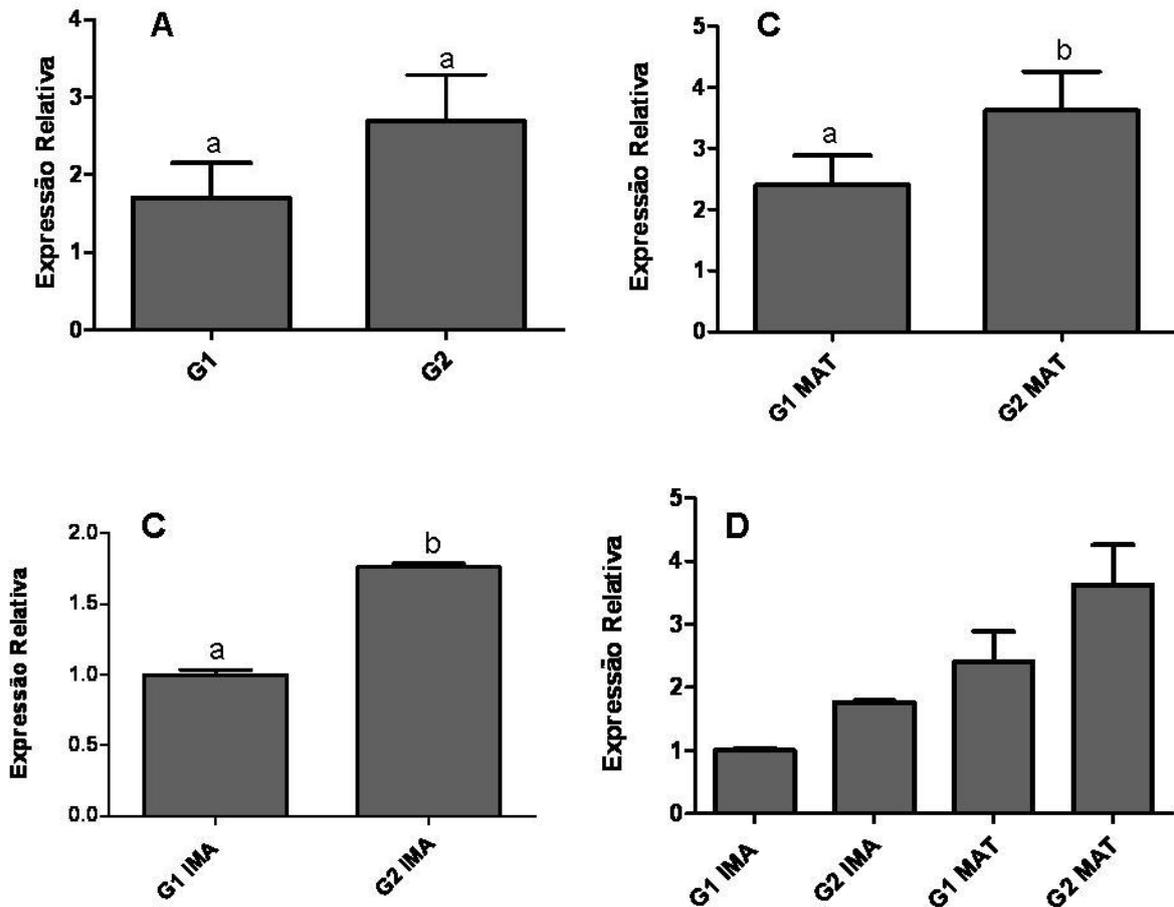


Figura 3 – Quantificação relativa da expressão gênica do gene Bcl-2 em dois grupos morfológicos de oócitos equinos: **A:** diferença os grupos G1 e G2; **B:** diferença entre os grupos G1 e G2 em estado imaturo; e **C:** diferença entre os grupos G1 e G2 após maturação *in vitro*. Em **D** encontram-se ilustradas as quantidades de mRNA nos diferentes grupos amostrais. Diferenças significativas estatisticamente ($P \leq 0,05$) estão indicadas pelos sobrescritos 'a' e 'b'. Abreviações utilizadas na figura: G1, grupo morfolologicamente viável; G2, grupo morfolologicamente menos viável; IMA, oócitos imaturos; MAT, oócitos maturados *in vitro*. N=2 repetições/pool, sendo cada um deles constituído de 62 CCOs.

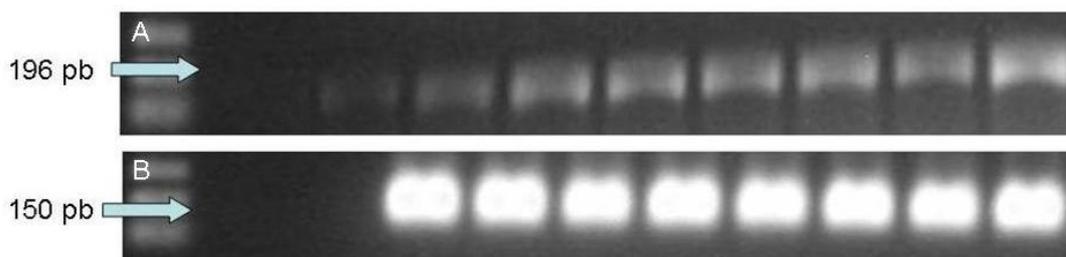


Figura 4 – Gel de agarose 1% confirmando a amplificação dos genes Bcl-2 (A), com 196pb, e GAPDH (B) com 150pb.

