UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ISABELE PICADA EMANUELLI

**Interação *cumulus* e oócito no processo de morte celular
programada durante a produção de embriões bovinos *in*
*vitro***

Pirassununga

2005

ISABELE PICADA EMANUELLI

***Interação cumulus e oócito no processo de morte celular
programada durante a produção de embriões bovinos in
vitro***

Dissertação apresentada à
Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a obtenção
do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira
Meirelles

Pirassununga

2005

A fluorescence micrograph showing a large, curved, green-fluorescing structure, likely a cumulus, and a smaller, more intensely fluorescent, rounded structure, likely an oocyte, positioned to the right. The background is dark.

ISABELE PICADA EMANUELLI

**Interação *cumulus* e oócito no processo de morte celular
programada durante a produção de embriões bovinos *in vitro***

Pirassununga

2005

*A minha vó Rita (in memorium) pelo
exemplo de vitalidade e força.*

*Aos meus queridos pais, Eduardo e
Elizabete, por todo o amor, carinho,
compreensão e sabedoria que me deram.*

*Aos meus queridos irmãos Eduardo, Mauren
e Tatiana que tanto amo e que sempre me
apoiaram.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, por proporcionar a realização do Mestrado.

À minha família, pelo amor, carinho e o apoio emocional e estimulante que sempre me deram.

À minha segunda família: meus amigos-irmãos aqui de Pirassununga, que me ajudaram nas horas difíceis em que a saudade de casa “batia”.

À minha eterna “irmãzinha” aqui de São Paulo Fernanda (Xeilly).

Aos meus “irmãos” de coração Lígia e Amaury, por terem me ajudado em várias fases do mestrado e dado apoio nas horas difíceis.

Aos amigos Paula e Sancho, por serem amigos, e em muitos momentos terem me ajudado.

Aos amigos e colegas Alexandre, Felipe (Bрита), Fernando, Martini, Marquinhos, Minos, Moyses, Paty, Paulo, Pedrinho, Salsicha, Raquel, Sylvia, Tiago e Weruska, pela amizade, convivência e parceria no trabalho e nas festas.

Aos amigos Angélica, Fabiano, Laura, Sandro, Rodrigo (Bugiu), Rodrigo, Tatiana, e tantos outros parceiros de trabalho e festas.

À minha amiga Silvia Carambula, pela ajuda, amizade, conselhos, e principalmente pelo estímulo a Ciência.

Aos meus queridos amigos Érika, Marcinha, Fabiano, Márcia, Alfredo, Zeca, Graci, Arthur e todos meus amigos lá do Sul que mesmo estando longe sempre me apoiaram.

Ao Prof. Dr. Paulo Bayard, por estimular e incentivar o gosto pela ciência e pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Claudia Leal, pelos conselhos, amizade e ajuda no mestrado.

Aos funcionários do LMMD, Giovana e Nilton, pela convivência e ajuda na conclusão do mestrado.

Aos funcionários da biblioteca em especial a Patrícia e a Iara, pelo auxílio prestado.

Aos animais, vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humanidade, que com seus olhos humildes nos falam de sua vontade de viver, meu respeito e eterna gratidão.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Especialmente ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, pela orientação, ensinamentos, estímulo e amizade. Obrigada.

A Deus pela vida.

" Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.

Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas não vai sozinho, nem nos deixa sós.

Leva um pouco de nós mesmos.

Há os que levam muito.

Mas não há os que não levam nada.

Há os que deixam muito.

Mas não há os que não deixam nada.

Esta é a mais bela responsabilidade em nossa vida, a prova suprema de que as pessoas não se aproximam por acaso.

O amor e a alegria são os elementos básicos para conquistarmos amizades e as conservarmos.

E são básicos, também, para nossa paz mental.

Demonstre amor e alegria em todas as oportunidades, e veja que a paz nasce dentro de você.

A felicidade não pode estar em nada que esteja fora de você.

Busque-a dentro de você mesmo, pois a felicidade é Deus, e Deus mora dentro de você. "

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

EMANUELLI, I.P. **Interação *cumulus* e oócito no processo de morte celular programada durante a produção de embriões bovinos *in vitro***. 93 f. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

Cerca de 40% dos oócitos bovinos fecundados não completam o desenvolvimento da fase de pré-implantação. A aquisição da competência para o desenvolvimento do oócito depende de alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares. Essas alterações ocorrem tanto nos oócitos como nas células do *cumulus*. O presente trabalho estudou a interação *cumulus* e oócito no processo de morte celular programada nos complexos de *cumulus oophoros* (COCs) de diferentes classes morfológicas em bovinos. Os COCs foram puncionados de ovários de abatedouro, selecionados e classificados em 3 qualidades morfológicas: A: *cumulus* completo; B: *cumulus* parcial; C: *cumulus* expandido (todos com ooplasma homogêneo). Os COCs foram utilizados para avaliação da maturação nuclear em 0 e em 24h de cultivo do grau de fragmentação do DNA das células do *cumulus* (CC) antes e após a maturação *in vitro*, avaliação da competência do desenvolvimento embrionário partenogenético até o 9º dia pós-ativação, avaliação da qualidade dos blastocistos e estimativa dos transcritos e proteínas BCL-2 e BAX em CC maturados por 24h. Os resultados obtidos demonstraram que a maioria dos oócitos imaturos do grupo COC-A estavam em estágio de VGi e apresentavam dano mínimo ou inexistente no DNA. Ao contrário, os COCs B e C após a retirada do folículo apresentavam-se em estágio mais avançado de VG e fragmentação do DNA. Após a maturação dos COCs houve um aumento significativo dos núcleos fragmentados nos grupos COC-C e principalmente no COC-B. A morfologia dos COCs alterou a quantidade de oócitos que conseguiram ultrapassar o bloqueio embrionário e desenvolver à blastocisto e não a qualidade dos blastocistos. A expressão da proteína BCL-2 nos COCs não diferiu entre as diferentes morfologias de COCs. No entanto, a razão entre as proteínas BCL-2/BAX foi maior nos grupos com o *cumulus* completo e no grupo com o *cumulus* expandido. O grupo de COC-B foi o que apresentou maior quantidade da proteína BAX e menor relação entre as proteínas BCL-2/BAX. Com base nestes resultados, conclui-se

que em COCs de diferentes morfologias existe uma correlação negativa entre fragmentação nuclear e potencial de desenvolvimento embrionário, e ainda que a baixa razão das proteínas BCL-2/BAX está relacionada com o aumento de fragmentação nuclear nas CC. No entanto, essa relação não ocorre com transcritos dos genes *BCL-2* e *BAX*.

Palavras chave: células do *cumulus*; oócitos; qualidade; apoptose; BAX; BCL-2; bovino.

ABSTRACT

EMANUELLI, I. P. ***Cumulus-oocyte interaction in programmed cellular death during bovine embryo *in vitro* production***. 2005. 93 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

About 40% of fertilized bovine oocytes do not complete development during the preimplantation period. It is known that the *in vitro* embryo production system is influenced by several factors, among them, the morphological quality of *cumulus*-oocyte complexes (COCs). The present work aimed to study the *cumulus*-oocyte interaction on the process of programmed cell death in bovine COCs of different morphological classes. The COCs were obtained from bovine ovaries and classified according to the morphology of their *cumulus* cell layers, as follows: class A, compact and with many layers; class B, compact with few layers; class C, expanded (all classes with homogeneous ooplasm). Before *in vitro* maturation (IVM), the nuclear maturation in COCs and DNA fragmentation in *cumulus cells* (CC) were evaluated. After IVM, oocytes and CC were analyzed for nuclear maturation, DNA fragmentation and *BCL-2* and *BAX* transcripts and proteins. The developmental competence and quality of parthenogenetic embryos at the 9th day post-activation were also analyzed. The results showed that the majority of class A immature oocytes were at iGV stage, with minimal or inexistent DNA fragmentation, contrasting with the other classes of oocytes. In immature class B and C oocytes, the fGV stage of nuclear maturation was the most frequent, with increased DNA fragmentation. After IVM, an increase in DNA fragmentation was observed in B and C COCs, mainly in B group. The morphological type of COCs was not related with blastocyst quality, but affected the proportion of embryos capable of overcoming developmental block and reaching the blastocyst stage. *BCL-2* protein in CC had the same expression level in all the COCs groups. However, the *BCL-2*/*BAX* proteins ratio was higher in A and C groups. COC-B had the highest *BAX* expression and lower ratio. These data demonstrate that there is a negative correlation between DNA fragmentation in CC and embryo developmental potential in different morphological types of COCs, and that the lower the *BCL2*/*BAX* protein ratio the greater the DNA fragmentation in CC, but this relation does not occur with transcripts.

Keywords: *cumulus* cells; oocyte; quality; apoptose; *BAX*; *BCL-2*; bovine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Membros da família BCL-2 anti-apoptóticos e pró-apoptóticos. Estruturas homólogas dos domínios BH 1-4 mais a porção hidrofóbica carboxi-terminal (TM). Adaptado de GROSS et al. 1999.....30
- Figura 2 - Aspiração de folículo ovariano bovino oriundo de abatedouro com seringa de 10 mL e agulha 18G.39
- Figura 3 - Líquido folicular em repouso de 15 minutos após punção dos folículos ovarianos.40
- Figura 4 - COCs bovinos imaturos divididos em três categorias morfológicas que formam os grupos experimentais: A) COC-A com *cumulus* completo e compacto; B) COC-B com *cumulus* parcial e compacto e C) COC-C com *cumulus* expandido.40
- Figura 5 - Fotomicroscopia em esteriomicroscópio dos grupos experimentais antes e após a maturação de 24h. A e B) COC-A; C e D) COC-B; E e F) COC-C.....42
- Figura 6 - Classificação dos graus de fragmentação do DNA das células do *cumulus* pela técnica de Ensaio Cometa: A) grau 1 B) grau 2 e C) grau 3. O tamanho da cauda é proporcional ao dano encontrado no DNA.....44
- Figura 7 - Técnica de ensaio cometa nas CC de COCs bovinos em 0h (A, C, E) e 24h (B, D, F) de maturação nas 3 qualidades morfológicas: COC-A (A e B); COC-B (C e D; COC-C (E e F). Nas setas os graus de fragmentação: a) grau 1; b) grau 3 e c) grau 2.50
- Figura 8 - Detecção de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL em COCs de 3 qualidades morfológicas em 0h de maturação. Na primeira coluna temos a coloração com FITC (nucleotídeo marcado) e na segunda coluna a coloração pelo Hoechst; a) controle negativo; b) COC-A; c) COC-B; d) COC-C. Nas setas, as células que fluorescem verde pela incorporação do nucleotídeo marcado com o corante FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma do oócito é *background*.52
- Figura 9 - Detecção de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL em COCs de 3 qualidades morfológicas em 24h de maturação *in vitro*. Na primeira coluna temos a coloração com FITC (nucleotídeo marcado) e na segunda coluna a coloração pelo Hoechst; a) controle negativo; b) COC-A; c) COC-B; d) COC-C. Nas setas, as células que fluorescem verde pela incorporação do nucleotídeo

marcado com o corante FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma do oócito é <i>background</i>	53
Figura 10 - Percentual de embriões oito células em 48hpa e em 90hpa com as diferentes qualidades morfológica dos COCs.	55
Figura 11 - Fotomicrografia em epifluorescência da técnica de coloração diferencial por fluorocromo em embriões no estágio de blastocisto com 9 dias após a ativação partenogenética de oócitos oriundos de diferentes morfológicas de COCs: a) COC-A; b) COC-B; c) COC-C. Os núcleos com fluorescência azul, corados com Hoechst 33342, foram considerados células da MCI e os núcleos com fluorescência vermelha, corados pelo iodeto de propídio, foram considerados células do TE.	57
Figura 12 - Fotomicrografia em epifluorescência para detecção das proteínas BAX pela técnica de imunohistoquímica. Foram utilizadas amostras de COCs maturados por 24h, de qualidades morfológicas distintas: COC-A, COC-B e COC-C. a) coloração pelo Hoechst; b) coloração com FITC. As células fluorescem em verde pela a ligação do anticorpo marcado com FITC ao primeiro anticorpo BAX.....	59
Figura 13 - Fotomicrografia em epifluorescência para detecção das proteínas BCL-2 pela técnica de imunohistoquímica. Foram utilizadas amostras de COCs maturados por 24h, de qualidades morfológicas distintas: COC-A, COC-B e COC-C. a) coloração pelo Hoechst; b) coloração com FITC. As células fluorescem em verde pela a ligação do anticorpo marcado com FITC ao primeiro anticorpo BCL-2.	60
Figura 14 - Padrão de expressão do mRNA dos genes <i>BCL-2</i> e <i>BAX</i> e suas possíveis isoformas. a) CC oriundas de COCs com <i>cumulus</i> completo; b) CC oriundas de COCs com <i>cumulus</i> parcial; e c) CC oriundas de COCs com <i>cumulus</i> expandido. Setas indicam os transcritos dos genes <i>BAX</i> e <i>BCL-2</i> : I) isoforma α do gene <i>BAX</i> ; II) isoforma Ψ do gene <i>BAX</i> ; e III) gene <i>BCL-2</i> . As isoformas dos transcritos do gene <i>BAX</i> foram confirmadas por sequenciamento: α – 579pb, Ψ - 290pb. A amplificação dos transcritos pela PCR Duplex foi verificada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.	62
Figura 15 - Esquema ilustrativo de um possível mecanismo de <i>feedback</i> positivo entre oócitos e células do <i>cumulus</i> , onde as concentrações de Fatores Sinalizadores produzido pelas células foliculares (FSCF) controlam a produção do oócitos de fatores protetores da fragmentação celular (FPF).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estádio de maturação nuclear de oócitos não maturados (0h) nas 3 qualidades morfológicas estudadas.....	48
Tabela 2 - Estádio de maturação nuclear de oócitos maturados <i>in vitro</i> por 24h nas 3 qualidades morfológicas estudadas.....	49
Tabela 3 - Grau de fragmentação do DNA nas CC das 3 qualidades morfológicas antes e após o período de 24h de maturação.....	51
Tabela 4 - Grau de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL nas CC de 3 qualidades morfológicas antes e após o período de 24h de maturação <i>in vitro</i>	54
Tabela 5 - Competência oocitária de oócitos partenogenéticos (oriundo de COCs A, B e C) em alcançar o estágio de oito células rápido (48h hpa) ou lento (90h hpa).....	55
Tabela 6 - Taxa de clivagem, desenvolvimento até blastocisto no dia 7 sobre a taxa de clivagem e sobre o total de oócitos e eclosão no dia 9 após a ativação dos grupos morfológicos COC-A, COC-B e COC-C.	56
Tabela 7 - Avaliação do número de núcleos da Massa Celular Interna (MCI) e trofotoderma (TE) em embriões no estágio de blastocisto com 9 dias após a ativação partenogenética de oócitos oriundos de COCs de 3 qualidades morfológicas diferentes: COC-A, COC-B, COC-C.	57
Tabela 8 - Proporção da expressão dos transcritos de BCL-2 em relação aos transcritos de BAX total, BAX α e BAX Ψ em CC oriundas de diferentes morfologias de COCs maturados por 24hlogias de COCs maturados por 24h.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

6-DMAP – 6-dimetilaminopurina

AI - Anáfase I

AMPC - Monofosfato de adenosina cíclico

ATP - Trifosfato de adenosina

BCL-2 - *B cell leukemia/lymphoma 2*

CAD – *caspase-activated DNase*

CC - Células do *cumulus*

cDNA – DNA complementar

CG - Células granulosas

CIV - Cultivo de embriões *in vitro*

CL - Corpo lúteo

COCs - Complexos do *cumulus oophorus*

CT - Células da teca

DEPC – Dietil pirocarbonato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

FAS – Fator de necrose tumoral

FD - Folículo dominante

FIV - Fecundação *in vitro*

FNT - Fator de necrose tumoral

FNT – Fator de necrose tumoral

FSH – Hormônio folículo estimulante

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

ICAD – *Inhibitor of caspase – activated DNase*

ICE – *Interleukin 1b-converting enzyme*

JG - Junções comunicantes do tipo *Gap*

LH – Hormônio luteinizante

MCI - Massa celular interna

MCP - Morte celular programada

MI - Metáfase I

MII - Metáfase II

MIV - Maturação *in vitro*

OR - Oxigênio reativo

P₄ - Progesterona

PIV - Produção de embriões *in vitro*

PS - Fosfatidilserina

RNA – Ácido ribonucleico

RVG - Rompimento da vesícula germinativa

TE - Trofotoderma

TI - Telófase I

TN - Transferência nuclear

TUNEL – *Terminal deoxynucleotil transferase Uracil Nick End Labeling*

VG - Vesícula germinativa

VGf - Vesícula Germinativa final

VGi - Vesícula Germinativa inicial

ZP - Zona pelúcida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Oogênese	20
2.2	Ovário bovino na vida pós-natal.....	20
2.2.1	Desenvolvimento folicular	20
2.2.2	Regulação da atresia folicular.....	22
2.2.3	Regulação da maturação oocitária.....	23
2.3	Papel das células foliculares e interação cumulus-oócito.....	25
2.4	Onda Folicular	26
2.5	Morte Celular.....	27
2.5.1	Morte celular programada / Apoptose	27
2.5.2	Mecanismos da Apoptose	29
2.5.3	Apoptose em tecidos gonadais	33
2.5.4	Apoptose nas células foliculares.....	34
2.5.5	Apoptose nos oócitos.....	35
2.5.6	Embriogênese e apoptose	36
2.6	Hipótese	38
2.7	Objetivo	38
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	Local do Experimento	39
3.1.1	Coleta dos oócitos.....	39
3.1.2	Classificação morfológica dos COCs	40
3.1.3	Maturação <i>in vitro</i>	41
3.1.4	Ativação Partenogenética	42
3.1.5	Cultivo dos embriões <i>in vitro</i>	43
3.1.6	Experimentos realizados.....	43
3.2	Análise Estatística	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Experimento 1: Avaliação da maturação nuclear	48
4.2	Experimento 2: Avaliação do dano do DNA das CC (Ensaio Cometa)	49
4.3	Experimento 3: Análise de fragmentação do DNA dos COCs (TUNEL).....	51

4.4	Experimento 4: Avaliação da competência do desenvolvimento embrionário	54
4.5	Experimento 5: Avaliação qualitativa dos embriões que chegaram a blastocisto.....	56
4.6	Experimento 6: Imunofluorescência para detecção das proteínas BAX e BCL-2 em COCs	58
4.7	Experimento 7: PCR Competitivo para os transcritos de BAX e BCL-2.....	61
5	DISCUSSÃO	63
6	RESUMO DOS RESULTADOS	71
7	CONCLUSÃO.....	73
8	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas, as pesquisas em reprodução animal tiveram um grande avanço principalmente na área de biotecnologia aplicada. As biotécnicas da reprodução possuem grande importância no manejo reprodutivo assistido, pois são ferramentas com grande potencial de auxílio ao entendimento dos mecanismos fisiológicos animal. Outra contribuição das biotécnicas da reprodução é no aproveitamento de gametas de animais com características fenotípicas e genotípicas desejáveis e o intercâmbio de material genético entre países. Além da importância zootécnica, as pesquisas de biotecnologias *in vitro* possuem papel fundamental para permitir o estudo dos mecanismos fisiológicos básicos que ocorrem *in vivo*.

