

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FACULDADE DE BIOMEDICINA

PRISCILA DI PAULA BESSA SANTANA

APOPTOSE EM EMBRIÕES BOVINOS MATURADOS E  
CULTIVADOS IN VITRO COM DEXAMETASONA.

BELÉM  
2009

PRISCILA DI PAULA BESSA SANTANA

APOPTOSE EM EMBRIÕES BOVINOS MATURADOS E  
CULTIVADOS IN VITRO COM DEXAMETASONA.

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de  
Biomedicina da Universidade  
Federal do Pará, como requisito  
parcial para a obtenção do grau e  
bacharel em Biomedicina.

Orientador: Profº Drº Otávio Mitio Ohashi

BELÉM  
2009

PRISCILA DI PAULA BESSA SANTANA

APOPTOSE EM EMBRIÕES BOVINOS MATURADOS E  
CULTIVADOS IN VITRO COM DEXAMETASONA.

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de  
Biomedicina da Universidade  
Federal do Pará, como requisito  
parcial para a obtenção do grau  
de Bacharel em Biomedicina.

**Belém (PA), 18 de dezembro de 2009.**

**Banca Examinadora:**

---

Profº Drº Otávio Mitio Ohashi  
ICB – UFPA  
(Orientador)

---

Profª Drª Simone do Socorro Damasceno Santos  
(ICB – UFPA)

---

Drº Moisés dos Santos Miranda  
(ICB – UFPA)

*“O conhecimento existe de duas formas –  
sem vida, armazenado em livros,  
e vivo na consciência dos homens.*

*A segunda forma de existência é, afinal, a forma essencial;  
a primeira, por mais indispensável que seja, ocupa apenas uma posição inferior”*

*“O eterno mistério do mundo é a possibilidade de o compreendermos . . .*

*O fato de que ele seja compreensível é um milagre.”*

(Albert Einstein)

“Ao grande criador, e todas as suas belas criaturas: meus Pais, meus Irmãos, meus Familiares, meus Amigos e meus Professores. Dedico a todos que indiretamente foram educadores e companheiros indispensáveis, aos quais sou agradecida pelo apoio, carinho e confiança dedicada. Por certo que o conhecimento adquirido com esforço e determinação pouco valeria sem o amor e sabedoria construída e vivenciada ao lado de pessoas indispensáveis nesta vida.”

## AGRADECIMENTOS

*Á Deus que me concede a vida e a esperança de todos os dias agradeço imensamente a oportunidade de conhecer, conviver e aprender com pessoas tão maravilhosas. E obrigada a todos vocês queridos irmãos que fazem parte desta minha história.*

*Aos meus Pais, **Walter Santana e Marlene Bessa**. A gratidão e o carinho que tenho por vocês estão além de palavras que eu possa expressar. Espero com as minhas ações e conquistas honrar e ser digna do amor, do exemplo e da dedicação de vocês, meus pais, ao longo de toda a minha vida.*

*Aos meus Irmãos **Alex e Wylliam** (chato e muito amado) e Familiares (meu avós Mário e Luiza. Minhas tias Graça, Marlene, Marta, Marinez, Maura e Rosa. Meus tios Pedro e Pedrinho. Os primos e as primas) pela cumplicidade e companheirismo.*

*Ao Prof. Dr. **Otávio Mitio Ohashi** pelo apoio e orientação.*

*Aos professores **Dr. Moysés Miranda, Dr<sup>a</sup> Simone Damasceno Santos** e principalmente à mestranda (professora também, né Nath) **Nathália Nogueira da Costa** pelas orientações e discussões imprescindíveis.*

*Aos professores **Dr<sup>a</sup>. Maria Paula Cruz Schneider e Dr. Artur Luiz da Costa da Silva** pelo apoio e orientação ao longo de minha formação acadêmica.*