Com relação à maturação dos oócitos equinos, a quantificação relativa da expressão do gene Bcl-2 apresentou maiores níveis nos oócitos maduros, com relação aos imaturos, sendo essa diferença significativa ($P \leq 0,05$) (Fig. 6A). Não ocorreu aumento significativo da expressão do gene em nenhum dos dois grupos após a maturação ($P=0,339$) (Fig. 6B e 6C).

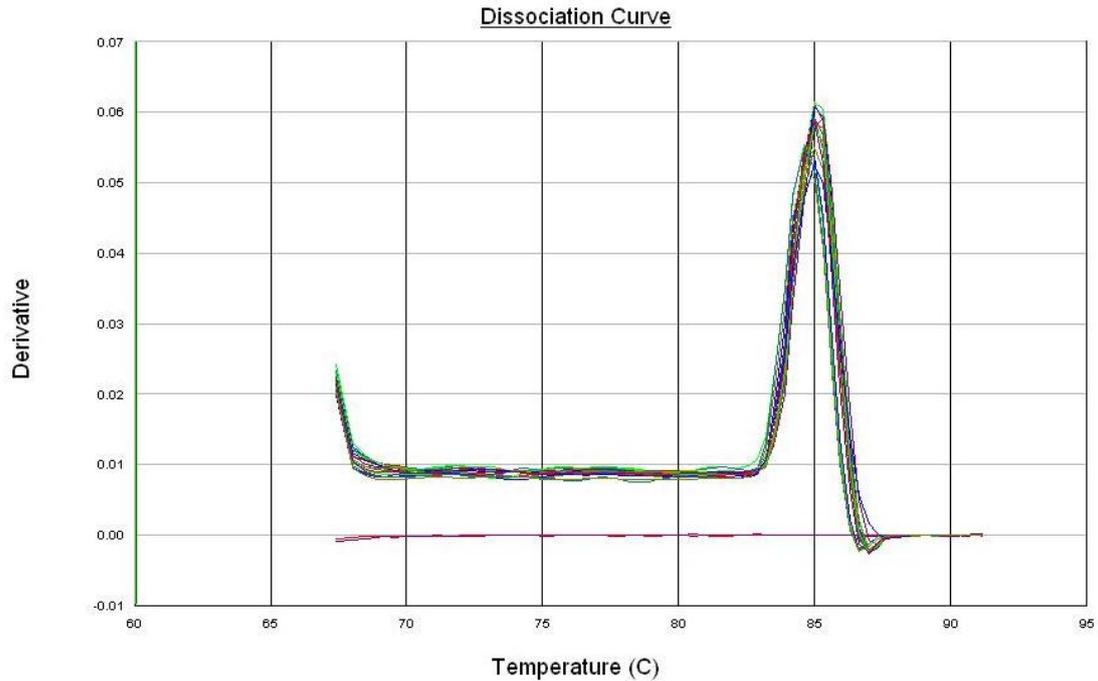


Figura 5 – Curva de Dissociação do gene GAPDH mostrando um único pico de amplificação.

No que diz respeito às células do *cumulus* equino, não ocorreu diferença significativa entre a expressão do gene Bcl-2 nos grupos maduro e imaturo ($P=0,420$) (Fig. 7A). Quando os grupos morfológicos foram submetidos à maturação, ocorreu diferença significativa ($P \leq 0,05$) de expressão entre as células de G1 (Fig. 7B), no entanto essa diferença não foi detectada em G2 (Fig. 7C).