A produção de embriões *in vitro* (PIV) é uma das biotecnologias que vem se aprimorando, devido ao grande potencial para a produção de embriões em larga escala comercial e para a realização de técnicas afins como a transferência de núcleo. Ambas as técnicas são de grande importância para as atuais estratégias de seleção e melhoramento animal. Apesar do avanço, grande parte da fisiologia do desenvolvimento embrionário nos mamíferos ainda é desconhecida. Essa informação é de extrema importância para o aprimoramento da qualidade dos embriões produzidos *in vitro*, bem como para o entendimento básico da ciência.

Atualmente, a PIV é desenvolvida rotineiramente em laboratórios de pesquisa e comercial, mediante a maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo de embriões *in vitro* (CIV) até o estágio de blastocisto. Apesar da criteriosa seleção de oócitos e da otimização dos meios de MIV, FIV e CIV, cerca de 40% dos oócitos bovinos fecundados *in vitro* não desenvolve após os primeiros ciclos de clivagem pela falta de competência em ultrapassar o 4º ciclo celular (MERMILLOD; MARCHAL et al., 1999). Diversas causas estão relacionadas com este fenômeno, conhecido como bloqueio do desenvolvimento embrionário. Sabe-se que a eficácia do sistema de produção de embriões *in vitro* é influenciada por diversos fatores, entre eles, a qualidade das células do *cumulus* (CC) e dos oócitos. Habitualmente, as equipes que realizam estas técnicas empregam uma seleção visual dos

complexos do *cumulus oophorus* (COCs). A qualidade morfológica avaliada é indicativa de competência do oócito para a produção de embriões *in vitro*.

Os folículos, juntamente com os seus complexos de *cumulus oophorus*, são submetidos a várias alterações fisiológicas durante o ciclo estral e podem ativar diferentes mecanismos ligados a sobrevivência e a morte das células do *cumulus*. Atualmente, vem sendo estudado em camundongos, a influência dos mecanismos de apoptose das células do *cumulus* sobre o desenvolvimento dos embriões durante o período de pré-implantação. Em bovinos, há poucos relatos descritos sobre a relação de apoptose entre CC e o oócito.

Tendo em vista a heterogeneidade dos COCs recuperados dos ovários coletados em abatedouro (GINTHER, 2000), a interação entre oócito e *cumulus* (PEREZ; TILLY, 1997) e a constatação de morte celular programada (MCP) nas CC (TILLY, 1996); o presente trabalho teve como objetivo verificar a interação *cumulus* e oócito no processo de morte celular programada em complexos de *cumulus oophorus* de diferentes classificações morfológicas em bovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Oogênese

A oogênese ocorre no início da vida fetal com o desenvolvimento do oócito e do folículo, terminando meses ou anos mais tarde, dependendo da espécie (BAKER et al., 1972). Ao final da proliferação mitótica, que ocorre ao redor dos 50 dias no bovino, as oogônias iniciam a meiose progredindo até a fase de leptóteno da primeira prófase meiótica (BAKER, 1971). Nesta fase, conhecida como primeiro bloqueio meiótico, o oócito organiza seu núcleo em vesícula germinativa (VG) e interrompe a meiose. O reinício da meiose ocorre de maneira gradual, no decorrer da vida reprodutiva do animal, quando o folículo e o seu respectivo oócito podem entrar em atresia ou serem recrutados para uma onda folicular que culmina com a ovulação.

2.2 Ovário bovino na vida pós-natal

Nos mamíferos, a gônada feminina é responsável pela diferenciação e desenvolvimento da oogônia até a maturação do oócito visando a fertilização e conseqüentemente a manutenção da espécie. O ovário também é um órgão endócrino que produz esteróides e outros hormônios peptídios que regulam a maioria dos mecanismos ligado à reprodução da fêmea. Um ovário funcional depende de três eventos principais que ocorrem durante estádios adiantados da oogênese: reinício da meiose, formação e crescimento folicular.

2.2.1 Desenvolvimento folicular

O folículo é uma das unidades funcionais do ovário com função de proporcionar um micro-ambiente para o crescimento do oócito, além de ser responsável pela produção de hormônios (GORDON, 1994). O folículo ovariano é uma estrutura altamente complexa composta por tipos distintos de células somáticas, além da célula germinal. O oócito e as

células somáticas que os rodeiam mantêm uma íntima associação durante todo o desenvolvimento primordial até os estágios pré-ovulatórios (DE LOOS et al., 1991).

No início da vida pós-natal, o ovário bovino apresenta um grande *pool* de folículos primordiais; contudo, menos de 0,1% desses cresce, madura e ovula durante a vida reprodutiva da vaca. Muitos dos folículos recrutados para uma onda folicular crescem e entram em atresia (ERIKSON, 1966).

O folículo primordial é constituído por um oócito central rodeado por uma camada simples de células achatadas que originarão as células granulosas (CG). As células pré-granulosas situam-se em uma delicada membrana seguida das células estromais que darão origem às células da teca (CT; GOUGEON, 1996). Em bovinos, a ativação do crescimento de um folículo primordial é caracterizada pela aquisição de uma camada completa de 11-20 CG cubóides envolvendo o oócito, formando assim o folículo primário. A progressão para o estágio de folículo secundário é caracterizada pelo aparecimento da segunda camada de CG (DRIANCOURT, 1991) e pelo início da formação da zona pelúcida (ZP) mediante o depósito de mucopolissacarídeos ao redor do oócito (BAKER et al., 1972; FAIR et al., 1997a). O desenvolvimento para o estágio de folículo secundário é também associado ao reinício da síntese de RNA pelo oócito (FAIR et al., 1997b).

A transição para folículo terciário pode ocorrer quando um folículo secundário atinge de 2 a 7 camadas de CG e uma fina camada de células do estroma ao seu redor. O início desta fase folicular coincide com a proliferação e com a diferenciação das células que rodeiam o oócito. Internamente, ocorre a proliferação das CG formando uma cavidade (antro folicular) entre as camadas de CG preenchida de um líquido conhecido como líquido folicular. Juntamente com a formação do antro, ocorre a diferenciação dessas células em duas subpopulações organizadas: as células da granulosa murais e as células do *cumulus*. As CG murais são epiteliais pseudoestratificadas e estão em contato com a membrana basal que envolve o folículo e as CC envolvem o oócito e se unem por junções comunicantes do tipo *Gap* (JG) ao oócito e as CG murais. Externamente, ocorre o início da diferenciação das células do estroma ovariano em CT (DRIANCOURT, 1991; GORDON, 1994). Nesta estrutura terciária inicial, a atividade transcricional do oócito é mantida. Para que isso ocorra, existe a necessidade do oócito possuir pelo menos um nucléolo ativo, tendo em vista o seu importante papel na transcrição de RNA (HYTTEL et al., 2001). A atividade transcricional continua até o folículo alcançar 2-3 milímetros e o oócito um diâmetro de aproximadamente 110 μ m (CROZET et al., 1986; FAIR et al., 1995; FAIR et al., 1996). Após esta fase, os oócitos dos folículos terciários cessam seu crescimento, contudo o tamanho dos folículos

continua aumentando juntamente com a cavidade antral e o líquido folicular. Em bovinos, estes folículos crescem de tamanho até alcançarem 8-9 mm, quando ocorre a chamada divergência folicular. Neste momento, apenas um folículo, conhecido como folículo dominante (FD), continua seu crescimento tornando-se maior e os demais folículos cessam seu crescimento e regridem por atresia (SAVIO et al., 1988). Durante o crescimento do FD até a sua ovulação, diversas alterações estruturais ocorrem no interior do oócito, como o aumento dos níveis de lipídios, a diminuição do tamanho do complexo de Golgi e uma posição mais superficial dos grânulos corticais. Ao final da maturação, antes do período pré-ovulatório, a membrana nuclear do oócito do FD começa a ficar mais delgada e os nucléolos sofrem vacuolização (FAIR et al., 1997ab). As CC, formadoras da corona radiata, se alongam tendo como resultado a retração da membrana mais superficial do oócito e a ampliação do tamanho do espaço perivitelínico (ASSEY et al., 1994). Estas mudanças ocorrem antes do surgimento do pico do hormônio luteinizante (LH) e são denominadas de pré-maturação ou capacitação oocitária (HYTTEL et al., 1997). Após este período, ocorre o pico pré-ovulatório de LH que precede a ovulação estimulando a expansão das CC e a transformação das CG em células luteais (GORDON, 1994).

2.2.2 Regulação da atresia folicular

A morte das células ovarianas é um evento crucial na manutenção da homeostasia ovariana dos mamíferos. Menos de 1% dos oócitos e folículos sobrevive até a ovulação, pois a grande maioria vai sendo eliminada por um processo degenerativo conhecido como atresia (BAKER et al., 1972; ERICKSON, 1966). A maior parte das perdas por degeneração ocorre antes do nascimento afetando as oogônias na interfase e durante a divisão mitótica, bem como oócitos em todos os estádios meióticos, especialmente em paquíteno e diplóteno (BAKER et al., 1972).

Existem fortes indícios de que a atresia folicular ocorra por mecanismos apoptóticos (HUGHES; GOROSPE, 1991; TILLY et al., 1991) caracterizados como a morte celular programada (MCP; KERR et al., 1972 apud TILLY, 1996). Os mecanismos envolvidos na MCP serão abordados no item 2.5.1.

Vários experimentos constataram a presença de processos apoptóticos no corpo lúteo (CL) envelhecido, sendo este essencial para a manutenção da ciclicidade e para produção e liberação de progesterona (P_4) durante as fases de estro/metaestro do ciclo (AMSTERDAM; SELVARAJ, 1997; AMSTERDAM et al., 1998; AMSTERDAM et al., 1999; CARAMBULA et al., 2002; TILLY et al., 1991;).

2.2.3 Regulação da maturação oocitária

O oócito competente deve sofrer uma maturação nuclear e citoplasmática para ter um desenvolvimento normal. Do mesmo modo, as células somáticas têm um importante papel na regulação do processo de maturação do oócito. A maturação oocitária compreende o período do reinício da meiose (após o primeiro bloqueio meiótico) até o término da primeira divisão meiótica, quando o oócito permanece em metáfase II (MII). Este é conhecido como o segundo bloqueio meiótico, no qual o oócito pode ser fecundado e dar continuidade à meiose II, ou degenerar 28-32 horas pós-ovulação ao término da sua meia vida (CHA; CHIAN, 1998; MAYES; SIRARD, 2001).

Vários fatores atuam sobre o oócito imaturo a fim de torná-lo hábil à fecundação e à produção de um embrião viável. A maturação inadequada do núcleo ou do citoplasma, ou a falta de sincronia entre elas pode inviabilizar a fecundação, aumentar as ocorrências de polispermia, de partenogênese ou bloqueio embrionário (BEVERS et al., 1997; BLONDIN et al., 1997; HYTTEL et al., 1997).

2.2.3.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear compreende o processo de reversão do primeiro bloqueio meiótico do oócito em VG até o segundo bloqueio meiótico em MII.

A meiose no oócito é iniciada durante o desenvolvimento dos ovários fetais com o início da primeira divisão meiótica permanecendo no estágio de diplóteno (formação da VG). A maturação nuclear inicia-se no momento em que ocorre a retomada da meiose, a partir do estágio de diplóteno da prófase I com o rompimento da vesícula germinativa (RVG). As alterações morfológicas observadas no núcleo envolvem a condensação dos cromossomos e o rompimento do envelope nuclear (VG) marcando o final da prófase I. A desintegração completa da VG ocorre quando as membranas formam vesículas, as quais associam-se ao retículo endoplasmático. Pós-fecundação ou pós-ativação partenogenética, estas formarão a membrana do(s) pró-núcleo(s). Após o RVG, o oócito passa pelo estágio de diacinese, metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), completando a primeira divisão meiótica, e então, rapidamente, passam para MII da segunda divisão meiótica. Como consequência dessas alterações, os cromossomos homólogos se separam com a formação do primeiro corpúsculo polar (CHA; CHIAN, 1998; LONERGAN et al. 1997; MAYES e SIRARD, 2001; SIRARD et al., 1989; WU et al., 1997;).

O tempo requerido para a maturação nuclear varia conforme a espécie e o tipo de maturação estudada, *in vivo* ou *in vitro*. Em oócitos bovinos *in vivo*, o reinício da meiose

ocorre após o aumento transitório pré-ovulatório de gonadotrofina (LH) e o RVG ocorre de 8-12 horas após este aumento, a MI de 12-15 horas, a AI e a TI de 15-18 horas e a MII de 18-22 horas (SIRARD et al., 1989; WU et al., 1997).

2.2.3.2 Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática compreende as mudanças citoplasmáticas ultra-estruturais que ocorrem no oócito do estágio de VG até o final da MII. A avaliação dessa maturação citoplasmática pode ser feita indiretamente pela habilidade do oócito maduro em clivar e desenvolver-se a blastocisto após fecundação ou ativação partenogenética. Na fecundação, a ativação ocorre pela liberação de Ca^{++} dos estoques intracelulares, após a fusão do espermatozóide com o citoplasma do oócito. Partenogeneticamente, os oócitos maduros (MII) são ativados através de estímulos físicos, como pulso elétrico (LEAL; LIU, 1998) ou estímulos químicos, como ionomicina ou outros inóforos de Ca^{++} associados ou não ao 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), estrôncio, etanol ou a combinação destes. Outros parâmetros morfológicos indiretos como a expansão das CC, a velocidade da extrusão do primeiro corpúsculo polar e aumento do espaço perivitelínico, também podem ser utilizados para avaliação da maturação citoplasmática (KRUIP et al., 1983).

Nos mamíferos, à medida que o oócito incrementa o seu diâmetro, observa-se a proliferação e redistribuição de várias organelas citoplasmáticas. O espaço perivitelínico aparece ao mesmo tempo em que a qualidade e o volume de retículo endoplasmático liso e rugoso decresce no ooplasma (FAIR et al., 1997a). No decorrer da reorganização citoplasmática, a maioria das organelas migra para o centro da célula modificando a sua aparência. Esta migração, via de regra, é dependente dos microtúbulos (HYTTEL et al., 1989; KIM et al., 1996). As mitocôndrias e o complexo de Golgi que se localizavam periféricamente no oócito imaturo migram e se distribuem na posição peri-nuclear. Os grânulos corticais, originados do complexo de Golgi e situados originalmente no centro do oócito, deslocam-se para a periferia do oócito após o RVG unindo-se à membrana citoplasmática (CRAN, 1989). A liberação dos grânulos corticais altera as propriedades físicas e químicas da zona pelúcida, levando ao endurecimento da zona, ao aumento do tamanho do espaço perivitelínico e ao impedimento da polispermia. A alteração na posição dos grânulos corticais é o sinal mais visível da maturação citoplasmática (HYTTEL et al., 1986; HYTTEL; MADSEN, 1987; HYTTEL et al., 1989).