*Aos amigos do Laboratório de Fecundação In Vitro **Marcela, Thiago, Rafael, Priscilona, Davi, André Mohamed, Ellen e Kaiã**n pela amizade e companheirismo. Cada momento ao lado de vocês é um aprendizado valioso. E também à **Carla Maria de Carvalho, Ivanilda Sodrê, e Ronald Reis** que já foram integrantes do Laboratório de FIV e tiveram participação no desempenho deste e de demais trabalhos.*

*Ao técnico **Renato Ferreira Silva** pela coleta do material biológico e ao **Matadouro Frigorífico Socipe** pela doação do material.*

*Ao Prof. Dr. **André Kayat** e à mestranda **Hellen Figueiredo** pelo auxílio técnico na execução da microscopia de fluorescência neste trabalho.*

*À Universidade Federal do Pará, ao Instituto de Ciências Biológicas, à Faculdade de Biomedicina, e a todos os professores que ministraram aula na graduação por possibilitarem minha formação acadêmica.*

*Ao Programa PIBIC/CNPq pela concessão da bolsa de estudos.*

*Aos amigos do Laboratório de Polimorfismo de DNA, Ricardo, Sávio, Diego, Baraúna, Leonardo, Hivana, Maurício, e Cintia pelas longas conversas, noites de jogatina e programas alternativos sensacionais! Ao lado de vocês aprendi muito mais do que sobre PCR e bactérias. Adoro vocês!*

*Aos amigos da turma de biomedicina 2006 Henrique (Tildinho), André (Zezinho), Natália, Nilton, Ayan, Jemima, Renan, Igor, Eduardo, Raissa e Layana por todos os momentos contagiantes que aproveitamos juntos. A amizade que cultivamos transcende os muros da universidade.*

*Aos Amigos Mariozito, Tarsila, Roberta (eh, Bertinha!), Tayse (minha “torre gêmea”) e Raphaela (phinha) obrigada por estarem ao meu lado (às vezes até em pensamento) nos melhores e piores momentos. Se eu pudesse colocava vocês em um potinho pra nunca mais nos separarmos (rsrsrsrs).*

*Às minhas baixinhas Carolzita, Danutinha e Elaine, sem as quais as sextas-feiras nunca seriam as mesmas “sexta-feira eu desço a ladeira, e vou curtir, curtir uma regueira, com bons amigos dançar me divertir... a vibração é positiva é verdadeira”.*

*Aos amigos queridos de infância Elcemir (cemireco), Leonam (Leo), Adriano (Dri), Bruno e Jeikson (João), os quais eu sempre procuro o ombro amigo nas situações difíceis. Adoro até as manias de vocês “Isso, isso, isso”.*

*Todos vocês são únicos. "Para você estar aqui agora trilhões de átomos de alguma forma se agruparam de uma maneira intrincada e intrigante para criar você. Este é um arranjo tão especializado e particular que nunca tinha sido tentado antes e irá existir somente uma vez. Para os próximos anos essas minúsculas partículas irão se engajar em bilhões de habilidades, cooperando esforços necessários para manter você intacto e levá-lo a viver o supremo, mas geralmente subapreciado estado conhecido como existência." (Bill Brison). **Desejo profundamente apreciar muitos outros momentos, felizes como este, ao lado de vocês.***

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	X
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA</b> .....	3
<b>1.2. APOPTOSE E QUALIDADE DO EMBRIÃO PRODUZIDO <i>IN VITRO</i></b> .....	4
<b>1.3. A MORTE CELULAR PROGRAMADA (MCP)</b> .....	6
<b>1.4. AÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES</b> .....	9
<b>1.5. OS EFEITOS ANTI-APOPTÓTICOS DA DEXAMETASONA</b> .....	12
<b>1.6. JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>1.7. OBJETIVOS</b> .....	15
<b>1.6.1. Objetivo Geral</b> .....	15
<b>1.6.2. Objetivos Específicos</b> .....	15
<b>1.8. HIPÓTESE</b> .....	15
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
<b>2.1. OBTENÇÃO DE OVÁRIOS E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS OÓCITOS</b> ..	16
<b>2.2. FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)</b> .....	17
<b>2.3. CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV)</b> .....	17
<b>2.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	18
<b>2.5. EXPERIMENTO 1. CORRELAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA         COM A OCORRÊNCIA DA APOPTOSE</b> .....	19
<b>2.6. EXPERIMENTO 2. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO         EMBRIONÁRIO</b> .....	24
<b>2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	26
<b>3. RESULTADOS</b> .....	27
<b>3.1. EXPERIMENTO 1. CORRELAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA         COM A OCORRÊNCIA DA APOPTOSE</b> .....	27