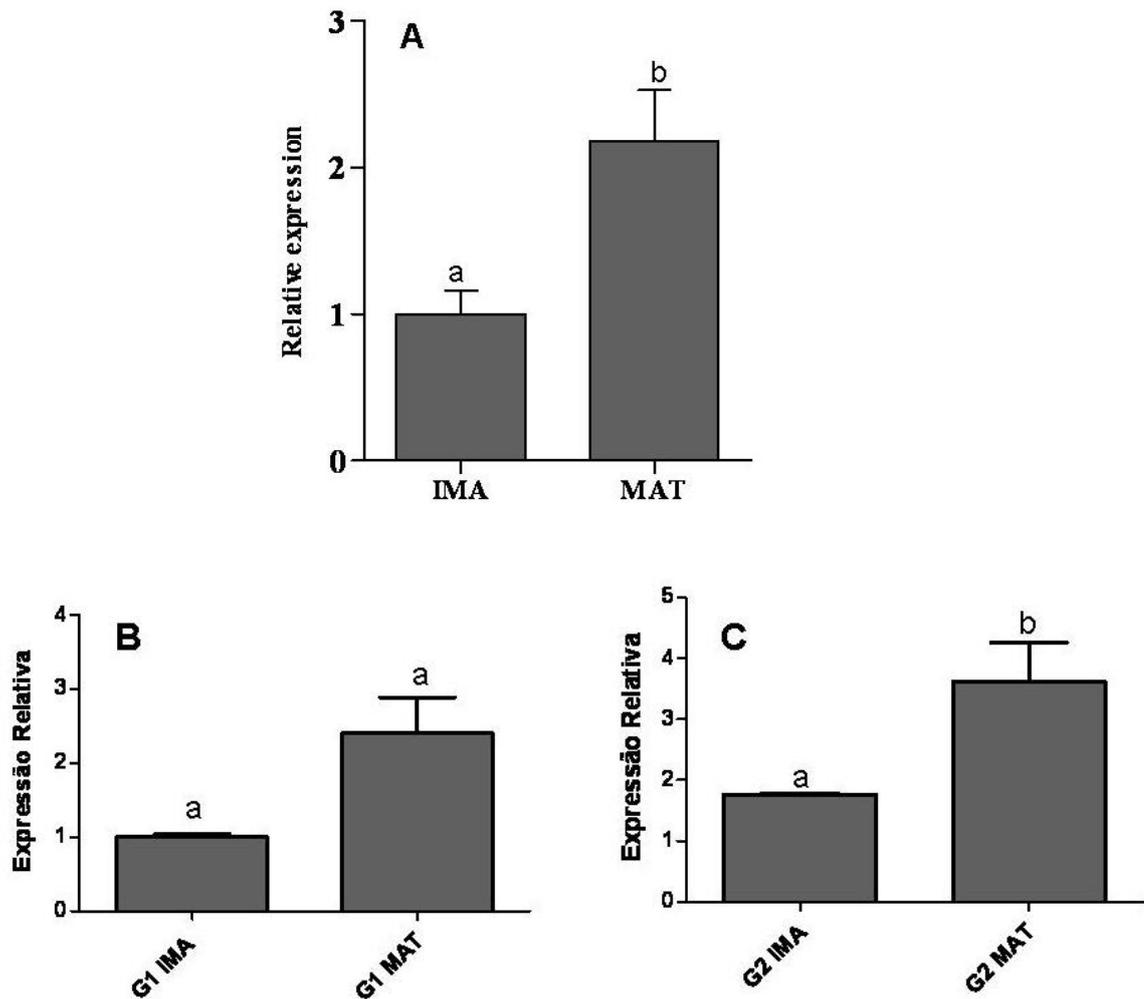


Figura 6 – Quantificação relativa da expressão gênica de Bcl-2 frente à maturação *in vitro* de oócitos equinos: **A**: diferença os grupos maturo e imaturo; **B**: diferença na maturação do grupo G1; e **C**: diferença em G2 após maturação *in vitro*. Diferenças significativas estatisticamente ($P \leq 0,05$) estão indicadas pelos sobrescritos 'a' e 'b'. Abreviações utilizadas na figura: G1, grupo morfológicamente viável; G2, grupo morfológicamente menos viável; IMA, oócitos imaturos; MAT, oócitos maturados *in vitro*. N=2 repetições/pool, sendo cada um deles constituído de 62 CCOs.

Para os grupos de viabilidade morfológica, ocorre diferença significativa ($P \leq 0,05$) de transcrição do gene Bcl-2 quando se compara G1 com G2, sendo a expressão maior em G2 (Fig. 7D). Entretanto, quando os grupos são comparados em um mesmo estágio de maturação, essa diferença transcricional não é significativa ($P=0,339$ para imaturos, e $P=0,170$ para maturos) (Fig. 7E e 7F).