2.3 *Papel das células foliculares e interação cumulus-oócito*

As CC são consideradas um subtipo das CG, por isso elas mantêm algumas das propriedades das CG, incluindo ligações a gonadotrofinas e síntese de esteróides (GORDON, 1994). No folículo pré-ovulatório, elas diferem quanto à resposta as gonadotrofinas, que nas CC estimulam a produção e secreção do ácido hialurônico, mas não exercem este efeito sobre as CG. Durante todo o processo de maturação oocitária existe uma íntima associação entre o oócito e as CC. Esta associação se dá principalmente pelas terminações celulares das CC conhecida como JG (do inglês *gap junctions*), presentes frequentemente nos COCs intra-foliculares (MORI et al., 2000; TATEMOTO et al., 2000). Em bovinos, após a retirada do COCs do folículo, verifica-se uma diminuição dessas comunicações até o final da maturação (MII) quando aparecem em número muito reduzido (DE LOOS et al., 1991). Segundo Thomas et al. (2004), no momento da punção de folículos entre 3-8mm, temos 100% das JG entre oócito/CC ou CC/CC íntegras. Este valor decresce chegando à aproximadamente 18% em 21 horas de maturação. Cada JG é composta por seis subunidades idênticas (hexâmeros de proteína pertencentes à família das conexinas) arranjadas de maneira a formar um poro central de aproximadamente 35 Ângstrons. Por esse poro podem passar moléculas hidrofílicas menores que 1000 daltons, dirigindo-se do citoplasma de uma célula à outra célula adjacente (LOEWENSTEIN, 1987). Entre outras, uma das funções das CC é fazer a glicólise e produzir piruvato (via metabólica, ausente no início do desenvolvimento). Essa produção é exportada para o oócito, sendo suficiente para suprir energeticamente tanto o oócito quanto o embrião pré-implantado (AHUJA, 1988; GARDNER; LEESE, 1990). Além disso, este contato físico tem um papel fundamental no controle da maturação do oócito, pois segundo Hashimoto et al. (1998), a adição de CC no meio de maturação não afeta o perfil de maturação, fertilização e de desenvolvimento de oócitos destituído de CC (oócito desnudo). Com isso, as JG são responsáveis por transmitir sinais elétricos e transportar moléculas das células para o oócito como é o caso do AMPc (BONI et al., 2002). O AMPc é um mediador químico intracelular denominado adenosinamonofosfato cíclico responsável pela ativação de uma cascata de enzimas dentro da célula. O bloqueio meiótico oocitário é mantido pelas concentrações elevadas de AMPc no líquido folicular, que são transmitidas ao oócito através dos processos intercelulares do *cumulus*-oócito. Por tanto, a diminuição destas junções intercelulares, provavelmente afeta a estabilidade do bloqueio meiótico (AKTAS et al., 1995).

2.4 Onda Folicular

As variações do ciclo estral interferem diretamente no desenvolvimento dos folículos e seus COCs. O desenvolvimento folicular ocorre em ondas de crescimento, que podem variar de 2 ou 3 por ciclo estral. Em média, a cada 21 dias ocorre também o aumento transitório de do hormônio luteinizante (LH) e a ovulação (GINTHER, 2000).

Conforme mencionado anteriormente, o desenvolvimento folicular ovariano nas vacas ocorre em ondas foliculares. Cada onda é caracterizada pelo recrutamento de um grupo de folículos antrais pequenos, sendo que apenas um folículo é selecionado para adquirir a dominância sobre os demais e o restante dos folículos regride. A título de exemplo, em animais que manifestam duas ondas de crescimento folicular, o FD da primeira onda folicular atinge seu maior tamanho no dia 7 ou 8 do ciclo estral (dia do estro designado como dia 0), mantendo sua dominância morfológica e funcional até em torno do dia 11, quando torna-se atresico começando a regredir entre os dias 11 e 14 para ser substituído por uma segunda onda folicular. Durante o ciclo estral, o número de ondas de crescimento folicular é determinado pelo tamanho da fase luteal. Se a concentração circulante de P_4 baixa, pela regressão espontânea do CL, o FD jovem termina o seu crescimento e ovula logo após o aumento transitório de LH. Após a segunda onda folicular, se os níveis de P_4 ainda encontram-se elevados, o FD da segunda onda entra em atresia e uma terceira onda folicular emerge (SIROIS; FORTUNE, 1988; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000a; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000b).

Os mecanismos moleculares relacionados com a indução da atresia folicular do FD não ovulatório, devido aos níveis elevados de P_4 , ainda são obscuros. Estudos sugerem que a atresia folicular na vaca, na galinha, nas porcas e nos roedores está associada com a apoptose (TILLY et al., 1991; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000a). Há evidências que a P_4 pode ter papel principal na atresia folicular (TAYLOR et al., 1993). Já foi relatado que as gonadotrofinas possuem o papel crítico de impedir o mecanismo de apoptose das CG de folículos antrais de bovinos e de ratos (CHUN et al., 1994; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000ab). Além disso, há evidências que os esteróides ovarianos inibam (estrógeno) ou induzam (andrógenos) o processo de apoptose em CG de ovários de ratos imaturos hipofisectomizados e com implante de estrógeno (BILLIG et al., 1993). Entretanto, ainda existem controvérsias sobre o efeito da P_4 na apoptose dos folículos ovarianos.

2.5 Morte Celular

A morte celular é definida como a perda irreversível da estrutura e das funções vitais. Ela pode ocorrer por dois processos morfológicamente distintos: necrose ou ancose e apoptose. Sabe-se atualmente que os dois fenômenos podem contribuir para a morte celular em COCs e embriões, no entanto a morte celular por apoptose aparece com maior frequência, principalmente nos blastômeros embrionários. A opção da célula por uma dessas formas de morte pode ser influenciada pelo seu estado energético (reserva de ATP). Como processo ativo, a apoptose requer reservas de ATP (pelo menos nas fases iniciais), ao passo que a necrose se instala na ausência do ATP (WYLLIE et al., 1980).

A necrose se caracteriza pela perda da integridade da membrana plasmática. Com a perda de integridade ocorre a liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular, o que estimula a resposta inflamatória e amplia a lesão tecidual (BETTS; KING, 2001; TRUMPT et al., 1965; WYLLIE et al., 1980).

A apoptose, conhecida também como a morte celular programada da célula, é um processo ativo caracterizada pela autodigestão controlada dos constituintes celulares, devido à ativação de proteases intracelulares. A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular sem que haja extravasamento do conteúdo celular interno para o meio externo e em consequência estimule uma resposta inflamatória ampliando a lesão até às células vizinhas (BETTS; KING, 2001; MATWEE et al., 2000; PAROLIN; REASON, 2001).

2.5.1 Morte celular programada / Apoptose

Na metade do século XX, muitas observações indicavam que a morte celular tinha um papel importante durante os processos fisiológicos dos organismos multicelulares, principalmente na embriogênese e nas metamorfoses (GLUECKSMANN, 1951 apud GEWIES, 2003; LOCKSHIN; ZACHERI, 2001;). O termo morte celular programada (MCP) foi introduzido no mundo científico a partir de 1964, propondo que a morte da célula durante o desenvolvimento não é de natureza acidental, mas uma seqüência de etapas controladas que conduzem a autodestruição (LOCKSHIN; WILLIAMS, 1964).

A palavra apoptose (do grego *apo* = separação, *ptôsis* = queda), adotado pela primeira vez na década de 70, designa a forma fisiológica de morte celular (KERR et al., 1972 apud TILLY, 1996). Este termo foi designado em analogia ao fenômeno natural das folhas caírem das árvores ou das pétalas caírem das flores. Há controvérsias na utilização de apoptose e de MCP como sinônimos ou termos permutáveis (MAJNO; JORIS, 1995). O termo apoptose

define todos os mecanismos e processos envolvidos antes, durante e depois da morte celular: (1) indução da morte celular – estímulos externos; (2) morte celular propriamente dita - desencadeamento de mecanismos morfológicos e bioquímicos; e (3) absorção dos corpos apoptóticos por células vizinhas. Já o uso da terminologia MCP envolve apenas os mecanismos morfológicos e bioquímicos específicos que a própria célula desencadeia para induzir a sua morte (LOCKSHIN; WILLIAMS, 1964; KERR et al., 1972 apud TILLY, 1996; SAUNDERS, 1966).

O processo de apoptose ocorre pela transcrição de genes e ativação de enzimas específicas que desencadeiam um processo de autodigestão controlada por proteases endógenas. Esta forma de morte celular ocorre com intuito de remover células lesadas, infectadas, senescentes ou que simplesmente perderam sua função para o organismo, sem alteração do microambiente celular e livre de inflamação.

A apoptose é um processo de morte ativa das células íntegras de organismos multicelulares e pode ser comparada metaforicamente a um "suicídio celular". 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 contêm 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).

Em células indenes, a distribuição de fosfatidilserina (PS) se faz primariamente na porção interna da bicamada lipídica da membrana celular. Durante o processo de apoptose, esse lipídio se expõe na porção externa da membrana. O novo posicionamento da PS serve como sinalizador para que células fagocitárias das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de apoptose (FADOK et al., 1992; REUTELINGSPERGER; VAN HEERDE, 1997). Martin et al. (1995), constatou que a exteriorização da PS em algumas variedades de células murinas e humanas é um evento adiantado e difuso no processo de apoptose e que outros eventos do processo de MCP antecedem a translocação da fosfatidilserina, um fosfolipídio de membrana.

As células apoptóticas podem ser reconhecidas por mudanças morfológicas esteriotípicas. No início, o núcleo torna-se picnótico e a cromatina vai se condensando nas porções adjacentes à membrana nuclear (microscopia eletrônica). Finalmente, o núcleo entra em colapso e a cromatina se fragmenta. O aspecto bioquímico mais associado com apoptose é a quebra do DNA cromossômico catalisada por endoenzimas Ca^+/Mg^+ dependentes

(WYLLIE et al., 1980; KERR et al., 1994). Essa quebra do DNA nuclear ocorre em consequência aos eventos moleculares e bioquímicos que resultam na ativação de enzimas proteolíticas, que por sua vez, ativam as DNases mediadoras da fragmentação internucleossomal do DNA, bem como a lise de substratos específicos de proteínas que determinam a integridade e a forma do citoplasma (SARASTE; PULKKI, 2000). Estas DNases endógenas cortam as regiões internucleossomais em fragmentos de 180 à 200 pares de bases (pb) expondo a extremidade 3' da fita de DNA (ALNEMRI; LITWACK, 1990; DIDENKO; HORNSBY, 1996; WYLLIE et al., 1980).

2.5.2 Mecanismos da Apoptose

Os mecanismos de MCP podem ser ativados por estímulos externos, mediante ligação com receptores específicos da superfície celular, chamados receptores da morte, ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA, perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas (CHANG et al., 2002). Estes diferentes estímulos celulares podem alterar o padrão de proteínas mitocondriais relacionadas a apoptose. A alteração deste padrão pode culminar na ativação de proteases conhecidas como caspases (CRYNS; YUAN, 1998; VAN LOO et al., 2002).

A indução da apoptose ocorre de maneira diferente dependendo do tipo de célula e o estágio 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 (caspase 3 e 8; CRYNS; YUAN, 1998).

Existem várias famílias de genes envolvidas nesse processo, uma dessas famílias é a do gene *BCL-2* (B cell leukemia/lymphoma 2) que pode estar presente no citosol bem como em organelas como as mitocôndrias. O primeiro integrante desta família, o *BCL-2* proto-oncogênico, foi descoberto pela translocação cromossômica t(14;18) de células linfocitárias B de humanos (WYLLIE et al., 1980; HOCKENBERY et al., 1990; OHMORI et al., 1993). Esta família de proteínas é composta por antagonistas da morte (*BCL-2*, *BCL-X_L*, *BCL-W*, *MCL-1*) e agonistas da morte (*BAX*, *BKA*, *BAD*, *BID*, *BIK*, *BCL-X_s* e outros; GROSS et al., 1999; Figura 01). Estas proteínas compartilham estruturas homólogas dos domínios BH1, 2, 3 e 4, embora nem todos os membros possuam todos os domínios. 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).

Figura 1 Membros da família BCL-2 anti-apoptóticos e pró-apoptóticos. Estruturas homólogas dos domínios BH 1-4 mais a porção hidrofóbica carboxi-terminal (TM). Adaptado de GROSS et al. 1999.

Oltvai et al. (1993) também estudaram a ligação dos membros dessa família com o processo de apoptose e propôs que há uma relação entre os subconjuntos de proteínas, como é o caso do BAX e BCL-2, em determinar a susceptibilidade da célula a um sinal de morte programada. A alteração do padrão transcricional do gene *BCL-2* pode culminar na ativação de proteases responsáveis diretas pelo processo de MCP (OHMORI et al., 1993).

As proteínas da família BCL-2 podem estar inseridas na membrana mitocondrial na forma de dímeros ou polímeros e sua estrutura quaternária está diretamente relacionada com seu poder de inibir ou ativar a apoptose (KROEMER, 1997). A proteína BAX é um membro pró-apoptótico da família da BCL-2 que, na ausência de estímulos apoptóticos, encontra-se predominantemente solúvel no citosol. Por outro lado, na presença de estímulos apoptóticos, ocorre a translocação dessa proteína do citosol para as mitocôndrias e sua inserção nas membranas mitocondriais (WOLTER et al., 1997; ZHANG et al., 1998). Os mecanismos pelos quais a BAX é inserida nessas membranas ainda não estão elucidados, mas tal evento pode estar associado à formação do poro transitório de permeabilidade. Por este poro, ocorre a liberação do Ca^{2+} mitocondrial para o citoplasma celular, causando um aumento do Ca^{2+} citosólico (SMAILI et al., 2003). Não se sabe se uma elevação de Ca^{2+} citosólico serve de

sinal para a translocação da BAX e para a amplificação do sinal apoptótico na presença de um determinado estímulo. Além disso, a propagação do sinal de Ca^{2+} entre células pode indicar que os aumentos de Ca^{2+} citosólico são importantes para transmissão dos sinais apoptóticos entre diferentes células (BAYSAL et al., 1994; CASTILHO et al., 1998; GUNTER et al., 1998).

Os mecanismos de comunicação entre as células como as JG têm sido freqüentemente relacionadas a processos de disseminação de morte celular. No entanto, a forma como estas junções celulares mediam tal processo ainda não está elucidada (GUTHRIE et al., 1999). Existem ainda outras proteínas inibidoras da apoptose como a BCL-xl e proteínas indutoras da apoptose como a BAD e a BAK.

A ação no processo de apoptose das proteínas pertencentes à família BCL-2 situa-se ao nível dos poros da membrana mitocondrial, permitindo ou não a saída do citocromo c que é um ativador de caspase. As caspases, cisteíno proteases homólogas ao ced-3 do *C. elegans*, exercem importante papel na rede sinalizadora da apoptose, as quais são ativadas em cascatas (BRATTON et al., 2000). O nome caspase originou-se de duas características estruturais das proteases: o "c" é uma referência a cisteíno-protease e o "aspase" refere-se à habilidade da molécula clivar logo após o ácido aspártico, o que confere a característica catalítica dessa família de proteases. Com isso foi possível a identificação de 7 tipos de caspases nas drosófilas e 14 tipos diferentes nos mamíferos, sendo que a caspase 11 e caspase 14 foram identificadas apenas nos ratos. A primeira enzima dessa família descrita em mamíferos foi a ICE (interleukin-1b converting enzyme), hoje caspase 1. A sua identificação foi possível por uma de suas funções: ativar a interleucina-1b, proteína importante no sistema imune, mas depois ela atraiu maior atenção pelo seu papel na apoptose (DENAULT; SALVESEN, 2002; RICHARDSON; KUMAR, 2002).

A subdivisão das caspases é baseada na análise filogenética, na especificidade de seu substrato e no tamanho de seu pró-domínio: (1) caspases iniciadoras, as quais incluem as caspases 8 e 9 contendo os pró-domínios longos que permitem interagir com as proteínas adaptadoras específicas tendo a função de ativar diretamente ou indiretamente as caspases efetoras (BRATTON et al., 2000; MUZIO et al., 1998); (2) caspases efetoras incluem as caspases 3, 6 e 7, as quais contêm pró-domínios curtos e sua ação ocorre pela clivagem de proteínas estruturais e regulatórias como a DFF45/ICAD, as citoqueratinas, as gelsolinas, as lamininas e as actinas (KOTHAKOTA et al., 1997; KWIATKOWSKI, 1999).

As caspases estão presentes no citoplasma sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas, após clivagem proteolítica à altura do ácido aspártico. Uma vez ativada, a

maioria das caspases tem a habilidade de catalisar a ativação de vários outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica (THOMPSON, 1999). Uma caspase é capaz de clivar outras e esta habilidade parece ser essencial para ativação dessas enzimas. Ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outras, em seqüência, até gerar uma caspase efetora. Esta destrói proteínas essenciais à célula, ativa proteínas tóxicas ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose. Vários experimentos em laboratório sugerem uma hierarquia na ativação das caspases, mas esta ordem e as caspases envolvidas podem diferir, dependendo do modo de indução da apoptose (THORNBERRY et al., 1997; NICHOLSON, 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. A caspase 3 cliva uma proteína denominada ICAD (do inglês, inhibitor of caspase-activated DNase) normalmente ligada a uma endonuclease (CAD) no citoplasma, ativando essa enzima, que entra no núcleo e inicia a fragmentação do DNA (BRATTON et al., 2000). Outra relação direta já identificada é a fragmentação, também pela caspase 3, da gelsolina, proteína ligada aos filamentos de actina (parte do citoesqueleto, que mantém a estrutura normal da célula). Essa fragmentação danifica os filamentos e a célula perde sua forma, o que leva a apoptose (KOYA et al., 2000).