<b>3.2. EXPERIMENTO 2. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....</b>	<b>31</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1. EXPERIMENTO 1: CORRELAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA COM A OCORRÊNCIA DA APOPTOSE.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....</b>	<b>38</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Regulação da apoptose pelos membros da família Bcl-2 .....	7
<b>Figura 2:</b> Eventos celulares dos processos de apoptose e necrose .....	8
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de ação do cortisol na célula alvo .....	10
<b>Figura 4:</b> Metabolismos dos glicocorticóides na ovulação .....	11
<b>Figura 5:</b> Interação parácrina entre o oócito e as células da granulosa .....	13
<b>Figura 6:</b> Estereomicroscópio ( <b>A</b> ) e Microscópio de epifluorescência ( <b>B</b> ) .....	19
<b>Figura 7:</b> Embriões bovinos no quarto dia de cultivo <i>in vitro</i> .....	20
<b>Figura 8:</b> Embriões obtidos no quarto dia de cultivo <i>in vitro</i> classificados como RUINS, REGULARES E BONS .....	21
<b>Figura 9:</b> Embriões com diferentes números de células corados com Hoechst (cor azul), Anexina V (cor verde), e/ou iodeto de propídeo (cor vermelha) sob microscopia de epifluorescência .....	23
<b>Figura 10:</b> Embriões no sétimo dia de cultivo <i>in vitro</i> , sob luz comum (A, B, C, D) e sobre epifluorescência com coloração por Hoechst (A', B', C', D'), classificados como blastocisto inicial (A, A'), blastocisto (B, B'), blastocisto expandido (C, C') e blastocisto eclodido (D, D') .....	25
<b>Figura 11:</b> Classificação dos embriões em <b>Não Apoptóticos</b> (azul), <b>Apoptóticos</b> (roxo), e em <b>Necrose</b> (vermelho) nos diferentes grupos experimentais .....	29
<b>Figura 12:</b> Taxas de clivagem e formação de blastocisto ( $p > 0,05$ ) .....	30
<b>Tabela 1:</b> Grupos experimentais com presença ou ausência de DEX .....	18
<b>Tabela 2:</b> Classificação dos embriões no quarto dia de cultivo .....	27
<b>Tabela 3:</b> Ocorrência da apoptose nos diferentes grupos experimentais de acordo com a qualidade embrionária .....	28

<b>Tabela 4:</b> Cinética do desenvolvimento embrionário no sétimo dia de cultivo ( $p < 0,05$ ) .....	32
<b>Tabela 5:</b> Número total de células nos embriões dos diferentes grupos experimentais, no sétimo dia de cultivo .....	33

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH	Hormônio Adenocorticotrófico
BE	Blastocisto Eclodido
BI	Blastocisto Inicial
BL	Blastocisto
BX	Blastocisto Expandido
CCOs	Complexos <i>cumulus-oócitos</i>
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CTRL	Grupo Controle
DEX	Dexametasona
DEX CIV	Grupo com adição de DEX somente na etapa de cultivo
DEX M/C	Grupo com adição de DEX nas etapas de maturação e cultivo
DEX MIV	Grupo com adição de DEX somente na etapa de maturação
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
GCs	Glicocorticóides
MCI	Massa Celular Interna
MCP	Morte Celular Programada
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embrões
TUNEL	Hibridização terminal mediada por dUTP - deoxinucleotídeo transferase
11 $\beta$ HSD	Isoenzimas 11 $\beta$ -hidroxesteróide desidrogenase