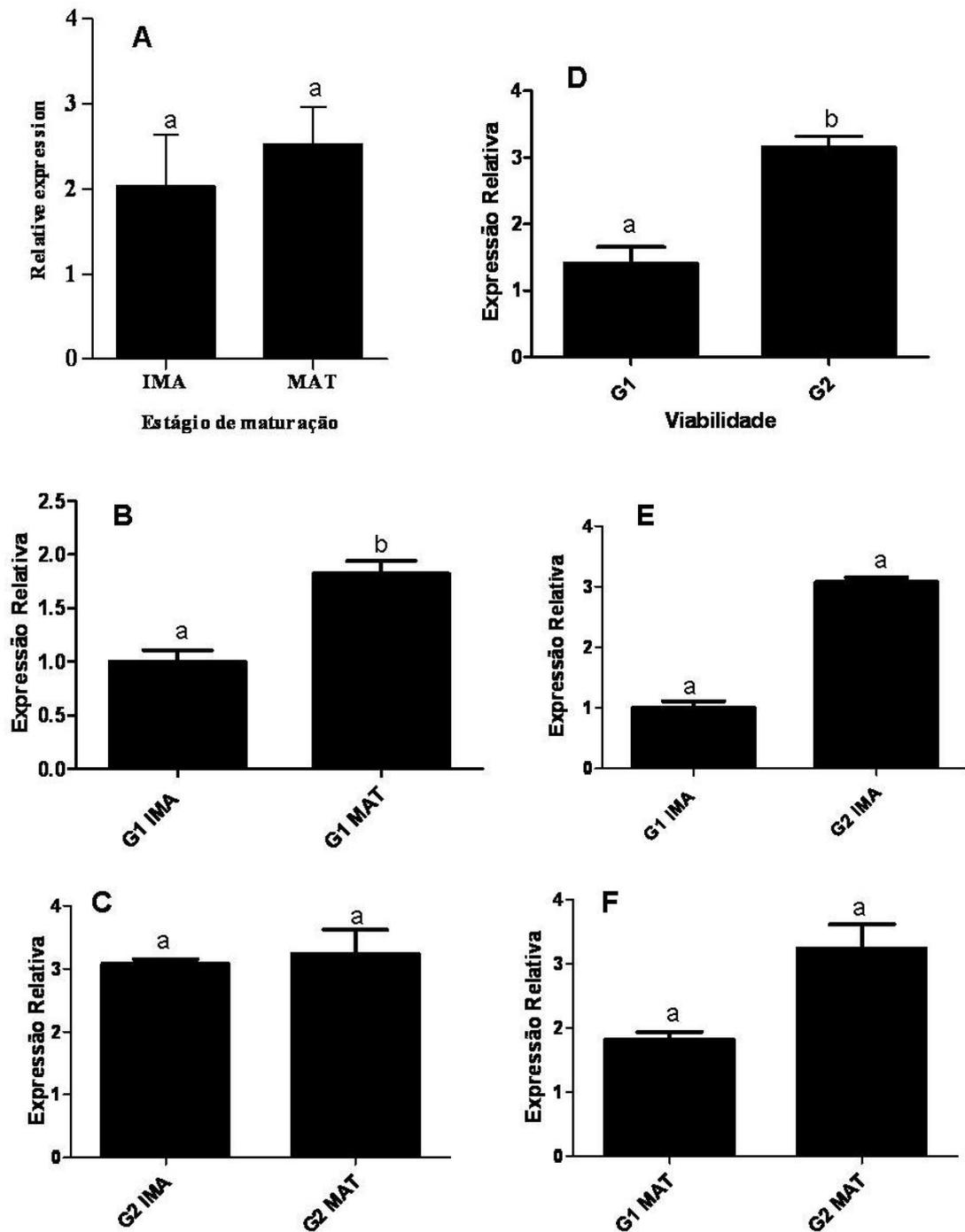


Figura 7 – Quantificação relativa da expressão gênica da proteína Bcl-2 frente a células do *cumulus* equino. Os gráficos A, B e C representam as diferenças de expressão com relação à maturação; e os gráficos D, E e F com relação a viabilidades dos grupos morfológicos. Diferenças significativas estatisticamente ($P \leq 0,05$) estão indicadas pelos sobrescritos 'a' e 'b'. $N=2$ repetições/*pool*, sendo cada um deles constituído de células correspondentes a 62 CCOs.

5. DISCUSSÃO

Os níveis de transcrição de importantes genes ligados ao desenvolvimento podem estar associados à qualidade de embriões e oócitos e, conseqüentemente, serem utilizados para avaliação das condições de cultivo *in vitro* (WRENZYCKI et al., 2005). Neste trabalho se investigou pela primeira vez os níveis de mRNA do gene Bcl-2, associado a apoptose, em oócitos equinos de diferentes qualidades morfológicas, e sua variação nos padrões de transcrição após maturação *in vitro*, pela técnica de PCR em tempo real.

O potencial de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* depende principalmente da qualidade dos oócitos dos quais se originam (MOTA, 2008), sendo a seleção destes baseada principalmente em aspectos morfológicos. Neste estudo, o nível de expressão do gene Bcl-2 foi significativamente maior ($P \leq 0,05$) em oócitos considerados morfolologicamente menos viáveis (G2 - número inferior a três camadas de células do *cumulus* e citoplasma com grânulos), quando estes são comparados aos morfolologicamente viáveis (G1 - número igual ou superior a três camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo) dentro de um mesmo estágio de maturação. Esse resultado discorda dos encontrados por Yang & Rajamahendran (2002), que encontraram maiores níveis de expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 em oócitos bovinos considerados morfolologicamente saudáveis.

Li et al. (2008), no entanto, encontrou maiores taxas de expressão de Bcl-2 em oócitos bovinos com granulações citoplasmáticas, quando comparados àqueles com citoplasma homogêneo. Esse resultado corrobora com os achados de Ambruosi et al. (2009) que demonstrou que a maioria dos oócitos equinos morfolologicamente saudáveis apresentam agregações de grânulos de lipídeos de forma polar no citoplasma, o que lhes confere uma aparência granular. Esse resultado aumentado na expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 em oócitos considerados com menor

capacidade de desenvolvimento, pode indicar que as características avaliadas com intuito de determinar a viabilidade de oócitos para a produção *in vitro* de embriões podem não ser adequadas, pois podem não representar a real capacidade de desenvolvimento oocitário.