Alguns membros, tais como a caspase 8, ocupam posição proximal na cascata proteolítica e agem como reguladores e iniciadores, enquanto outros como a caspase 3, são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular (PATEL; GORES, 1998). Contrariamente às proteases armazenadas nos lisossomos ou ativadas no citosol pelo cálcio, que têm espectro amplo de substratos inespecíficos, as caspases têm substratos bem restritos, o que lhes assegura um processo de seletividade e especificidade no processo de proteólise. Tais substratos incluem proteínas envolvidas no reparo de danos e na replicação do DNA, no ciclo celular, na sinalização de transdução e na manutenção da integridade da estrutura celular. O ataque a todos esses alvos impede o reparo quando se rompe toda a estrutura do citoesqueleto e do núcleo, levando à desestruturação da célula (KERR et al., 1972 apud TILLY, 1996; THOMPSON, 1999).

Um dos mecanismos pelos quais a apoptose pode ser deflagrada é por meio dos receptores da morte presentes na superfície celular, que são ativados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. A maioria dos receptores da morte identificados são membros da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (FNT) e caracterizado por apresentar porção extracelular rica em cisteína e uma região citoplasmática, chamada

domínio da morte (do inglês, *death domain*), essencial para transdução intracelular do sinal de morte. Entre esses receptores, um dos mais estudados e melhor caracterizado é o receptor FAZ (fator de necrose tumoral; CD95 ou APO-1). Quando o ligante-FAS se acopla ao receptor FAS, as moléculas individuais do receptor se trimerizam formando um agregado de cadeias da morte. Finalmente, o agregado se liga gerando a caspase 8, uma proteína adaptadora presente no citosol, chamada de cadeia da morte quando associada ao FAS (*FAS-associated death domain*, FADD). A ligação desse complexo à pro-caspase 8 resulta na ativação dessa enzima por clivagem proteolítica. A caspase 8 pode então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase 3 (caspase efetora; GREEN; EVAN, 2002; HENGARTNER, 2000).

Além dos receptores da morte, a apoptose pode também ser deflagrada por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial, tais como lesão do DNA (via gene *p53*), alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento. Na presença de sinais de estresse intracelular ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas (BAX, BID, etc) do citosol para a mitocôndria. Essas proteínas são membros da família de proteínas BCL-2 que exercem uma função importante na regulação da apoptose, como será discutido adiante. A translocação das proteínas pró-apoptóticas para a mitocôndria resulta na liberação para o citosol do citocromo-c, presente no espaço existente entre a membrana mitocondrial externa e interna (GROSS et al, 1999; HENGARTNER, 2000; SMAILI et al., 2003). No citosol, o citocromo-c forma um complexo com o fator ativador da apoptose 1, o apoptossoma (do inglês *apoptosis-activating factor 1*, *apaf-1*), levando à ativação da caspase 9, que ativa caspases efetoras. Portanto, a ativação das caspases pode ser desencadeada via receptores da morte ou via disfunção mitocondrial, com liberação do citocromo-c (GREEN; EVAN, 2002; HENGARTNER, 2000).

2.5.3 Apoptose em tecidos gonodais

O tempo de vida funcional das gônadas femininas, na maioria das espécies, incluindo a bovina, é inversamente proporcional à taxa de depleção dos oócitos inclusos nos folículos ovarianos. Esta perda contínua de oócitos, que ocorre durante a vida fértil das fêmeas, parece ser orientada por um programa genético de morte celular composto por mecanismos e vias altamente conservadas entre as espécies. Tilly (1996), propôs o papel fundamental da apoptose em três processos básicos relacionados ao desenvolvimento ovariano e sua

ciclicidade: (1) desgaste perinatal das oogônias e dos oócitos, (2) atresia folicular e (3) luteólise.

O início do processo de apoptose, na maioria das linhagens de células ovarianas, provavelmente depende de estímulos célula-específico (sinais hormonais: ausência ou presença) que ativa uma cascata intracelular de eventos. Muitos dos estudos recentes demonstram que os efetores nucleares e citoplasmáticos das vias apoptóticas ovarianas vêm de genes reguladores da apoptose não específicos de tecidos reprodutivos, estando presentes na maioria das células dos mamíferos (KORSMEYER, 1995; WYLLIE, 1995; TILLY, 1996).

2.5.4 Apoptose nas células foliculares

Os COCs são controlados por vários mecanismos apoptóticos (TILLY, 1996). Atualmente, vem sendo estudadas as possibilidades de células apoptóticas do *cumulus*, influenciarem a maturação nuclear, citoplasmática e o desenvolvimento durante a pré-implantação do embrião (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000a). Em trabalho recente realizado com fêmeas de camundongo idosas, foi demonstrado um incremento apoptótico em oócito maturados com a presença do *cumulus* em relação aos oócitos maturados sem as CC (desnudos), evidenciando a possibilidade de indução de apoptose pelas CC de camundongo (PERES; TILLY, 1997). Em bovinos, há poucos relatos descritos sobre a relação dos mecanismos de MCP entre CC e oócito. Um estudo recente em bovinos demonstrou a ocorrência de apoptose em CG e CT, em folículos antrais em atresia, no entanto, contrariamente ao encontrado em camundongos, não foi observado apoptose nas CC (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000b).

A presença de alterações apoptóticas encontradas nos compartimentos foliculares (CT e CG mural, CG e CC) são altamente variáveis, mesmo em folículos morfológicamente semelhantes, estes podem apresentar grande variação nos níveis de apoptose de suas células. A ocorrência de fragmentação apoptótica do DNA em CT e CG murais não está correlacionada com a morfologia do COCs ou a morfologia do próprio folículo, já o aparecimento de fragmentação das CG e das CC está relacionado com a morfologia dos COCs (ZEUNER et al., 2003).

Trabalhos recentes enfocaram o papel crucial das células da parede folicular (CT e CG murais) em sinalizar a apoptose no folículo. Porter et al. (2001), constataram que a presença da proteína FAS do sistema FAS-ligante/ FAS-receptor em CG e CT dependia do estágio folicular. As CT podem secretar sinais indutores de apoptose sem exteriorizar em sua superfície de membrana moléculas receptoras indutoras de apoptose, evitando assim sua

própria apoptose. Estudos em cortes ovarianos de ratos revelaram uma fragmentação do DNA mais pronunciada em CG comparado as CT de folículos atrésicos (KIM et al., 1998). Yang e Rajamahendran (2000a) encontraram em folículos atrésicos maior fragmentação nas CC do que nas CG murais.

Estudos em folículos de diferentes tamanhos demonstraram que em folículos pequenos, a relação BAX e BCL-2 foi similar, já os folículos médios e grandes apresentaram níveis mais elevados da proteína BAX. Estes dados sugerem que folículos de menor tamanho tendem a serem mais “saudáveis” e que boa parte dos folículos grandes podem estar submetidos ao início do processo de degeneração ou ainda que existam mecanismos diferentes de apoptose (YANG; RAJAHAMENDRAN, 2000a).

2.5.5 Apoptose nos oócitos

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 (suíno: 8-10 h; humano: 6-24 h; vaca: 20-24h), o oócito perde sua capacidade fertilizante e começa a se degenerar (TAKASE et al., 1995; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002; HAFEZ, B.; HAFEZ, E., 2000). Embora os mecanismos envolvidos neste processo de degeneração ainda não estejam muito bem elucidados, é provável que no oócito este processo ocorra por MCP (YANG; RAJAHAMENDRAN, 2002).

A fim de melhorar a produção do embrião *in vitro*, é usual a seleção morfológica dos COCs com base no número de camadas de CC e no ooplasma do oócito. Esse tipo de classificação, que relaciona a morfologia com a competência desenvolvimentária do oócito, vem sendo estudada há tempos (BRACKETT; ZUELKE, 1993; LEIBFRIED; FIRST, 1979; LONERGAN; GORDON, 1992; MADISON et al., 1992). Estes estudos demonstraram que oócitos com *cumulus* compacto são, via de regra, originados de folículos “saudáveis” ou daqueles apenas com sinais iniciais de atresia, visto que oócitos com *cumulus* incompleto e/ou expandido originam-se de folículos com sinais mais avançados de atresia. Blondin e Sirard (1995) relataram que oócitos desnudos tiveram uma taxa de desenvolvimento embrionário muito reduzida, diferindo significativamente dos oócitos de classes morfológicas que apresentavam CC. Um estudo realizado por Yang e Rajamahendran (2002) constatou que COCs de qualidades morfológicas inferiores têm a maioria de seus oócitos com anomalias morfológicas incluindo a retração e fragmentação do ooplasma e das CC, características estas típicas de células submetidas ao processo de morte celular por apoptose (Kerr et al., 1972

apud TILLY, 1996). Do mesmo modo, Takase et al. (1995) e Matwee et al. (1999) indicaram que a apoptose está relacionada ao processo de degeneração em oócitos imaturos de camundongos e bovinos.

Fujino et al. (1996) propôs que a fragmentação do DNA dos oócitos associada a apoptose pode ser uma das razões para a qualidade pobre dos oócitos e a baixa fertilidade de ratos envelhecidos.

O sistema de comunicação entre o oócito e as células somáticas que o cercam é estabelecido muito cedo, ainda quando os oócitos encontram-se circundados apenas por uma camada de células pré-granulosa, no início do desenvolvimento folicular primordial. Durante todo o desenvolvimento folicular as CG comunicam-se com o seu oócito pelas JG assegurando o crescimento e maturação apropriada ao oócito (EPPIG, 1991).

2.5.6 Embriogênese e apoptose

Apesar de uma criteriosa seleção dos COCs cerca de 60% dos oócitos bovinos submetidos à fecundação *in vitro* são perdidos durante os primeiros ciclos de clivagem, pela falta de competência em ultrapassar o bloqueio embrionário (LONERGAN et al., 2001). Em bovinos o bloqueio do desenvolvimento embrionário é observado no 4º ciclo celular (DE SOUZA et al., 1998). Este estágio é caracterizado pelo ciclo celular de maior duração no período de pré-implantação e pelo início da transcrição do genoma embrionário (TELFORD et al., 1990). Neste sentido, espera-se que a qualidade dos COCs tenha efeito sobre o potencial de escapar do bloqueio embrionário.

Nas espécies mamíferas, as perdas embrionárias podem ocorrer em todas as fases da gestação (DISKIN; SREENAN, 1980; DUNNE et al., 2000). A incidência de perda embrionária em novilhas inseminadas artificialmente pode chegar a 22% no 14º dia de gestação e sem perdas adicionais até o 30º. No intervalo correspondente ao 30º dia até o final da gestação, as perdas embrionárias/fetais alcançam apenas 4,2% indicando que a maioria das perdas ocorre durante as duas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário bovino (DUNNE et al., 2000).

Há fortes evidências que células embrionárias de mamíferos na fase de pré-implantação submetem-se ao processo de apoptose (BETTS; KING, 2001; HARDY, 1997). As características apoptóticas, incluindo fragmentação do DNA nuclear, são raramente observadas antes da fase de compactação celular, já na fase de blastocisto, a presença de apoptose é freqüente em mamíferos como humanos (HARDY et al., 2001), camundongos (BRISON; SCHULTZ, 1997) e vacas (MATWEE et al., 2000). Durante o desenvolvimento

do embrião, muitas das células embrionárias que se encontram em processo de apoptose já cumpriram a sua função e precisam ser excluídas ou substituídas por células da mesma linhagem ou diferente (SANDERS et al., 1997). Embriões de camundongos coletados no estágio de blastocisto desenvolveram-se normalmente mesmo apresentando boa parte de suas células em apoptose, reforçando a idéia de que o processo de MCP é importante para manutenção do desenvolvimento desses embriões (HARDY, 1997). Os mecanismos utilizados pelo embrião para eliminar determinadas células ou linhagem de células não estão bem elucidados.

O embrião, durante o início do período de pré-implantação, depende quase que exclusivamente do RNAm materno e das proteínas que o oócito conseguiu estocar antes do período de ovulação. Com isso, é possível que o embrião não seja capaz de sobreviver por não possuir os produtos de origem materna necessários, ou por não começar a expressar seus genes no momento certo (JURISICOVA et al., 1996). Uma das alterações mais frequentes encontradas durante o desenvolvimento inicial do embrião está relacionada com a fragmentação nuclear atribuída ao processo de MCP, que ocorre principalmente nas células que formam o botão embrionário (massa celular interna; MCI). Acredita-se que o objetivo deste mecanismo seja eliminar algumas dessas células que impedem o potencial de desenvolvimento do trofotoderma e que possam ser letais para o embrião (HARDY, 1997). Contudo, um número considerado mínimo de células saudáveis da MCI é necessário para que o desenvolvimento prossiga (HANDYSIDE; HUNTER 1986; apud HARDY, 1997).

Em embriões de camundongo e humanos, cerca de 15 a 50% das células morrem durante o período de pré-implantação por mecanismos ainda pouco elucidados. A sobrevivência dos embriões no período de pré-implantação depende da avaliação de parâmetros como a taxa de desenvolvimento e grau de fragmentação nuclear. Um rápido crescimento e um baixo grau de fragmentação nuclear proporciona maiores chances de sobrevivência embrionária (WARNER et al., 1998).

As condições proporcionadas aos embriões na produção *in vitro* são diferentes das condições encontradas pelos embriões *in vivo*. Nas condições *in vitro* há uma grande concentração de oxigênio reativo (OR). Yang et al. (1998), com o objetivo de elucidar as ações do OR, determinaram a relação existente entre a concentração de H_2O_2 no embrião e as modificações morfológicas em suas células, concluindo que existe uma relação direta entre o aumento da concentração de H_2O_2 e o número de células apoptóticas. As variáveis *in vitro*, nas quais o oócito e principalmente os embriões são submetidos, fazem com que a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* seja variável.

A maioria dos embriões possui blastômeros de diferentes tamanhos e muitas células fragmentadas. Em embriões fragmentados, a alta incidência de cromatina condensada com a degradação do DNA celular e o aparecimento de um grande número de corpos apoptóticos leva à inviabilidade no desenvolvimento do embrião quando em processos iniciais do desenvolvimento, inclusive antes da formação da blastocele (JURISICOVA et al., 1996).

2.6 Hipótese

A hipótese deste trabalho foi que a morte celular programada nas células do *cumulus* tem influência negativa sobre a maturação e o desenvolvimento embrionário bovino durante a pré-implantação.

2.7 Objetivo

Verificar a interação *cumulus* e oócito no processo de morte celular programada em complexos de *cumulus oophoros* de diferentes classificações morfológicas em bovinos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Local do Experimento*

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga.

3.1.1 Coleta dos oócitos

Os COCs foram aspirados de ovários de vacas zebus ou azebuadas, oriundos de abatedouro, com agulhas de 18G acoplada a uma seringa estéril de 10 mL (Figura 2). O líquido folicular contendo os COCs oriundos de folículos de 2-10 mm permaneceu em repouso durante 15 minutos para decantação dos COCs (Figura 3). A punção de folículos maiores que 8 mm foi realizada com intuito de formar o grupo dos COCs expandidos. Após a decantação, o sedimento foi recuperado e depositado em placas de Petri (60 mm de diâmetro) para seleção e classificação dos COCs sob estereomicroscopia.

b

Figura 2 - Aspiração de folículo ovariano bovino oriundo de abatedouro com seringa de 10 mL e agulha 18G.

Figura 3 - Líquido folicular em repouso de 15 minutos após punção dos folículos ovarianos.

3.1.2 Classificação morfológica dos COCs

Foram utilizados nos experimentos três diferentes tipos morfológicos de COCs, formando os três grupos experimentais conforme a Figura 4: COC-A: com *cumulus* completo e com várias camadas compactas de células; COC-B: com *cumulus* parcialmente presente e com 1 a 2 camadas de células; e COC-C: com o *cumulus* presente mas expandido. Em todos os grupos foram utilizados apenas oócitos com ooplasma sem a presença de degeneração citoplasmática visível na avaliação morfológica.

Figura 4 - COCs bovinos imaturos divididos em três categorias morfológicas que formam os grupos experimentais: A) COC-A com *cumulus* completo e compacto; B) COC-B com *cumulus* parcial e compacto e C) COC-C com *cumulus* expandido.

3.1.3 Maturação *in vitro*

Os COCs classificados foram lavados duas vezes em TCM 199 com sais de Hanks, glutamina e tampão Hepes suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), piruvato (22 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL) e uma vez no meio de maturação. Os oócitos foram maturados em TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃ suplementado com 10% de SFB, piruvato (22µg/ml), gentamicina (50µg/ml), 0,5 µg de FSH/ml, 50µg de LH/ml e 1µg de estradiol/ml em gotas de 90µl, cobertas com óleo mineral e levados à incubadora a 38,5°C, 5% CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 24 horas (Figura 5).

Figura 5 - Fotomicroscopia em esteriomicroscópio dos grupos experimentais antes e após a maturação de 24h. A e B) COC-A; C e D) COC-B; E e F) COC-C.