## RESUMO

Neste trabalho, foi avaliada a ocorrência de apoptose em embriões bovinos produzidos com uso da Dexametasona (DEX) na maturação oocitária e no cultivo *in vitro* (CIV), sendo avaliado o efeito da DEX sobre a qualidade, cinética e desenvolvimento embrionário. Em cada repetição foram utilizados 160 oócitos, divididos em 2 placas, a primeira destinada à avaliação de Morte Celular Programada (MCP), no 4º dia de cultivo, e a segunda à avaliação da cinética, desenvolvimento embrionário e contagem do número total de blastômeros, no 7º dia de cultivo. Quando comparados os Grupos CTRL, DEX MIV, DEX CIV, e DEX M/C (sem adição de DEX, com DEX na Maturação, no Cultivo, na Maturação e no Cultivo, respectivamente) não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as taxas de clivagem, 86,9%, 79,3%, 77,6% e 69,6%, respectivamente, de blastocisto, 42,6%, 30,5%, 36,4% e 29,6%, respectivamente e número total de células,  $104 \pm 54$ ,  $84 \pm 32$ ,  $94 \pm 36$  e  $94 \pm 32$ , respectivamente. Nos grupos de DEX CIV e DEX M/C houve predomínio de embriões em estágio de blastocisto inicial e blastocisto, 70,4% e 51,3%, respectivamente ( $p < 0,05$ ). De acordo com o número de células, a presença ou não de fragmentação citoplasmática e a ocorrência de MCP em pelo menos 1 célula, os embriões foram classificados em RUINS, MÉDIOS, e BONS. Observou-se que o grupo DEX CIV rendeu maior percentual de embriões BONS (64,3%) em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), no entanto a ocorrência da apoptose nesses embriões não diferiu do controle ( $p > 0,05$ ). A DEX na MIV aumentou e a DEX na MIV e CIV reduziu a ocorrência de apoptose entre os embriões BONS (75 e 0%, respectivamente, com  $p < 0,05$ ). Conclui-se que o uso da DEX na MIV e/ou no CIV não afeta a taxa e a qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, porém o uso da DEX no CIV pode sincronizar a cinética do desenvolvimento embrionário sem interferir na ocorrência da apoptose nos mesmos.

## 1. INTRODUÇÃO

A agropecuária é umas das atividades mais representativas da economia nacional, com o Brasil apresentando o segundo maior rebanho comercial bovino do mundo, com 205.9 milhões de cabeças, em 2008 (PORTAL DO MAPA). Em especial a indústria da pecuária de corte tem se destacado como um dos setores mais rentáveis. Em 2007, a exportação de carne superou R\$ 13,5 bilhões, deste total, somente a carne bovina representou 44% do valor exportado, ou seja, R\$ 5,4 bilhões.

Dada a importância da espécie bovina para a geração de riqueza no país, tornou-se essencial a utilização das biotécnicas da reprodução em prol do crescimento e do melhoramento genético dos rebanhos. Das biotécnicas atualmente disponíveis as que mais têm contribuído para o melhoramento e crescimento dos rebanhos têm sido a Inseminação Artificial, a Transferência de Embriões, e a Produção *In Vitro* de Embrões (PIVE).

Destas, a PIVE é a que permite maior aproveitamento da eficiência reprodutiva do animal, pois é possível obter de 50-100 embriões/fêmea/ano (VARAGO *et al.*, 2008), por isso a PIVE, atualmente, é uma biotécnica em processo de acelerada difusão na pecuária brasileira, com estimativa de 204.029 embriões produzidos *in vitro* e transferidos no Brasil somente no ano de 2008 (REVISTA DA SBTE, 2009).

Embora tenha sido aprimorada nas últimas décadas (VARAGO *et al.*, 2008) são necessários mais estudos para o aumento da eficiência e qualidade da técnica de PIVE, visto que os embriões produzidos *in vitro* são de qualidade inferior, quando comparados aos embriões *in vivo* (RIZOS *et al.*, 2002a). Isto está relacionado às condições sub-ótimas de cultivo, e assim esforços tem sido aplicados no desenvolvimento de meios de cultivo e suplementação dos meios já existentes (GARDNER & LANE, 1998; THOMPSON, 2000; MINGOTI, 2005).