Quando os grupos de viabilidade G1 e G2 são comparados sem levar em conta o estágio de maturação, não ocorre diferença significativa nos níveis de expressão do gene alvo ($P=0,218$). Esse resultado condiz com os achados de Pretheeban et al. (2009), que comparou os níveis de expressão de Bcl-2 em diferentes grupos morfológicos de oócitos bovinos produzidos *in vivo* e não encontrou diferença durante a quantificação de transcritos do gene nestes grupos.

A quantidade de transcritos de Bcl-2 encontrados em células do *cumulus* nos diferentes grupos deste trabalho mostrou que ocorre um aumento significativo na expressão dessas células quando se compara o grupo G1 com G2 ($P\leq 0,05$), e quando o grupo morfológico G1 é submetido à maturação *in vitro* ($P\leq 0,05$). Esse aumento inesperado da quantidade de Bcl-2 em células de G2 e em células maturadas pode ocorrer em resposta às injúrias sofridas durante a maturação *in vitro*, ou como uma maneira de compensar a menor viabilidade do grupo G2, evitando que as células entrem em apoptose. Maiores estudos a cerca desse fenômeno devem ser realizados, pois há evidências de que células apoptóticas do *cumulus* podem influenciar na maturação nuclear, citoplasmática e no desenvolvimento durante a pré-implantação do embrião, em bovinos (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000a).

A maturação *in vitro* de oócitos é uma etapa essencial para a produção *in vitro* de embriões, no entanto as condições às quais os oócitos são submetidos podem acarretar em mudanças na expressão gênica dessas células, como uma resposta às injúrias sofridas. Neste trabalho, oócitos equinos submetidos à maturação *in vitro* em líquido folicular, apresentaram um aumento significativo ($P\leq 0,05$) na expressão de Bcl-2, quando comparados à oócitos imaturos. Além disso, oócitos do grupo morfológico G2 obtiveram um acréscimo também significativo nos níveis de expressão de Bcl-2 quando maturados; resultado esse não observado em oócitos do grupo G1, sendo a diferença entre imaturos e maduros não significativa. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Warzych et al. (2007) ao submeter oócitos bovinos à maturação *in vitro*. Os resultados desse autor mostram um aumento, embora não significativo estatisticamente, nos níveis de expressão de Bcl-

2 em oócitos submetidos a condições diversas de maturação, quando comparados a oócitos imaturos. Embora a diferença entre oócitos maduros e imaturos do grupo morfológico G1 não tenha sido significativa, acredita-se que se o número amostral fosse maior, o erro padrão seria menor, acarretando em diferença transcricional significativa.

Os achados do presente trabalho discordam da hipótese inicial de que os níveis de expressão do gene Bcl-2 seriam maiores em oócitos considerados morfolologicamente saudáveis e de que aumentariam com a submissão destes à maturação *in vitro* (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002; KIM; TILLY, 2004). O resultado contrário pode ser interpretado como uma resposta destas células à menor viabilidade de G2 e como resposta às injúrias sofridas durante a maturação *in vitro*. Os níveis de expressão de Bcl-2 seriam aumentados a fim de evitar a morte celular por apoptose. Além disso, não há resultados de expressão gênica em oócitos da espécie equina descritos na literatura, havendo a possibilidade dessa espécie apresentar padrões de expressão diferenciados de outras já estudadas, como por exemplo, a espécie bovina. Ademais, a apoptose é um fenômeno complexo no qual estão envolvidos muitos fatores, não sendo possível determinar sua supressão ou ativação através de um único fator gênico. Faz-se, portanto, necessário o desenvolvimento de mais estudos a cerca da expressão gênica em oócitos equinos, levando também em consideração a utilização de outros genes alvos, como por exemplo o gene pró-apoptótico Bax, para um resultado mais preciso e detalhado.

6. CONCLUSÃO

A avaliação da expressão relativa do gene Bcl-2, relacionada ao processo de apoptose, mostrou que oócitos considerados morfológicamente menos viáveis possuem elevados níveis de expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2, e que a maturação *in vitro* afeta os níveis de transcrição do mesmo em oócitos equinos e células do *cumulus*.

- Oócitos considerados morfológicamente menos viáveis (G2) possuem maior nível de transcrição de Bcl-2 do que aqueles considerados morfológicamente saudáveis (G1).

- Oócitos menos viáveis apresentam maior acréscimo transcricional do gene quando submetidos à maturação *in vitro*, se comparados aos do grupo com maior viabilidade.

- Células do *cumulus* pertencentes ao grupo morfológico G2 apresentaram maior nível de expressão de Bcl-2 que o grupo G1. Após a maturação, variação significativa da expressão só foi encontrada no grupo morfológico G1.