3.1.4 Ativação Partenogenética

Após a maturação, os oócitos foram desnudados mecanicamente por pipetagem e quimicamente com solução de hialuronidase à 1mg/mL por 5 minutos. A ativação partenogenética dos oócitos teve início com a exposição a 5 μ M de ionomicina em meio TCM

199 com Hepes por cinco minutos em temperatura ambiente, após uma lavagem em meio TCM 199 com Hepes acrescido de 30 mg/mL de BSA. Em seguida, os oócitos foram incubados em meio de TALP-FIV (PARRISH et al., 1986) acrescido de 6-DMAP à 2 mM, durante três horas em estufa a 38,5°C e atmosfera a 5% de CO₂.

3.1.5 Cultivo dos embriões *in vitro*

Os oócitos ativados foram cultivados *in vitro* em meio SOF (TAKAHASHI; FIRST, 1992) suplementado com 0,8% de BSA livre de ácidos graxos (FAF), sem mono-camada celular. O cultivo foi realizado 3 horas pós-ativação (hpa), em incubadora modular em atmosfera gasosa com baixa concentração de O₂ (5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂).

3.1.6 Experimentos realizados

3.1.6.1 Experimento 1: Avaliação da maturação nuclear

A progressão da maturação nuclear foi avaliada em 0h e em 24h de cultivo mediante análise da morfologia do núcleo dos oócitos. Os oócitos foram fixados em etanol e ácido acético (3:1) por 12 horas, posteriormente corados com lacmóide a 1%, colocados entre lâmina e lamínula e observados sob microscopia óptica de imersão (1000x) imediatamente após a coloração, sendo classificados como:

Vesícula Germinativa inicial (VGi) – núcleo definido, com ou sem nucléolo, sem condensação da cromatina, vesícula espessa;

Vesícula Germinativa final (VGf) - final da prófase I, cromatina inicia sua condensação, vesícula delgada;

Metáfase I (MI) - cromossomos já condensados formando a placa equatorial ou início da formação da mesma;

Metáfase II (MII) - cromossomos formando a placa equatorial com 1º corpúsculo polar já exteriorizado.

3.1.6.2 Experimento 2: Avaliação do dano do DNA das CC (Ensaio Cometa)

As células do *cumulus* obtidas dos diferentes grupos morfológicos de COCs (COC- A, B e C) foram submetidos ao ensaio cometa para avaliação de danos no DNA em 0h e 24h de maturação. Deste modo, o pellet de célula de cada um dos grupos de COCs foi ressuspensionado com 200µl de agarose de baixa fusão (“low melting”) à 1%. Logo após, depositou-se as células suspensas sobre uma lâmina pré-banhada com uma fina camada de agarose de fusão normal à 1%. Após polimerização à 4°C, as CC foram lisadas (10 mM Tris-pH 10, 2,5 mM

NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 1% Triton 100X e 10 µg/mL de proteinase K) à 50°C durante 2 horas. Em seguida, a lâmina contendo as células foi submetida a 20 minutos de equilíbrio na solução de eletroforese (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH), então seguiu-se a eletroforese por mais 20 minutos a 25 V. Para visualizar a fragmentação do DNA que migra fora do limite da membrana citoplasmática formando uma “cauda” do DNA, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (10 µg/mL) e observada em microscopia de fluorescência. Neste parâmetro, as CC foram classificadas em 3 graus de acordo com o tamanho da cauda do DNA: grau 1, fragmentação inexistente ou minimamente visível; grau 2, fragmentação média; grau 3, fragmentação avançada (Figura 6). O tamanho da “cauda” é diretamente proporcional a extensão do dano do DNA (TAKAHASHI et al., 2000).

Figura 6 - Classificação dos graus de fragmentação do DNA das células do *cumulus* pela técnica de Ensaio Cometa: A) grau 1 B) grau 2 e C) grau 3. O tamanho da cauda é proporcional ao dano encontrado no DNA

3.1.6.3 Experimento 3: Análise de fragmentação do DNA dos COCs (TUNEL)

A técnica de TUNEL (do inglês, *Terminal deoxynucleotil transferase Uracil Nick End Labeling*) identifica *in situ*, a fragmentação internucleossômica do DNA. Esta avaliação foi realizada com o Kit “*In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein*” (Roche®, Germany) conforme descrito abaixo:

Os COCs imaturos e maduros dos três grupos experimentais foram lavados em PBS acrescido de 1 mg/mL de polivinil-pirolidona (PVP) e fixados em solução de paraformaldeído 3,7% durante 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente foram novamente lavados em

PBS acrescido de PVP e permeabilizados (0,5% de triton X-100 e 0,1% citrato de sódio em PBS) durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após o procedimento, os COCs foram lavados em PBS acrescido de 1 mg/mL de PVP. O controle positivo da técnica foi feito com COCs tratados com DNase I (FPLC*pure*TM, Amersham Biosciences # 27-0514 # 10.000 units/ml) a 37°C por 1h (5ul do tampão Tris-Hcl 400mM, 6ul MgCl₂ 50mM do PCR, 0,3ul Dnase, 38,7ul de H₂O). Após as etapas de fixação e permeabilização, as amostras foram incubadas na solução de TUNEL do Kit (90% solução marcadora e 10% solução enzimática) durante 1 hora à 37°C sob câmara úmida. No controle negativo da reação, os COCs foram incubados apenas com a solução marcadora (livre de enzima). Posteriormente, foram lavados em PBS acrescido de PVP. Para a visualização do DNA em microscopia de epifluorescência, as lâminas foram montadas com Hoechst 33342 diluído em glicerol (1 µg/mL). Os núcleos fluorescentes em azul (corante Hoechst 33342) indicou a presença e a localização de todas as células e os núcleos fluorescentes em verde (FITC) indicaram apenas as células com fragmentação no DNA.

3.1.6.4 Experimento 4: Avaliação da competência do desenvolvimento embrionário

Decorridas 48 horas pós-ativação partenogenética foi avaliada a taxa de clivagem e a cinética do desenvolvimento embrionário com o intuito de observar os embriões que alcançaram o 4º ciclo celular mais rápido (grupo R8). O grupo de desenvolvimento embrionário mais lento (grupo L8) foi avaliado 90 hpa. A avaliação da taxa de blastocistos foi realizada nos dias 7 e 9 de cultivo.

3.1.6.5 Experimento 5: Avaliação qualitativa dos embriões

Contagem de núcleos da Massa Celular Interna e do Trofotoderma

A coloração diferencial é uma técnica utilizada para avaliar quali e quantitativamente a competência do desenvolvimento embrionário através da contagem de núcleos e da determinação da massa celular interna (MCI) e Trofotoderma (TE).

A avaliação da qualidade dos embriões, determinada pelo número de células e a relação diferencial entre a MCI e TE foi baseada na técnica por fluorocromo, descrita por Iwasaki et al. (1990) e Avelino et al. (2000). Esta técnica consistiu na incubação dos embriões com soro de coelho anti-bovino na proporção de 1:10. Após, os embriões foram lavados em meio TCM-199 e incubados novamente com complemento de cobaia, também na proporção de 1:10 em meio TCM-199 Hepes acrescido de 1µl/ml de Hoechst 33342 e 1 µl/ml de iodeto de propídio. Em seguida, foram lavados em PBS com 0,3% de BSA e fixados em

lâminas com glicerol. O tratamento dos embriões com soro de coelho e o seu complemento leva a morte celular apenas das células do TE, proporcionando a diferenciação destas das células da MCI quando coradas diferencialmente. Os embriões foram avaliados quanto ao número de células da MCI e TE em microscópio de luz epifluorescente, com filtro de excitação de 340-380nm e barreira 430nm. Nestes parâmetros, os núcleos com fluorescência azul, corados com Hoechst 33342 (corante vital), foram considerados células da MCI e os núcleos com fluorescência vermelha, corados pelo iodeto de propídio (corante não vital), foram considerados células do TE.

3.1.6.6 Experimento 6: Imunofluorescência para as proteínas BAX e BCL-2

Os COCs e os oócitos isolados imaturos e maduros foram separados de suas células do *cumulus*, lavados em PBS e fixados em paraformaldeído 3,7% por 1 hora. Após serem lavados em PBS acrescido de 0,1 % de PVP, as amostras foram permeabilizadas por 1 hora em 0.5% de triton X-100 com 0,1% de Citrato de Sódio em PBS/PVP. Para inibir as possíveis ligações inespecíficas do 1º anticorpo, as amostras foram lavadas em uma solução de bloqueio composta por PBS/PVA acrescido de 2% BSA, 0,2% leite em pó desnatado, 2% de soro de cabra e 0,8% de triton X-100 em PBS. O primeiro anticorpo, o anti-BAX e o anti-BCL-2 feito em camundongo (Santa Cruz, CA, USA) foi utilizado na diluição de 1:200 em PBS em câmara úmida a 4°C por 12 horas. Após este período de incubação, as amostras foram lavadas em PBS e incubados por 1 hora com o segundo anticorpo, o anti-camundongo marcado com FITC (1:50). Por fim, as amostras foram lavadas em PBS/PVP e colocadas em uma lâmina histológica contendo uma gota de glicerol. Em seguida, foi colocada uma lamínula sobre a gota para a avaliação em microscopia de epifluorescência.

3.1.6.7 Experimento 7: Extração do RNA, produção do cDNA e PCR Competitivo para os transcritos de BAX e BCL-2

Nos protocolos de extração do RNA das CC foi utilizado o kit RNeasy® (Qiagen, Germany). O protocolo de extração inicia com a deposição de um *pool* de células em um tampão de lise, que é em seguida homogeneizado com etanol 70% e centrifugado duas vezes em uma coluna de afinidade (RNA) a 8000 G durante 15 segundos. Depois foi adicionado a coluna um tampão de recuperação e em seguida centrifugada a 8000 G por 1 minuto e a eluição em 30 µL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

O RNA extraído é submetido a reação da transcriptase reversa (RT-PCR) para a obtenção de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar). A RT-PCR foi realizada pela

enzima transcriptase reversa recombinante (Superscript IITM, Invitrogen, USA) e com um oligonucleotídeo poli "T" (18 nucleotídios).

A PCR multiplex é uma reação capaz de amplificar os transcritos de dois genes ou mais (*BAX* e *BCL-2*) competitivamente na mesma reação. Esta metodologia permite estimar a expressão de dois genes na mesma reação em que são utilizados 2 pares de primers, os quais competem pela enzima polimerase. Desta maneira, é feita a comparação dos transcritos de *BCL-2* com os transcritos de *BAX* total (somatório das isoformas do *BAX*), bem como a comparação do *BCL-2* com a isoforma alfa (α) e psi (Ψ) do gene *BAX*. Para observar a qualidade do cDNA foi realizada a amplificação de um gene de expressão constitutiva, o gliceraldeído-3-phosphato desidrogenase (GAPDH).

Os primers para o gene *BAX* (3'ATGGACGGGTCCGGGGAGCA 5' F e 3' CTCACCGCCTCGCTCACCAT 5' R) de acordo com sequência do mRNA do regulador *BAX* do *Bos taurus*; (Reyes & Cockerell, submissão direta, número de acesso U92569 – 100% de similaridade com genes *Bos indicus*) e para o gene *BCL-2*, (3' CGCAGCGGGGCTACGAGTGG 5' F e 3' GGGTGCCTATCTGGGCCATAAG 5' R), de acordo com sequência parcial do cDNA do gene *BCL-2* do *Bos taurus*; (Reyes & Cockerell, submissão direta, número de acesso U92434 - 100% de similaridade com genes *Bos indicus*) foi utilizados para realização da PCR competitiva, como descrito acima.

3.2 *Análise Estatística*

Para a análise estatística do potencial de desenvolvimento e qualidade embrionário foi utilizado o programa GENMOD do Software SAS Institute versão 8.2 (Carry, NC, EUA, 2001). A análise da frequência de fragmentação no DNA (TUNEL e Ensaio Cometa), bem como a quantidade de transcritos foram realizadas pelo teste Anova, conforme procedimento do programa JMP versão 2.04 SAS Institute (Carry, NC, EUA). A comparação das médias foi realizada aplicando teste de Tukey. Os demais procedimentos foram avaliados qualitativamente.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Avaliação da maturação nuclear

Os resultados da Tabela 1 mostram que a maioria dos oócitos imaturos do grupo COC-A estavam em estágio de VGi ao contrário dos demais grupos (A: 57,7; B: 12,3 e C: 0,0; $P < 0,05$). Nos oócitos imaturos dos grupos COC-B e C, prevaleceu o estágio de maturação nuclear de VGf (B: 87,7; C: 77,1 e A: 42,3, $p < 0,05$). Apenas o grupo COC-C apresentou oócitos em MI (22,87 $p < 0,05$).

Tabela 1 - Estádio de maturação nuclear de oócitos não maturados (0h) nas 3 qualidades morfológicas estudadas.

Qualidade Morfológica	Nº de COCs	VGi % $\pm$ Erro Padrão	VGf % $\pm$ Erro Padrão	MI % $\pm$ Erro Padrão	MII % $\pm$ Erro Padrão
COC-A	34	57.7 $\pm$ 6.7 ^a	42.3 $\pm$ 6.7 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^b	0.0 $\pm$ 0.0
COC-B	33	12.3 $\pm$ 3.4 ^b	87.7 $\pm$ 3.4 ^b	0.0 $\pm$ 0.0 ^b	0.0 $\pm$ 0.0
COC-C	36	0.0 $\pm$ 0.0 ^b	77.1 $\pm$ 8.5 ^b	22.9 $\pm$ 8.5 ^a	0.0 $\pm$ 0.0

^{a-b-c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$)

No experimento em que se utilizou oócitos maduros por 24h, os grupos COC-A e C tiveram uma maior taxa de maturação em relação ao grupo COC-B. No entanto as diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas (82,2; 84,7; 73,1 respectivamente; $p > 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2 - Estádio de maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro* por 24h nas 3 qualidades morfológicas estudadas.

Qualidade Morfológica	Nº de COCs	VGi % ± Erro Padrão	VGf % ± Erro Padrão	MI % ± Erro Padrão	MII % ± Erro Padrão
COC-A	57	5.6 ± 5.9	0.0 ± 0.0 ^a	12.3 ± 2.5	82.2 ± 4.9
COC-B	46	6.6 ± 1.0	7.2 ± 7.7 ^b	13.1 ± 6.0	73.1 ± 10.3
COC-C	46	3.9 ± 3.4	2.8 ± 2.4 ^c	8.6 ± 2.4	84.7 ± 2.4

^{a-b-c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$).

4.2 Experimento 2: Avaliação do dano do DNA das CC (Ensaio Cometa)

No experimento em que se utilizou CC de COCs imaturos (0h), não foi observado grau 3 de fragmentação do DNA das CC do grupo COC-A, ao contrário dos grupos COC-B e COC-C (0,0; 6,0; 7,8; $p < 0,05$; Tabela 3). O dano encontrado no DNA do grupo COC-A foi mínimo ou inexistente. Após a maturação, observou-se a intensificação da fragmentação do DNA nos grupos celulares COC-B e COC-C sendo que o COC-B, além de possuir um número bem menor de camadas do *cumulus*, apresentou um grau de fragmentação significativamente maior que o COC-C (A: 4,5; B: 39,3; C: 13,8; $p < 0,05$; Figura 7).

Figura 7 - Técnica de ensaio cometa nas CC de COCs bovinos em 0h (A, C, E) e 24h (B, D, F) de maturação nas 3 qualidades morfológicas: COC-A (A e B); COC-B (C e D); COC-C (E e F). Nas setas os graus de fragmentação: a) grau 1; b) grau 3 e c) grau 2.

Tabela 3 - Grau de fragmentação do DNA nas CC das 3 qualidades morfológicas antes e após o período de 24h de maturação

Qualidade Morfológica	Tempo de Maturação	Nº de CC	Grau 1 % ± Erro Padrão	Grau 2 % ± Erro Padrão	Grau 3 % ± Erro Padrão
A	0h	125	98.7 ± 1.7 ^a	1.3 ± 1.7 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
B	0h	117	89.7 ± 2.8 ^b	4.3 ± 1.7 ^a	6.0 ± 4.3 ^b
C	0h	117	92.2 ± 2.2 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	7.8 ± 2.2 ^b
A	24h	135	92.4 ± 5.5 ^a	3.1 ± 3.6 ^a	4.5 ± 3.7 ^a
B	24h	125	50.5 ± 11.0 ^{b*}	10.2 ± 11.8 ^b	39.3 ± 6.35 ^{b*}
C	24h	125	81.4 ± 9.4 ^{a*}	4.8 ± 9.7 ^a	13.8 ± 6.9 ^{a*}

^{a-b-c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$)

* grupos onde houve diferença estatística no grau de fragmentação, após o período de 24 horas de maturação *in vitro*.

4.3 Experimento 3: Análise de fragmentação do DNA dos COCs (TUNEL)

A avaliação da fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL em oócitos previamente desnudos, foi realizada no experimento 3 em 0h e em 24h nas 3 qualidades de oócitos. O objetivo dessa avaliação foi complementar os dados da técnica de Ensaio Cometa que é uma técnica quantitativa para o dano no DNA não sendo específica para o tipo de fragmentação (necrose ou apoptose). Já a técnica de TUNEL detecta apenas as fragmentações internucleossômicas do DNA de fita dupla que é um bom indicativo de morte celular por apoptose.

Na avaliação do percentual de CC TUNEL positiva por COCs em 0h de maturação (Figura 8), o dano encontrado por COC-A foi mínimo ou inexistente com apenas um dos COCs analisados apresentando fragmentação em 12 células de um total de 175. Com isso, a média de células fragmentadas por COC nesse grupo foi de apenas 0,67%. Os grupos COC-B e COC-C, ao contrário do COC-A, apresentam 20,28 e 14,22% respectivamente ($p < 0,05$; Tabela 4). No experimento 3 (Figura 9), observamos a fragmentação nas CC de COCs maturados por 24h. No grupo COC-A foi possível verificar um pequeno aumento no percentual de CC fragmentadas por COCs (2,9% das células), ao contrário dos demais grupos que alcançaram percentuais elevados de fragmentação por COCs (B: 66,8; C: 63,8; $p < 0,05$; Tabela 4).

Figura 8 - Detecção de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL em COCs de 3 qualidades morfológicas em 0h de maturação. Na primeira coluna temos a coloração com FITC (nucleotídeo marcado) e na segunda coluna a coloração pelo Hoechst; a) controle negativo; b) COC-A; c) COC-B; d) COC-C. Nas setas, as células que fluorescem verde pela incorporação do nucleotídeo marcado com o corante FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma do oócito é *background*.

Figura 9 - Detecção de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL em COCs de 3 qualidades morfológicas em 24h de maturação *in vitro*. Na primeira coluna temos a coloração com FITC (nucleotídeo marcado) e na segunda coluna a coloração pelo Hoechst; a) controle negativo; b) COC-A; c) COC-B; d) COC-C. Nas setas, as células que fluorescem verde pela incorporação do nucleotídeo marcado com o corante FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma do oócito é *background*

Tabela 4 - Grau de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL nas CC de 3 qualidades morfológicas antes e após o período de 24h de maturação *in vitro*.

Qualidade Morfológica	Tempo de Maturação	Nº de COCs	Nº de CC	% CC TUNEL + % $\pm$ Erro Padrão	% CC TUNEL +/- COC % $\pm$ Erro Padrão
COC-A	0h	18	2510	0,38 $\pm$ 0,03 ^a	0,67 $\pm$ 0,82 ^a
COC-B	0h	18	1940	21,46 $\pm$ 0,45 ^b	20,28 $\pm$ 1,08 ^b
COC-C	0h	18	2224	12,44 $\pm$ 0,18 ^c	14,22 $\pm$ 0,51 ^c
COC-A	24h	12	1390	2,9 $\pm$ 0,12 ^a	3,3 $\pm$ 0,78 ^a
COC-B	24h	12	1169	68, $\pm$ 0,84 ^b	66,8 $\pm$ 1,13 ^b
CCO-C	24h	12	1579	49,0 $\pm$ 0,55 ^c	6 3,8 $\pm$ 1,16 ^b

^{a, b, c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$).

4.4 Experimento 4: Avaliação da competência do desenvolvimento embrionário

Os resultados da Tabela 5 indicam que o grupo COC-A atinge o 4º ciclo celular mais rapidamente em comparação aos grupos COC-B e COC-C, além disso, os oócitos oriundos de COCs de qualidade A possuem maior competência para atingir o estágio embrionário de oito células (COC-A - 41,7; COC-B – 27,5 e COC-C – 33,3; $p < 0,05$). Observou-se que os oócitos oriundos de COCs de qualidade B e C aparentemente clivam mais lentamente até o estágio de oito células (Figura 10) com aproximadamente 4,7% e 3,2% de embriões lentos (90h), já o grupo COC-A tem apenas 1,9% de embriões 8 células lentos (90h).

Tabela 5 - Competência oocitária de oócitos partenogenéticos (oriundo de COCs A, B e C) em alcançar o estágio de oito células rápido (48h hpa) ou lento (90h hpa)

Qualidade Morfológica dos COCs	Nº de Oócitos (n)	Embriões no 4º ciclo celular % ± Erro Padrão		8 células % ± Erro Padrão
		Rápido (8cel 48h)	Lento (8 cel 90h)	
A	205	39,8 ± 0,74 ^a	1,9 ± 0,13 ^a	41,7 ± 0,34 ^a
B	205	25,1 ± 0,54 ^b	4,7 ± 0,12 ^a	27,5 ± 0,13 ^b
C	205	30,9 ± 0,45 ^b	3,2 ± 0,19 ^a	33,3 ± 0,22 ^b

^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Figura 10 - Percentual de embriões oito células em 48hpa e em 90hpa com as diferentes qualidades morfológica dos COCs.

^{a-b} Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

Na Tabela 06 pode-se observar alguns parâmetros importantes para avaliação do desenvolvimento dos embriões, como a taxa de clivagem, taxa de blastocisto no 7º dia pós-ativação e taxa de eclosão no 9º dia pós-ativação. A utilização de COC-A para produção de embriões foi positiva para taxa de clivagem, bem como nas taxas de blastocistos e eclosão no 9º dia de cultivo. Os COCs dos grupos B e C tiveram taxas inferiores em todos os parâmetros avaliados em comparação aos COC-A, exceto no percentual de blastocistos sobre os embriões que ultrapassaram o estágio de oito células (A– 41,1; B– 30,5; C– 32,6; $p > 0,05$) .

Tabela 6 - Taxa de clivagem, desenvolvimento até blastocisto no dia 7 sobre a taxa de clivagem e sobre o total de oócitos e eclosão no dia 9 após a ativação dos grupos morfológicos COC-A, COC-B e COC-C.

Grupos	Nº de Oócitos (n)	Clivagem	Blastocisto (oócitos)	Blastocisto (8 células)	Eclosão
		% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão
COC-A	205	70,7 ± 0,74 ^a	20,6 ± 0,42 ^a	41,1 ± 0,76 ^a	82,3 ± 0,86 ^a
COC-B	205	50,0 ± 0,71 ^b	12,9 ± 0,38 ^b	30,5 ± 0,89 ^a	70,0 ± 1,09 ^b
COC-C	205	57,3 ± 0,66 ^b	15,3 ± 0,14 ^b	32,6 ± 0,79 ^a	74,9 ± 1,40 ^b

^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna mostram diferenças significativas ($P < 0,05$)

4.5 Experimento 5: Avaliação qualitativa dos embriões que chegaram a blastocisto

Os embriões que atingiram o estágio de desenvolvimento a blastocisto 9 dias após a ativação foram avaliados quanto ao número de núcleos totais e quanto ao número de células que formam a MCI e o TE (Figura 11). A Tabela 7 mostra que embriões oriundo de diferentes morfologias de COCs não apresentaram variação na relação MCI/TE (A- 2,05; B- 2,17; C- 2,08; $p > 0,05$) e na quantidade de núcleos totais (A- 118,07; B- 108,45; C- 105,08; $p > 0,05$).

Figura 11 - Fotomicrografia em epifluorescência da técnica de coloração diferencial por fluorocromo em embriões no estágio de blastocisto com 9 dias após a ativação partenogenética de oócitos oriundos de diferentes morfologias de COCs: a) COC-A; b) COC-B; c) COC-C. Os núcleos com fluorescência azul, corados com Hoechst 33342, foram considerados células da MCI e os núcleos com fluorescência vermelha, corados pelo iodeto de propídio, foram considerados células do TE.

Tabela 7 - Avaliação do número de núcleos da Massa Celular Interna (MCI) e trofoblasto (TE) em embriões no estágio de blastocisto com 9 dias após a ativação partenogenética de oócitos oriundos de COCs de 3 qualidades morfológicas diferentes: COC-A, COC-B, COC-C.

Grupos	N	Nº de núcleos totais da MCI	Nº de núcleos totais do TE	MCI/TE total	Total de núcleos
		± Erro Padrão	± Erro Padrão	± Erro Padrão	± Erro Padrão
COC-A	15	79,33±0,36	38,73±0,46	2,05±0,20	118,07±0,48
COC-B	11	74,27±0,82	34,18±0,38	2,17±0,16	108,45±0,80
COC-C	12	70,92±0,47	34,17±0,45	2,08±0,19	105,08±0,52

4.6 Experimento 6: Imunofluorescência para detecção das proteínas BAX e BCL-2 em COCs

O experimento foi executado duas vezes para cada proteína, e aproximadamente 20 COCs foram avaliados em cada experimento. A análise imunohistoquímica detectou a presença das proteínas BAX e BCL-2 em COCs de todas as qualidades morfológicas. A expressão da proteína BAX foi superior em COCs de classe B (Figura 12). Ao contrário, a presença da proteína BCL-2 foi similar nas diferentes qualidades morfológicas de COCs (Figura 13).

Figura 12 - Fotomicrografia em epifluorescência para detecção das proteínas BAX pela técnica de imunohistoquímica. Foram utilizadas amostras de COCs maturados por 24h, de qualidades morfológicas distintas: COC-A, COC-B e COC-C. a) coloração pelo Hoechst; b) coloração com FITC. As células fluorescem em verde pela a ligação do anticorpo marcado com FITC ao primeiro anticorpo BAX.

Figura 13 - Fotomicrografia em epifluorescência para detecção das proteínas BCL-2 pela técnica de imunohistoquímica. Foram utilizadas amostras de COCs maturados por 24h, de qualidades morfológicas distintas: COC-A, COC-B e COC-C. a) coloração pelo Hoechst; b) coloração com FITC. As células fluorescem em verde pela a ligação do anticorpo marcado com FITC ao primeiro anticorpo BCL-2.

4.7 Experimento 7: PCR Competitivo para os transcritos de *BAX* e *BCL-2*

Nesse experimento foi avaliado os transcritos dos genes *BCL-2* e *BAX* nas CC maduras oriundas de diferentes morfologias de COCs (A, B e C). Os resultados da PCR competitiva da Figura 14 indicam não haver variação da quantidade de transcritos de *BCL-2* e *BAX* em nenhum dos grupos morfológicos. Na relação entre o gene *BCL-2* com o gene *BAX* e suas isoformas também não houve diferença significativa ($p > 0,05$; Tabela 8).

Tabela 8 - Proporção da expressão dos transcritos de *BCL-2* em relação aos transcritos de *BAX* total, *BAX* α e *BAX* Ψ em CC oriundas de diferentes morfologias de COCs maturados por 24hlogias de COCs maturados por 24h.

Grupo	<i>BCL-2</i> / <i>BAX</i> total	<i>BCL-2</i> / <i>BAX</i> α	<i>BCL-2</i> / <i>BAX</i> Ψ
	$\pm$ Erro Padrão	$\pm$ Erro Padrão	$\pm$ Erro Padrão
CC-A	0,31 $\pm$ 0,08	12,00 $\pm$ 9,83	0,36 $\pm$ 0,06
CC-B	0,24 $\pm$ 0,12	5,71 $\pm$ 2,46	0,30 $\pm$ 0,15
CC-C	0,29 $\pm$ 0,02	4,95 $\pm$ 3,51	0,38 $\pm$ 0,06

Figura 14 - Padrão de expressão do mRNA dos genes *BCL-2* e *BAX* e suas possíveis isoformas. a) CC oriundas de COCs com *cumulus* completo; b) CC oriundas de COCs com *cumulus* parcial; e c) CC oriundas de COCs com *cumulus* expandido. Setas indicam os transcritos dos genes *BAX* e *BCL-2*: I) isoforma α do gene *BAX*; II) isoforma Ψ do gene *BAX*; e III) gene *BCL-2*. As isoformas dos transcritos do gene *BAX* foram confirmadas por sequenciamento: α – 579pb, Ψ - 290pb. A amplificação dos transcritos pela PCR Duplex foi verificada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi possível observar uma melhor manutenção do bloqueio meiotico nos COCs de melhor qualidade morfológica (COC-A), logo após sua retirada do folículo ovariano. Os COCs com número reduzido de CC e com *cumulus* expandido, logo após a punção folicular, apresentavam sua cromatina em fase de condensação sugestivo de núcleo no final da prófase I (VGf). Com esses dados é possível afirmar que a qualidade morfológica dos COCs está relacionada com o bloqueio meiotico intra-folicular. O bloqueio meiotico oocitário é mantido pelas concentrações elevadas de AMPc no líquido folicular, que são transferidos ao oócito através dos processos intercelulares do *cumulus*-oócito. Essa associação *cumulus*-oócito ocorre principalmente pelas JGs que permitem a livre movimentação de algumas moléculas entre as CCs e oócito (LOEWENSTEIN, 1987). No período em que o folículo está sobre estímulo do FSH, a formação estrutural das JG encontra-se completamente aberta, mas após o pico de LH, gradativamente, a comunicação via JG vai sendo interrompida (HØST et al., 2000; THOMAS, 2004). Assim, a diminuição dessas junções intercelulares provavelmente afeta a estabilidade do bloqueio meiotico (AKTAS et al., 1995). Como já demonstrado anteriormente, a morfologia dos COCs está correlacionada com o bloqueio meiotico extra-folicular. Entretanto, no presente trabalho não foi encontrado a mesma correlação para a capacidade de maturação nuclear após 24h de MIV, pois todos os grupos morfológicos apresentaram taxas de maturação nuclear similares. Emanuelli et al. (2000) e Gonçalves et al. (2001) mostraram que fluido folicular não centrifugado puncionado de folículos menores de 3 mm de diâmetro é capaz de reter a meiose de oócitos bovinos durante a MIV. No entanto, quando foi utilizado na maturação o mesmo líquido folicular, porém livre de células, a taxa de maturação nuclear foi similar ao grupo controle (EMANUELLI dados não publicados). Tendo em vista que o líquido folicular utilizado no trabalho anterior possuía uma grande concentração de CG e que na ausência dessas células não houve bloqueio meiotico, esse estudo demonstra a importante comunicação que existe entre o oócito e suas células foliculares, embora neste caso independente das JGs.

Os COCs podem sofrer vários mecanismos apoptóticos durante sua fase de desenvolvimento, crescimento e maturação (Tilly, 1996). No presente trabalho, foram

realizadas as técnicas de Ensaio Cometa para avaliação quantitativa da fragmentação do DNA (pool de CC) e a técnica de TUNEL para avaliação qualitativa da fragmentação internucleossomal do DNA fita dupla (COCs) que é uma técnica indicativa de morte celular por apoptose. Nos dois experimentos foram encontrados resultados similares entre os grupos de COCs. A avaliação da fragmentação à 0h de maturação não indicou fragmentação nuclear visível no grupo COC-A, ao contrário, os grupos B e C que já apresentavam fragmentação do DNA. Apesar da proporção de núcleos fragmentados nos COCs B e C serem similares à 0h, é importante lembrar que em número de células, os COCs-B estão em desvantagem o que pode ter consequências que serão discutidas mais adiante. Após a maturação dos COCs por 24h houve um aumento significativo dos núcleos fragmentados nos grupos de COCs B e C. No COCs-C, a quantidade de células fragmentadas dobrou, já os COCs-B tiveram um aumento na proporção de células fragmentadas significativamente maior, com aproximadamente seis vezes mais células fragmentadas. Esses resultados indicam que a comunicação *cumulus*-oócito é ainda mais prejudicada nos COCs-B, dado o comprometimento celular e o número de células presente por COC.

Com os resultados apresentados podemos afirmar que o tipo morfológico dos COCs está relacionado com o grau de fragmentação do DNA das CC e que o maior dano no DNA nas CC pode estar relacionado à menor capacidade dos COCs em se manter em VGi indicando perda parcial do controle do bloqueio meiótico. Isso sugere um possível *feedback* positivo entre o oócito e as CC (Figura 15). A hipótese é que o grau de fragmentação superior nos COCs com *cumulus* parcial seja gerado por uma deficiência de sinalização de fatores entre *cumulus* e oócito e vice-versa. Outra hipótese é que o oócito, em sinal da diminuição das comunicações e consequentemente do recebimento dos fatores sinalizadores produzidos nas CC, reduza o fornecimento à essas de fatores protetores de fragmentação levando à intensificação e precocidade da degeneração destas células. No ambiente intra-folicular o efeito anti-fragmentação oocitário poderia estar sendo mantido pela concentração de fatores sinalizadores presentes no líquido folicular produzidos pelas demais células do folículo.

Figura 15 - Esquema ilustrativo de um possível mecanismo de *feedback* positivo entre oócitos e células do *cumulus*, onde as concentrações de Fatores Sinalizadores produzido pelas células foliculares (FSCF) controlam a produção do oócitos de fatores protetores da fragmentação celular (FPF).

Em fêmeas idosas de camundongos, foi demonstrado um incremento da apoptose em oócitos maturados com a presença do *cumulus* em relação aos oócitos maturados sem as CC (desnudos), evidenciando a possibilidade de indução de apoptose pelas CC em camundongo (PERES; TILLY, 1997). Estudos realizados com folículos de COCs de diferentes qualidades morfológicas sugerem que o processo temporal e espacial da atresia da parede folicular (das CG para os COCs) parece não ser estritamente linear. É provável que a cada momento do decorrer do desenvolvimento folicular, determinado número de células submetem-se à MCP. Entretanto, somente quando a submissão à MCP atingir um determinado número de células é que o processo de atresia poderá afetar a sobrevivência oocitária (ZEUNER et al., 2003). Quando um *pool* de COCs é recuperado de um determinado animal ou de ovários de abatedouro é possível encontrar COCs de uma onda folicular recente; COCs oriundos de folículos em regressão de uma onda de crescimento folicular anterior e COCs de folículos que passaram por um pico de LH. Em relação aos folículos em regressão, convém ressaltar que há dois parâmetros indicativos de atresia folicular: a razão E_2/P_4 e o estabelecimento de apoptose nas CG e nos oócitos (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2000b). A regulação hormonal da atresia folicular é influenciada por diferentes fatores e possui papel importante no processo da MCP nos diferentes estágios do desenvolvimento folicular (MARKSTROM et al., 2002).