REFERÊNCIAS

- ABADIA, M. E. N. C. **Transferência de embriões em bovinos: revisão de literatura**. 2006. 43 f. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Bovinos) – Pós-Graduação em Produção e Reprodução de Bovinos, Universidade Castelo Branco, Goiânia.
- AMBRUOSI, B.; LACALANDRA, G.M.; IORGA, A.I.; DE 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**, n. 71, p. 1093–1104, 2009.
- ANGUITA, B.; VANDAELE, L.; MATEASEN, B.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, *cumulus* cells and blastocysts. **Theriogenology**, v. 67, p. 537–549, 2007.
- ANTONSSON, Bruno; MARTINOU, Jean-Claude. The Bcl-2 Protein Family. **Experimental Cell Research**, n. 256, p. 50–57, 2000.
- BETTS, D.H.; KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v.55, p.171-191, 2001.
- BÉZARD J. In vitro fertilization in the mare. In: 12TH INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE ON BIOETHICS IN HORSE REPRODUCTION, 12. 1992, Crakow, Poland.
- BLONDIN, P., SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p. 54-62, 1995.
- BORNER C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, n. 39, p. 615–47, 2003.
- BRATTON, S.B. et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades. In death receptor and stress-induced apoptosis. **Experimental Cell. Research**, v.256, p.27–33, 2000.
- BRÜCK, I., GREVE, T., HYTTEL, P. Morphology of the oocyte-follicular connection in the mare. **Anatomy Embryology**, v.199, p.21-28,1999.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; ARAÚJO, M.C.C. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozoide na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.709-715, 2002.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; FERREIRA, A.M. Efeito do citrato e taurina em meio CR2aa no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.88-94, 2009.
- CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; AND LIU, I. Influence of Insulin-Like Growth Factor-I and Its Interaction with Gonadotropins, Estradiol, and Fetal Calf Serum on In Vitro

- Maturation and Parthenogenic Development in Equine Oocytes. **Biology of Reproduction**, n.65, p. 899–905, 2001.
- CHANG, S.H.; CVETANOVIC, M.; HARVEY, K.J.; KOMORIYA, A.; BEVERLY Z. PACKARD, B.Z.; UCKER, D.S. The effect phase of physiological cell death relies exclusively on the posttranslational activation of resident components. **Experimental Cell Research**, v. 277, n.1, p. 15-30, 2002.
- CHEN, L., RUSSELL, P. T., LARSEN, W. J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Molecular Reproduction and Development**, v.34, p.87-93, 1993.
- CHOI D.; HWANG S.; LEE E.; YOON S.; YOON B.; BAE D. Expression of mitochondria dependent apoptosis genes (p53, Bax, Bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development. **J. Society of Gynecologic Investigation** n. 11, p. 311–317, 2004.
- CHOI, Y.H., HOCHI, S., BRAUN, J., SATO, K., OGURI, N. *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and the slicing of ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 959-966, 1993.
- CNA, 2003. 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: 27 de novembro 2009.
- COLLEONI, S.; LUCIANO, A.M.; GANDOLFI, F. Cumulus–Oocyte Communications in the Horse: Role of the Breeding Season and of the Maturation Medium. **Reproduction in Domestic Animals** n. 39, p. 70–75, 2004.
- CORRÊA, Georgia Assis. **Tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo**. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
- CRYNS, V.; YUAN, J. Proteases to die for. **Genes & Development**, v.12, n.11, p.1551-1570, 1998.
- CURCIO, Bruna da Rosa. **Maturação e Vitrificação de Oócitos Equinos Incubados em Meio Contendo Hormônio do Crescimento e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I**. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- De LOOS, F.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.; KRUIP T. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, v.31, p.208-14, 1992.
- 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, p. 1139-1156, 1997.
- DESAGHER, S.; MARTINOU, J-C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, p. 369-77, 2000.

- DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, supl.1, p.115-130,2006.
- EMANUELLI, I.P. **Interação cumulus e oócito no processo de morte celular programada durante a produção de embriões bovinos *in vitro***. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- FARIA, M.H.G.; RÉGIA, M.S.V.; MORAES FILHO, M.O.; RABENHORST, S.H.B. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 4, p. 271-278, 2006.
- FERNANDES, C. B. **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. 129f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), UNESP, Botucatu.
- GALLI, C.; BARBACINI, S.; CROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; MARI, G.; BELLUZZI, S.; MARCHI, V.; LAZZARI, G. Pregnancies obtained from equine embryos produced *in vitro* by ICSI. In: 7TH WORLD CONGRESS OF WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION – 2001. Sorrento, Italy.
- 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**, v. 98, p. 39–55, 2007.
- 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, p. 563–570, 1998.
- GRAZUL-BILSKA, A.T.; REYNOLDS L. P.; REDMER, D. A. Gap junctions in ovaries. **Biology of Reproduction**, v.57, p.947-957,1997.
- GREEN, D.R.; EVAN, G.I. A matter of life and death. **Cancer Cell**, v.1, n.1, p.19-30, 2002.
- GREEN, R. E. **Princípios e Técnicas da Vitrificação de Embriões dos Animais Domésticos**. 2005. 21 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, UNESP, Botucatu.
- GRØNDAHL C, HYTTEL P, GRØNDAHL ML, ERIKSEN T, GOTFREDSEN P, GREVE T. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation *in vivo*. **Molecular Reproduction and Development** n. 42, p. 94–105, 1995.
- GROSS, A.; MCDONNELL, J.M.; KORSMEYER, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes and Development**, v.13, p.1899-1911, 1999.
- HAWK, H.W.; WALL, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**, v. 41, p.1571-1583,1994.
- HAWLEY, L. R., ENDRES, A. C., HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v.1, p. 243-252, 1995.

- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-6, 2000.
- HINRICHS K., SCHMIDT A. L., FRIEDMANN P. P., SELGRATH J. P., MARTIN, M. G. *In vitro* maturation of horse oocytes characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. **Biology of Reproduction**, v.48, p.363-370, 1993.
- HINRICHS, K., LOVE, C. C., BRINSKO, S. P., CHOI, Y. H., VARNER, D. D. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: Effects of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. **Biology of Reproduction**, v.67, p.256-262, 2002.
- 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.
- KERR, J.F.R.; WINTERFORD, C.M.; HARMON, B.V. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v.73, p.2013-2026, 1994.
- KIM, M.R., TILLY, J.L. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, p. 205–210. 2004.
- KOTHAKOTA, S. et al. Caspase 3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. **Science**, v.278, p.294-298, 1997.
- KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nature Medicine**, New York, v.3, p.614-620, 1997.
- KWIATKOWSKI, D.J. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. **Cell Biology**, v.11, p.103-108, 1999.
- LEON, P.M.M.; CORCINI, C.D.; SANTOS, E.C.S.; RAMBO, G.; LUCIA Jr., T.; DESCHAMPS, J.C. Vitrification of immature equine oocytes in solid surface. In: I JORNADAS INTERNACIONALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGIA EM REPRODUCCIÓN ANIMAL, FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS – UBA. 52, 2008, Buenos Aires /Argentina.
- LI, H.J.; LIU, D.J.; CANG, M.; WANG, L.M.; JIN, M.Z.; MA, Y.Z.; SHORGAN, B. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**. n.14, p. 89-98, 2009.
- LIU HC, HE ZY, MELE CA, VEECK LL, DAVIS OK, ROSENWAKS Z. Expression of IGFs and their receptors is a potential marker for embryo quality. **American Journal of Reproductive Immunology**. n. 38, p. 237–245, 1997.
- 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.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IFV-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137-152, 2006.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos-dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, p. 17-22, 2008.

- LUCIANO, A.M.; GOUDET, G.; PERAZZOLI, F.; LAHUEC, L.; GÉRARD, N.
Glutathione content and Glutathione Peroxidase expression *in vivo* and *in vitro* matured equine oocytes. **Molecular Reproduction And Development**, n. 73, p. 658–666, 2006.
- MACLELLAN, L. J., CARNEVALE, E. M., COUTINHO DA SILVA, M. A., SCOGGIN, C. F., BRUEMMER, J. E., SQUIRES, E. L. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. **Theriogenology**, v.58, p. 911-919, 2002.
- MARCHAL, R., CAILLAUD, M., MARTORIATI, A., GERARD, N., MERMILLOD, P., GOUDET, G. Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1013–1022, 2003.
- MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v.8, p.57-68, 2000.
- MAZOOCHI, T.; SALEHNIA, M.; POURBEIRANVAND, S.; FOROUZANDEH, M.; MOWLA, S.J.; HAJIZADEH, E. Analysis of apoptosis and expression of genes related to apoptosis in cultures of follicles derived from vitrified and non-vitrified ovaries. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.3, p. 155–164, 2009.
- MCEVOY TG, COULL GD, BROADBENT PJ, HUTCHINSON JS, SPEAKE BK. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility** V. 118, p. 163–70, 2006.
- MCPARTLIN, L.A.; SUAREZ, S.S.; CZAYA, C.A.; HINRICHS, K.; BEDFORD GUAUS, J.S. Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful In Vitro Fertilization of Equine Oocytes. **Biology of Reproduction** (2009) DOI:10.1095/biolreprod.108.074880.
- MELLO, M.R.B.; QUEIROZ, V.S.; LIMA, A.S.; TAVARES, L.M.T.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.D.; WHEELER, M.B.; VISINTIN, J.A. Cryopreservation of mouse morulae through different methods: slow-freezing, vitrification and quick-freezing. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 160-164, 2001.
- MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.; MULLAART, E.; [RUIGHA](#), L.; [KAALA](#), L.; [VOSEB](#), P.L.A.M.; [DIELEMAN](#), S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v.59, p.651-674, 2003.
- MOTA, Gustavo Bruno. **Desenvolvimento e expressão gênica em oócitos bovinos imaturos selecionados por Azul Cresil Brilhante**. 2008. 62 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) –Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade de Viçosa, Viçosa.
- MUZIO, M. et al. An induced proximity model for caspase-8 activation. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.2926-2930, 1998.
- NICACIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O; CAETANO, H.V.A.; GERGER, R.P.C.; MARQUES, M.G.; MELLO, M.R.P.; MENDES, C.M.; MILAZZOTTO M.P.; OLIVEIRA, V.P.; SIMÕES, R.; YAMADA, C.; VISINTIN, J.A. Criopreservação e

- desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 1, p. 51-56, 2006.
- OPIELA, J.; KAŁTSKA-KSIAŻKIEWICZ, L.; LIPIN´SKI, D.; SŁOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYN´SKA, 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**, v. 69, p. 546–555, 2008.
- ORIEF, Y.; SCHULTZE-MOSGAU, A. Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques? **Middle East Fertility Society Journal**, v. 10, n. 3, p. 171-184, 2005.
- PALMER, E.; BÉZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, G. In vitro fertilization in the horse: a retrospective study. **Journal Reproduction Fertility**, v. 44, p. 375–384, 1991.
- PARK SY, KIMEY, CUI XS, TAE JC, LEE WD, KIM NH, PARK SP, LIM JH. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. **Zygote**, n. 14, p. 125–131, 2006.
- PEREIRA, G. R.; LORENZO, P. L.; CARNEIRO, G. F.; BILODEAU-GOESEELS, 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.
- PEREIRA, M.M.; BATISTA, R.I.T.; WOHLRES-VIANA, S.; BOITÉ, M.C.; SERAPIÃO, R.V.; POLISSENI, J.; IGUMA, L.T.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M. Relação entre qualidade morfológica de complexos *cumulus*-oócitos bovinos e potencial de desenvolvimento *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.1182, 2007.
- PEREZ, G.I.; TILLY, J.L. *Cumulus* cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. **Human Reproduction**, Oxford, v.12, p.2781-2783, 1997.
- POMAR, F.J.R.; TEERDS, K.J.; KIDSON, A.; COLENBRANDER, B.; THARASANIT, B.; AGUILAR, B.; ROELEN, B.A.J. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. **Theriogenology**, n. 63, p. 2254–2268, 2005.
- PRETHEEBAN, T.; GORDON, M.; SINGH, R.; PERERA, R.; RAJAMAHENDRAN, R. Differential mRNA expression in *in vivo* produced pre-implantation embryos of dairy heifers and mature cows. **Molecular Reproduction & Development**, v. 76, p. 1165–1172, 2009.
- SATHANANTHAN, A. H. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: Unique aspects of human oocyte. **Microscopy Research and Technique**, v. 27, p. 145-164, 1991.
- SHABPARED, V., SQUIRE, E. L., SEIDEL, G. E., JASKO, D. J., Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*, **Theriogenology**, v.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. 489-496, 1988.
- SMAILI, S.S.; HSU, Y.-T.; CARVALHO, A.C.P.; ROSENSTOCK, T.R.; SHARPE, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.2, p.183-190, 2003.
- SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.
- SQUIRES, E. L.; WILSON, J. M.; KATO, H.; BLASZCYK, A. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v. 45, p. 306, abstract, 1996.
- STURMEY RG, O'TOOLE PJ, LEESE HJ. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. **Reproduction**, v. 132, p. 829–37, 2006.
- TAKASE, K.; ISHIKAWA, M.; HOSHIAI, H. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v.175, p.69-76, 1995.
- TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. [Apoptosis: controlled demolition at the cellular level](#). **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, n. 9, p. 231-241, 2008. doi:10.1038/nrm2312
- TESTART, J.; LASSALLE, B.; FRYDMAN, R.; BELAISCH, J. C. A study of factors affecting the success of human fertilization *in vitro*. II. Influence of semen quality and oocyte maturity on fertilization and cleavage. **Biology of Reproduction**, v.28, p.425-431, 1983.
- THOMPSON, J.G.; PETERSON, A.J. Bovine embryo culture *in vitro*: new developments and post-transfer consequences. **Human Reproduction**, v.5, p.59-67, 2000.
- TILLY, J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v.1, p. 162–172, 1996.
- TREMOLEDA, J. L.; STOUT, T. A. E.; 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, p. 1895–1906, 2003.
- VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 357–64, 2000.
- VIANA, J.H.M. Cenário atual da transferência de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* no Brasil e no mundo. **O Embrião**, n. 29, p. 4-7, 2006.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.915-924, 2007.
- WALKER SK, HARTWICH KM, SEAMARK RF. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. **Theriogenology**, n. 45, p. 111–20, 1996.

- 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.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v.68, p.77-83, 2007.
- YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.70, n.3-4, p.159-169, 2002.
- YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Involvement of apoptosis in the atresia of nonovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1313-1321, 2000a.
- YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Morphological and biochemical identification of apoptosis in bovine follicular cells and effects of follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.62, p.1209-1217, 2000b.
- YIN, X.M.; OLTVAI, Z.N.; KORSMEYER, S.J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. **Nature**, v.369, p.321-333, 1994.
- ZEUNER, A. et al. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v.59, n.5-6 p.1421-1433, 2003.