Tendo em vista os resultados do presente trabalho de bloqueio meiótico e de fragmentação das CC é possível supor que: como os COCs retomam a meiose quando retirados dos folículos (LONERGAN, 1997), (1) o bloqueio oocitário intra-folicular é mantido pelas concentrações de fatores foliculares sinalizadores presentes no líquido folicular; como na ausência de CG o bloqueio induzido pelo líquido folicular não é efetivo (RACOWSKY; BALDWIN, 1989), (2) as CG são responsáveis pela produção e/ou edição destes fatores; e como as CC permitem a transferência direta de mensageiros das células foliculares e do líquido folicular para o oócito (AKTAS et al., 1995), (3) existe a necessidade de COCs morfolologicamente íntegros para que ocorra a transferências de alguns sinais parácrinos e autócrinos importantes nos mecanismos fisiológicos do ovário. Sendo assim, o estado das CC pode influenciar o desenvolvimento do oócito (PERES; TILLY, 1997; EMANUELLI et al., 2004; PERNA JUNIOR et al., 2004) e possivelmente o bom funcionamento das CC seja influenciado pelo oócito (PERES; TILLY, 1997).

Outro ponto importante é o acúmulo de estoques maternos como RNAm, ribossomos e polipeptídeos pelo oócito durante a fase de crescimento. Esse acúmulo é crucial para o bom desenvolvimento do oócito e posteriormente do futuro embrião. No entanto, muitos oócitos bovinos submetidos ao sistema de cultivo *in vitro* não completam a sua fase de crescimento levando a uma falha no seu desenvolvimento embrionário (PAVLOK et al., 1992; PAVLOK et al., 1993; LONERGAN et al., 1994; HYTTEL, 2001). Os critérios de seleção de oócitos bovinos baseados na avaliação visual das características morfológicas utilizados na MIV foram sugeridos pela primeira vez por Leibfried e First (1979). Desde então, muitos trabalhos propuseram o esquema de classificação baseado na compactação e no número de camadas de CC que rodeiam o oócito (YANG; LU, 1990; HAZELEGER; STUBBINGS, 1992; LAURINCIK et al., 1992) e na própria aparência do oócito (DE LOOS et al., 1989; YOUNIS et al., 1989). Hazeleger et al. (1995) relatou uma correlação positiva entre a morfologia do COC e a produção de blastocistos em cultivos *in vitro*. No presente trabalho foram utilizadas categorias morfológicas de COCs diferentes, embora semelhantes as categorias de Hazeleger et al. (1995). Mesmo assim, foi encontrada uma correlação positiva entre morfologia e produção de blastocisto. No entanto, quando avaliada a qualidade dos blastocistos, não houve diferença significativa na relação MCI e TE entre as diferentes morfologias de COCs. Baseado nos resultados encontrados neste trabalho e em outros estudos realizados previamente (GALLI; LAZZARI, 1996; MERMILLOD et al., 1999; WIT; KRUIP, 2001; RIZOS et al., 2003), podemos afirmar que a morfologia do COC interfere na quantidade de

embriões clivados e na quantidade de oócitos que alcançam o estágio de blastocisto, mas não na qualidade destes.

Bilodeau-Goeseels e Panich (2002) relataram que os COCs com menos de cinco camadas de CC e com citoplasma homogêneo, pós-clivagem, tem um desenvolvimento até o estágio de blastocisto semelhante aos COCs com mais camadas de CC, mesmo sua clivagem sendo significativamente inferior. No presente trabalho, mesmo utilizando COCs com menos de 3 camadas de CC, foram encontrados resultados similares, onde embriões oriundos de COC-B, após ultrapassar o bloqueio de 8 células, tiveram um desenvolvimento a blastocisto similar ao grupo com mais camadas de CC. Bilodeau-Goeseels e Panich (2002) sugerem que COCs com menos camadas de CC e com ooplasma homogêneo podem ser tão competentes nas taxas de clivagem quanto os COCs com mais camadas de CC, e que as taxas de clivagem destes só não são similares aos COCs com mais camadas de CC porque a falta de CC poderia afetar negativamente a fertilização. No presente trabalho, foi utilizada a ativação partenogenética ao invés da FIV com objetivo de excluir a interação *cumulus*-espermatozóide, mesmo assim, não foi observada o aumento significativo das taxas de clivagem dos grupos com menos camadas de CC. Além disso, o grupo de melhor qualidade morfológica atingiu mais rapidamente o quarto ciclo celular e apresentou maior capacidade de ultrapassar o bloqueio transcricional comparado aos grupos de COCs com *cumulus* parcial e o *cumulus* expandido. Tendo em vista essas constatações, existe a possibilidade que o efeito do dano no DNA presente nas CC seja mais prejudicial à maturação citoplasmática que à nuclear.

Estudos realizados por Iwasaki et al. (1990) já indicavam o uso da relação entre a quantidade de células da MCI e o TE como forma de avaliação da qualidade embrionária de oócitos fertilizados *in vitro* ou *in vivo*. Em mamíferos, a formação do blastocisto é o primeiro processo de diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário permitindo a formação de dois tipos celulares: MCI e TE. As células da MCI contribuem para formação da maioria dos tecidos embrionários e para uma parte da membrana extra-embrionária, visto que as células do TE forma a maior parte dos envoltórios fetais (GARDNER, 1989 apoud KOO et al., 2002). Ambas as linhagens são vitais para a sobrevivência do embrião e principalmente para sobrevivência fetal. Em embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, a relação MCI/TE é menor, pois estes possuem maior quantidade de células no TE (KOO et al., 2002). No presente trabalho, em que foram utilizados embriões partenogenéticos, a relação dessa proporção foi inversa resultando uma maior quantidade de células na MCI. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Koo et al. (2002) em blastocistos produzidos por transferência nuclear (TN). Nesse trabalho, Koo et al. (2002) demonstraram a deficiência na

quantidade de células do TE de embriões de TN, explicando assim a deficiência da maioria dos clones na formação placentária. As hipóteses para a presença reduzida de células do TE em embriões partenotos e clonados poderia ser a contribuição da impressão paterna para formação e diferenciação das células do TE e também a importância dos transcritos paternos para o embrião recém formado (OSTERMEIER et al., 2004).

A avaliação da presença das proteínas BAX e BCL-2 e de seus transcritos em CC de COCs de diferentes morfologias foi realizada neste trabalho por quatro razões: (a) os transcritos de *BAX* e *BCL-2* e as proteínas desses são detectados nas CC; (b) as proteínas codificadas por estes transcritos são prototípicas dos membros anti-apoptóticos (gene *BCL-2*) e pró-apoptóticos (gene *BAX*) da família BCL-2; (c) a relação de BCL-2/BAX pode determinar a sobrevivência celular (OLTVAI et al., 1993) e (d) não há relatos da frequência dos transcritos de *BCL-2* e *BAX* e da presença das proteínas em CC oriundas de COCs de diferentes qualidades morfológicas. Os dados preliminares não mostraram uma diferença significativa na frequência dos transcritos dos genes *BAX* e *BCL-2* de CCs maduras (24h) oriundas de COCs de diferentes morfologias. Entretanto, quando foi verificada a presença das proteínas destes genes após a maturação (24h), foi observado um visível aumento na proteína BAX no grupo que apresentava *cumulus* parcial (CC-B). Nos grupos de boa qualidade morfológica e nos grupos com *cumulus* expandido (não atrésico), a concentração desta proteína não variou. Esses dados em CC são similares aos encontrados por Yang e Rajamahendran (2002) em oócitos. Nesse trabalho os oócitos oriundos de COCs de qualidade morfológica ruim também apresentavam uma maior quantidade da proteína BAX quando comparado com os oócitos de melhor qualidade. Já a presença da proteína BCL-2 nas CC não diferiu entre as diferentes morfologias de COCs. No entanto, na comparação das proteínas BCL-2 e BAX, os grupos com o *cumulus* completo e expandido apresentaram uma maior relação BCL-2/BAX. O grupo de COC que possuía número reduzido de CC apresentou uma relação das proteínas BCL-2/BAX inferior aos demais grupos. Os dados relacionados à proporção proteica de BCL-2/BAX juntamente com os dados da análise de fragmentação do DNA (TUNEL e Ensaio Cometa) nas diferentes morfologias sustentam o conceito proposto que a relação de BCL-2/BAX determina se uma célula vive ou morre (OLTVAI et al., 1993; YANG; RAJAMAHENDRAN 2002). Estudos adicionais são necessários para verificar se a qualidade morfológica dos COCs está relacionada com a regulação da transcrição de *BCL-2* e *BAX*, ou se essa diferença existe a nível pós-transcricional.

Em mamíferos, a progressão do oócito fecundado até a formação e implantação embrionária depende de uma bem sucedida programação genética. A relevância disso é maior

para embriões produzidos *in vitro*, onde muitos dos oócitos fecundados não têm competência para desenvolver a blastocisto. Isso remete a grande importância materna na formação do embrião e o grande impacto que a variabilidade qualitativa do oócito tem sobre a competência do desenvolvimento embrionário. Assim, a qualidade do oócito pode contribuir significativamente para aumentar ou diminuir o número de embriões que conseguem ultrapassar o bloqueio embrionário *in vitro* (HARDY et al., 2001). Tilly (2001) relata vários estudos recentes que mostram a sobrevivência do oócito é controlada por um grande número de moléculas reguladoras da morte celular responsáveis tanto por ativar como suprimir a morte celular. O sucesso do desenvolvimento do embrião na pré-implantação é dependente do tipo e quantidade de estoque materno armazenado (MUGGLETON-HARRIS; BROWN, 1988; GANDOLFI, T.A.; GANDOLFI, F., 2001). Moléculas relacionadas com a sobrevivência celular, quando acumuladas inadequadamente durante a oogênese ou mudanças ocorridas durante o envelhecimento do oócito *in vitro* (METCALFE et al., 2003) ou *in vivo* (JURISICOVA; ACTON, 2004) podem induzir a um desequilíbrio, tendo como resultado uma morte embrionária precoce. A transição materno-zigótica da atividade transcricional possivelmente é uma função relacionada aos componentes citoplasmáticos do oócito e não reflexo do núcleo recém formado do embrião (GODDARD; PRATT 1983, apud JURISICOVA; ACTON, 2004). A via mais lógica para a indução da MCP em embriões em desenvolvimento é baseada na herança materno-citoplasmática do embrião. Esta contém diferentes moléculas (transcritos e proteínas) pró e anti-apoptóticas (MEIRELLES et al., 2004). A presença de muitas destas moléculas, seja como transcritos de genes ou como proteínas relacionadas à sobrevivência celular, vem sendo observada em oócitos e embriões (JURISICOVA et al., 1998; WARNER et al., 1998; PEREZ et al., 1999; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002). Estudos mostraram que a injeção intracitoplasmática de isolado de mitocôndria pode ser suficiente para salvar um oócito da fragmentação celular (PEREZ et al., 1999, ACTON et al., 2004). Assim, essas organelas celulares e proteínas associadas são candidatas prováveis para mediar a ação positiva do ooplasma transplantado (JURISICOVA; ACTON, 2004).

Um estudo conduzido no Laboratório de Morfo-fisiologia e Desenvolvimento/FZEA-USP mostrou que os transcritos de BAX e de BCL-2 estão presentes em todos os embriões independente de seu potencial de desenvolvimento (MEIRELLES et al., 2004). No presente trabalho, esses transcritos foram encontrados nas CC dos grupos de COCs independente do tipo morfológico. Entretanto, é importante ressaltar mais uma vez que todos os COCs utilizados nos grupos experimentais apresentavam ooplasma homogêneo e com finas

granulações. Esse dado pode ter gerado um “vício” nas amostras eliminando os COCs em fase avançada de MCP, o que explica a não variação dos transcritos entre os grupos. Com isso, são necessários estudos mais aprofundados para uma melhor compreensão dos mecanismos da MCP relacionados aos transcritos dos genes *BAX* e *BCL-2* nas CC.

6 RESUMO DOS RESULTADOS

Quanto à cinética da maturação:

- A morfologia dos COCs está relacionada com a morfologia da cromatina no momento da retirada do folículo.
- COCs com *cumulus* compacto e completo mantêm o bloqueio meiótico por maior tempo após retirada do folículo;
- COCs com poucas camadas de CC ou com *cumulus* expandido progridem a meiose mais rapidamente após a retirada folicular.

Quanto ao potencial de desenvolvimento:

- A morfologia dos COCs interfere na cinética e no potencial do desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*.
- A morfologia dos COCs não altera a qualidade dos blastocistos e sim a quantidade de oócitos que conseguem ultrapassar o bloqueio embrionário e desenvolver a blastocisto.
- Embriões oriundos de COCs com *cumulus* completo e compacto atingem o 4º ciclo celular mais rapidamente em comparação aos embriões oriundos de COCs com *cumulus* parcial ou expandido.

Quanto a MCP nas CC:

- A morfologia dos COCs está relacionada com o status do DNA das CC e os COCs com *cumulus* completo e compacto possuem fragmentação no DNA menos frequente que os com *cumulus* parcial e expandido.
- A fragmentação das CC de COCs com número reduzido de células aumenta drasticamente após o período de maturação quando comparadas com COCs com várias camadas independente do grau de expansão das células.
- COCs com poucas camadas de CC possuem quantidade maior da proteína BAX em comparação aos COCs com *cumulus* completo ou expandido.

- A proporção das proteínas BCL-2/ BAX é maior nos COCs com maior número de CC sejam elas expandidas ou não.
- Não existe variação da proporção dos transcritos de *BCL-2* e *BAX* total, do *BCL-2* e a isoforma α do gene *BAX* e *BCL-2* e a isoforma Ψ do gene *BAX* nas CC nas diferentes morfologias de COCs.

7 CONCLUSÃO

Em COCs bovinos de diferentes morfologias existe uma correlação negativa entre de fragmentação nuclear das CCs e o potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Valores baixos na razão das proteínas BCL-2/BAX está relacionada com o aumento de fragmentação nuclear nas CC.

Não foi observada variação da proporção dos transcritos *BCL-2/BAX* nas CCs de COCs de diferentes morfologias, maturadas por 24h *in vitro*, independente da isoforma do gene BAX ser a alfa ou a psi.

8 REFERÊNCIAS

ACTON, B.M. et al. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. **Mol. Hum. Reprod.**, Oxford, v.10, n.1, p.23-32, 2004.

AHUJA, K.K. Fertilization: the importance of scientific research to clinical practice. **Br. J. Fam. Plann.**, Genebra, v.13, p.18-24, 1988.

AKTAS, H. et al. Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP]_i may have physiological relevance in bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford , v.105, n.2, p.237-245, 1995.

ALNEMRI, E.S.; LITWACK, G. Activation of internucleosomal DNA cleavage in human CEM lymphocytes by glucocorticoid and novobiocin. Evidence for a non Ca²⁺-requiring mechanism(s). **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.265, p.17323–17333, 1990.

AMSTERDAM, A.; SELVARAJ, N. Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. **Endocr. Rev.**, Charlotte, v.18, p.435–461, 1997.

AMSTERDAM, A. et al. Crosstalk among multiple signaling pathways controlling ovarian cell death. **Trends Endocrinol. Metab.**, New York, v.10, p.255–262, 1999.

_____. Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. **Steroids**, San Francisco, v.63, p.314–318, 1998.

ASSEY, R.J. et al. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.37, n.3, p.335-344, 1994.

AVELINO, K.B.; VANTINI, R.; GARCIA, J.M. Cultivo *in vitro* de embriões bovinos sob condições semi-definidas: efeitos de fontes energéticas e atmosferas gasosas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.210, 2000.

BAKER, H.W. et al. Partial hypogonadotrophic hypogonadism: studies of pituitary function and of the pituitary-testicular relationship in two patients. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, Adelaide, v.50, n.7, p.861-872, 1972.

BAKER, T.G. Comparative aspects of the effects of radiation during oogenesis. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.11, n.1, p.9-22, 1971.

BAYSAL, K. et al. Na⁺ dependent Ca²⁺ efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive Ca²⁺/2Na⁺ exchanger. **Am. J. Physiol.**, Baltimore, v.266, p.800-808, 1994.

BETTS, D.H.; KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.171-191, 2001.

BEVERS, M.M. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, Los Altos, v.47, p.13-22, 1997.

BILLIG, H.; FURUTA, I.; HSUEH, A.J. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. **Endocrinology**, Springfield, v.133, n.5, p.2204-2212, 1993.

BILODEAU-GOESELS, S.; PANICH, P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.71, n.3-4, p.143-155, 2002.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M.A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **J. Androl.**, Schaumburg , v.18, n.4, p.454-460, 1997.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.41, n.1, p.54-62, 1995.

BONI, R.; CUOMO, A.; TOSTI, E. Developmental potential in bovine oocytes is related to *cumulus*-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.66, n.3, p.836-842, 2002.

BRACKETT, B.G.; ZUELKE, K.A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.39, p.43-64, 1993.

BRATTON, S.B. et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades. In death receptor and stress-induced apoptosis. **Exp. Cell. Res.**, New York, v.256, p.27–33, 2000.

BRISON, D.R.; SCHULTZ, R.M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biol. Reprod.**, Champaign, Springfield, v.56, n.5, p.1088-1096, 1997.

CARAMBULA, S.F. et al. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. **Endocrinol.**, Springfield, v.143, n.4, p.1495-1501, 2002.

CASTILHO, R.F. et al. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **J. Neuroscience**, Baltimore, v.18, p.10277-10286, 1998.

CHA, K.Y.; CHIAN, R.C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. **Hum. Reprod. Update**, Oxford, v.4, n.2, p.103-120, 1998.

CHANG, S.H. et al. The effector phase of physiological cell death relies exclusively on the posttranslational activation of resident components. **Exp. Cell. Res.**, New York, v.277, n.1, p.15-30, 2002.

CHUN, S.Y. et al. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor-I. **Endocrinol.**, Springfield, v.135, p.1845–1853, 1994.

CRAN, D.G. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, Oxford, v.38, p.49-62, 1989.

CROZET, N. et al. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. **Gamete Res.**, v.14, p.65-73, 1986.

CRYNS, V.; YUAN, J. Proteases to die for. **Genes Dev.**, New York, v.12, n.11, p.1551-1570, 1998.

DE LOOS, F. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res.**, New York, v. 24, n.2, p.197-204, 1989.

DE LOOS, F. et al. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine *cumulus* oocyte complexes. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.28, n.3, p.255-259, 1991.

DE SOUZA, P.A. et al. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenic factors. **Theriogenology**, Los Altos, v.49, p.115-128, 1998.

DENAULT, J.B.; SALVESEN, G.S. Caspases: keys in the ignition of cell death. **Chem. Rev.**, New York, v.102, n.12, p.4489-4500, 2002.

DIDENKO, V.V.; HORNSBY, P.J. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. **J. Cell. Biol.**, New York, v.135, p.1369–1376, 1996.

DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford, v.59, p.463-468, 1980.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.35, n.1, p.55-79, 1991.

DUNNE, L.D.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.58, p.39-44, 2000.

EMANUELLI, I.P. et al. Líquido folicular na inibição da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.28, p.246, 2000.

_____. Programmed cell death in *cumulus* cells during oocyte maturation in different *cumulus* oocyte-complexes categories. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Abstracts...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. v.1, p.29.

EPPIG, J.J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bioessays**, Cambridge, v.13, n.11, p.569-574, 1991.

ERIKSON, B.H. Development and senescence of the post natal bovine ovary. **J. Anim. Sci.**, Albani, v.25, p.800-805, 1966.

FADOK, V.A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol.**, Baltimore, v.148, n.7, p.2207-2216, 1992.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.42, n.4, p.437-442, 1995.

FAIR, T. et al. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.43, n.4, p.503-512, 1996.

_____. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anat. Embryol.**, Berlin, v.195, n.4, p.327-336, 1997a.

_____. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.46, n.2, p.208-215, 1997b.

FUJINO, Y. et al. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.11, n.7, p.1480-1483, 1996.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.42, n.1-4, p.371-379, 1996.

GANDOLFI, T.A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, n.6, p.1255-1276, 2001.

GARDNER, D.K.; LEESE, H.J. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford, v.88, p.361-368, 1990.

GARDNER, R.L. Cellular basis of morphogenesis. **Symp. Ciba Found.**, Amsterdam, v.144, p.172-181, 1989.

GEWIES, A. Introduction to apoptosis. **Apo. Rev.** Disponível em:

<<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>>. p.1-26. Acesso em: out. 2004.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.60-61, n.2, p.61-79, 2000.

GLUECKSMANN, A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. **Biolog. Rev.**, Princeton, v.26, p.59-86, 1951.

GODDARD, M.J.; PRATT, H.P. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the '2-cell block'. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, Oxford, v.73, p.111-133, 1983.

GONÇALVES, P.B.D. et al. Mural granulosa cells are responsible for the inhibitory effect of bovine follicular fluid on oocyte nuclear maturation. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.64, p.134-135, 2001.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. 1ed. Cambridge: University Press, 1994. p.639.

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. **Endocr. Ver.**, Baltimore, v.17, n.2, p.121-155, 1996.

GREEN, D.R.; EVAN, G.I. A matter of life and death. **Cancer Cell**, Cambridge, v.1, n.1, p.19-30, 2002.

GROSS, A.; MCDONNELL, J.M.; KORSMEYER, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes and Develop.**, New York, v.13, p.1899-1911, 1999.

GUNTER, T.E. et al. The Ca^{2+} transport mechanisms of mitochondria and Ca^{2+} uptake from physiological-type Ca^{2+} transients. **Bioch. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1366, p.5-15, 1998.

GUTHRIE, P.B. et al. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. **J. Neuroscience**, Baltimore, v.19, n.2, p.520-528, 1999.

HANDYSIDE, A.H.; HUNTER, S. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. **Roux's Arch. Dev. Biol.**, Leipzig, v.195, p.519-526, 1986.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reproduction in farm animals. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2000. 509p.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Mol. Hum. Reprod.**, Oxford, v.3, n.10, p.919-925, 1997.

HARDY, K. et al. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.98, n.4, p.1655-1660, 2001.

HASHIMOTO, S. et al. Effects of *cumulus* cell density during *in vitro* maturation of the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, Los Saltos, v.49, p.451-463, 1998.

HAZELEGER, N.L.; STUBBINGS, R.B. Developmental potential of selected bovine oocyte *cumulus* complexes. **Theriogenology**, Los Altos, v.37, p.219, 1992.

HAZELEGER, N.L. et al. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, v.43, p.509-522, 1995.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, London, v.407, p.770-6, 2000.

HOCKENBERY, D. et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, New York, v.348, p.334-336, 1990.

HØST, E.; LISMIKKELSEN, A.; JENSEN, S. Apoptosis in human *cumulus* cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. **Acta Obst. Gynecol. Scand.**, Copenhagen, v.79, n.11, p.936, 2000.

HUGHES JR., F.M.; GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology**, Springfield, v.129, n.5, p.2415-2422, 1991.

HYTTEL, P. Nucleolus formation in pre-implantation cattle and swine embryos. **Ital. J. Anat. Embryol.**, Firenze, v.106, n.2, p.109-117, 2001.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, Oxford, v.38, p.35-47, 1989.

HYTTEL, P.; MADSEN, I. Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for transmission electron microscopy. **Acta Anat.**, Basel, v.129, n.1, p.12-14, 1987.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.47, n.1, p.23-32, 1997.

_____. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford, v.78, n.2, p.615-625, 1986.

IWASAKI, S. et al. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford, v.90, n.1, p.279-284, 1990.

JURISICOVA, A.; ACTON, B.M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. **Reproduction**, Cambridge, v.128, n.3, p.281-291, 2004.

JURISICOVA, A. et al. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.51, n.3, p.243-253, 1998.

_____. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.93, n.1, p.161-165, 1996.

KERR, J.F.R.; WINTERFORD, C.M.; HARMON, B.V. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, Villejuif, v.73, p.2013-2026, 1994.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.R.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, London, v.26, p.239-257, 1972.

KIM, J.M. et al. Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is associated with increased levels of Fas and Fas ligand in the rat ovary. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.58, p.1170-1176, 1998.

KIM, N.H. et al. Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilisation in the porcine oocyte. **Zygote**, Cambridge, v.4, n.2, p.145-149, 1996.

KOO, D. et al. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.67, p.487-492, 2002.

KORSMEYER, S.J. Regulators of cell death. **Trends Genet.**, Cambridge, v.11, n.3, p.101-105, 1995.

KOTHAKOTA, S. et al. Caspase 3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. **Science**, Standford, v.278, p.294-298, 1997.

KOYA, R.C. et al. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.275, n.20, p.15343-15349, 2000.

KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nature Med.**, New York, v.3, p.614-620, 1997.

KRUIP, T.A.M.; CRAN, D.G.; VANBENEDEN, T. Structural changes in bovine oocytes. **Gamete Res.** New York, v.8, p.29-47, 1983.

KWIATKOWSKI, D.J. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. **Cell. Biology**, London, v.11, p.103-108, 1999.

LAURINCIK, J. et al. Bovine *cumulus* expansion and corona-oocyte disconnection during culture *in vitro*. **Reprod Nutr Dev.**, Paris, v.32, n.2, p.151-61, 1992.

LEAL, C.L.; LIU, L. Differential effects of kinase inhibitor and electrical stimulus on activation and histone H1 kinase activity in pig oocytes. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.52, n.1, p.51-61, 1998.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **J. Anim. Sci.**, Albani, v.48, p.76-86, 1979.

LOCKSHIN, R.A.; WILLIAMS, C.M. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. **J. Insect. Physiol.**, London, v.10, p.643-649, 1964.

LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v.2, n.7, p.545-550, 2001.

LOEWENSTEIN, W.R. The cell-to-cell channel of gap junctions. **Cell**, Cambridge, v.48, n.5, p.725-726, 1987.

LONERGAN, P. Growth of preimplantation bovine embryos. **Acta Vet. Scand.**, København, v.35, n.4, p.307-320, 1994.

LONERGAN, P.; GORDON, I. Effect of time of transfer to granulosa cell monolayer and cell-stage at 48h post-insemination on bovine oocyte development following IVM/IVF/IVC. In: CONFERENCE OF THE EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 8., 1992, **Proceedings...** p.178.

LONERGAN, P. et al. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford, v.109, n.2, p.355-365, 1997.

LONERGAN, P. et al. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, Paris, v.41, p.427-437, 2001.

LOOS, F.A.M. et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res.**, New York, v.24, p.197-204, 1989.

MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.27, p.1-11, 1992.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v.146, n.1, p.3-15, 1995.

MARKSTROM, E. et al. Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, Cambridge, v.123, n.1, p.23-30, 2002.

MARTIN, S.J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2. **J. Exp. Med.**, v.182, p.1545-1556, 1995.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, Cambridge, v.8, p.57-68, 2000.

_____. Developmental regulation of apoptosis in the early bovine embryo. **Theriogenology**, Los Altos, v.51, p.185, 1999.

MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. The influence of *cumulus*-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.911-922, 2001.

MEIRELLES, F.V. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.82-83, p.13-20, 2004.

MERMILLOD, P.; MARCHAL, R. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, Oxford, v.54, p.449-460, 1999.

METCALFE, A.D. et al. Amplification of representative cDNA pools from single human oocytes and pronucleate embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.65, n.1, p.1-8, 2003.

MORI, T.; AMANO, T.; SHIMIZU, H. Roles of gap junctional communication of *cumulus* cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes culture *in vitro*. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.624, p.913-919, 2000.

MUGGLETON-HARRIS, A.L.; BROWN, J.J. Cytoplasmic factors influence mitochondrial reorganization and resumption of cleavage during culture of early mouse embryos. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.3, p.1020-1028, 1988.

MUZIO, M. et al. An induced proximity model for caspase-8 activation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.273, p.2926-2930, 1998.

NICHOLSON, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ.** London, v.6, p.1028- 1042, 1999.

OHMORI, T. et al. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by bcl-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.192, n.1, p.30-36, 1993.

OLTVAI, Z.N.; MILLIMAN, C.L.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell.**, v.74, n.4, p.609-619, 1993.

OSTERMEIER, G.C. et al.. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**, London, v. 429 p.154, 2004.

PAROLIN, M.B.; REASON, I.J. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v.38, n.2, p.38-44, 2001.

PARRISH, J.J. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, Los Altos, v.25, n.4, p.591-600, 1986.

PATEL, T.; GORES, G.J. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. **Liver. Transplant. Surg.**, Hoboken, v.4, p.42-50, 1998.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.31, n.1, p.63-67, 1992.

PAVLOK, A. et al. Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8-cell bovine embryos developed by *in vitro* maturation and fertilization of oocytes from different growth categories of antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.35, n.3, p.233-243, 1993.

PEREZ, G.I.; TAO, X.J.; TILLY, J.L. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. **Mol. Hum. Reprod.**, Oxford, v.5, n.5, p.414-420, 1999.

PEREZ, G.I.; TILLY, J.L. *Cumulus* cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.12, p.2781-2783, 1997.

PERNA JUNIOR, F. et al. Cinética do desenvolvimento embrionário bovino *in vitro* comparando complexo *cumulus*-oócitos de diferentes qualidades morfológicas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2004, Piracicaba. < <http://www.usp.br/siicusp/12osiicusp/ficha2274.htm>>. Acesso em: dez. 2004.

PORTER, D.A. et al. Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development. **Reprod.**, Cambridge, v.121, p.561-566, 2001.

RACOWSKY, C.; BALDWIN, K.V. Modulation of intrafollicular oestradiol in explanted hamster follicles does not affect oocyte meiotic status. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford, v.87, n.2, p.409-420, 1989.

REUTELINGSPERGER, C.P.; VAN HEERDE, W.L. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. Review. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v.53, n.6, p.527-532, 1997.

RICHARDSON, H.; KUMAR, S. Death to flies: drosophila as a model system to study programmed cell death. **J. Immunol. Methods**, Baltimore, v.265, n.1-2, p.21-38, 2002.

RIZOS, D. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.68, p.236-243, 2003.

SANDERS, E.J.; TORKKELI, P.H.; FRENCH, A.S. Patterns of cell death during gastrulation in chick and mouse embryos. **Anat. Embryol.**, Berlin, v.195, n.2, p.147-154, 1997.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.**, London, v.45, n.3, p.528-537, 2000.

SAUNDERS JR., J.W. Death in embryonic systems. **Science**, Standford, v.154, n.749, p.604-612, 1966.

SAVIO, J.D. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford, v.83, n.2, p.663-671, 1988.

SIRARD, M.A. et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.40, n.6, p.1257-1263, 1989.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle monitored by real time ultrasonography. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.39, p.308-317, 1988.

SMAILI, S.S. et al. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.36, n.2, p.183-190, 2003.

TAKAHASHI, M. et al. Effects oxidative stress on development and DNA damage in *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, Los Altos, v.54, p.137-145, 2000.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L. *In vitro* development of bovine one-cells embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate amino acids and vitamins. **Theriogenology**, Los Altos, v.37,

p.963-978, 1992.

TAKASE, K.; ISHIKAWA, M.; HOSHIAI, H. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. **Tohoko J. Exp. Med.**, Sendai, v.175, p.69-76, 1995.

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. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.63, p.805-810, 2000.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R.; WALTON, J.S. Ovarian follicular dynamics and plasma luteinizing hormone concentrations in norgestomet treated heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.32, p.173-184, 1993.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.26, n.1, p.90-100, 1990.

THOMAS, R.E.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Bovine *cumulus* cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.70, n.3, p.548-556, 2004.

THOMPSON, C.B. Apoptosis. In: PAUL, W.E. (Ed.). **Fundamental immunology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p.813-829.

THORNBERRY, N.A. et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.272, p.17907-17911, 1997.

TILLY, J.L. Apoptosis and ovarian function. **Rev. Reprod.**, London, v.1, p.162-172, 1996.

_____. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v.2, n.11, p.838-848, 2001.

TILLY, J.L. et al. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. **Endocrinol.**, Springfield, v.129, p.2799-2801, 1991.

TRUMPT, B.F.; GOLDBLATT, P.J.; STOWELL, R.E. Studies of necrosis *in vitro* of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural alterations in endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, plasma membrane and lipid droplets. **Lab. Invest.**, New York, v.14, p.2000-2028, 1965.

VAN LOO, G. et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. **Cell. Death. Differ.**, London, v.9, p.20-26, 2002.

WARNER, C.M. et al. Genetic regulation of preimplantation mouse embryo survival. **J. Exp. Zool.**, Philadelphia, v.282, p.272-279, 1998.

WIT, A.A.C.; KRUIP, A.M. Bovine *cumulus*-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for μ -amaniti, oocyte diameter and developmental capacity. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.65, n.1-2, p.51-65, 2001.

WOLTER, K.G. et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. **J. Cell. Biol.**, New York, v.139, n.5, p.1281-1292, 1997.

WU, D.; WALLEN, H.D.; NUNEZ, G. Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. **Science**, Standford, v.275, p.1126-1129, 1997.

WYLLIE, A.H.; KEER, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, New York, v.5, p.97-104, 1980.

WYLLIE AH. The genetic regulation of apoptosis. **Curr Opin Genet Dev.**, London, v.5, n.1, p.97-104, 1995.

YANG, H.W. et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.13, n.4, p.998-1002, 1998.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.70, n.3-4, p.159-169, 2002.

_____. Involvement of apoptosis in the atresia of nonovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.63, p.1313-1321, 2000a.

_____. 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. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.62, p.1209-1217, 2000b.

YANG, Y.B.; LU, K.H. The influence of bovine oocyte type on *in vitro* fertilization and subsequent *in vitro* development. **Theriogenology**, Los Altos, v.33, p.355, 1990.

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**, London, v.369, p.321-333, 1994.

YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Gamete Res.**, v.23, p.189-201, 1989.

ZEUNER, A. et al. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during *in vitro* maturation. **Theriogenology**, Los Altos, v.59, n.5-6,

p.1421-1433, 2003.

ZHANG, G. et al. Caspase inhibition prevents staurosporine-induced apoptosis in CHO-K1 cells. **Apoptosis**, New York, v.3, n.1, p.27-33, 1998.