Nesse contexto, a ocorrência de apoptose tem sido largamente utilizada como um parâmetro para a avaliação da qualidade de embriões cultivados *in vitro* e de diferentes substâncias utilizadas como suplementos nos meios de cultivo (FEUGANG *et al.*, 2004; KOLLE *et al.* 2002; MAKAREVICH & MARKKULA, 2002; YANG *et al.*, 1998).

Como estudos anteriores (SASSON *et al.*, 2001; SASSON *et al.*, 2002; SASSON & AMSTERDAM, 2002) tem demonstrado que o uso de glicocorticóides tem influência positiva diminuindo a ocorrência de apoptose, e melhorando a organização do citoesqueleto e comunicação intercelular, mediada por caderinas e junções do tipo Gap, em células da granulosa. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da suplementação dos meios de cultivo utilizados na PIVE com Dexametasona, um glicocorticóide sintético, sobre a ocorrência de apoptose em embriões bovinos produzidos *in vitro* de maneira a melhorar a eficiência da técnica e qualidade dos embriões produzidos.

## 1.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA

Sabe-se que os embriões produzidos *in vitro* são de qualidade inferior, quando comparados aos embriões *in vivo*, de forma que algumas características morfológicas têm sido associadas à menor competência de desenvolvimento do embrião produzido *in vitro* como: elevado conteúdo lipídico (EL RAZEK *et al.*, 2000), diferenças metabólicas (KHURANA & NIEMANN, 2000), alta incidência de anormalidades cromossômicas (LONERGAN *et al.*, 2004), assim como divisão celular atrasada ou anormal (VAN SOOM *et al.*, 1997; LONERGAN *et al.*, 2000), freqüentemente acompanhada por fragmentação celular e bloqueio do desenvolvimento antes do estágio de blastocisto (TROUSON & BONGSO, 1996).

Essas características podem ser influenciadas pela constituição dos meios e condições do ambiente de cultivo embrionário (temperatura, atmosfera gasosa, número de embriões cultivados) principalmente nas etapas críticas do período pré-implantacional: as primeiras clivagens, a ativação genômica embrionária, a compactação da mórula, e a formação do blastocisto (LONERGAN *et al.*, 2006).

A caracterização morfológica tem sido o método preferencial de avaliação da qualidade, pois não é invasivo, dessa forma preservando a integridade do embrião. É baseada em critérios como a cor e compactação dos blastômeros, cinética de desenvolvimento, diâmetro do embrião (VAN SOOM *et al.*, 2003), e a morfologia pró-nuclear, usada para prever a constituição cromossômica (BALABAN, 2004).

Ao lado da caracterização morfológica a aplicação de técnicas de biologia molecular também tem sido um importante meio de estudo da qualidade do embrião no período pré-implantacional (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000). Revelando diferenças de expressão gênica e protéica, em embriões produzidos *in vitro*, de genes envolvidos no metabolismo, na compactação celular, na apoptose, e no desenvolvimento embrionário, como por exemplo, o transportador de glicose-1 (WAGSTAFF *et al.*, 1995), a conexina 43 (WRENZYCKI *et al.*, 1996), o Bax (RIZOS *et al.*, 2002b), e o Oct-4 (DONNISON & PFEFFER, 2004), respectivamente.

## 1.2. APOPTOSE E QUALIDADE DO EMBRIÃO PRODUZIDO *IN VITRO*.

Desde a década de 70 tem-se descrito a ocorrência de células apoptóticas em embriões de muitas espécies de mamíferos incluindo camundongos (COPP, 1978), bovinos, babuínos, macaco *reshus* e humanos (HARDY *et al.*, 1999; MOHR & TROUNSON, 1982), indicando que a apoptose tem papel importante no desenvolvimento embrionário, estando envolvida, por exemplo, na eliminação de células anormais (HARDY *et al.*, 2003). No entanto quando ativada de forma aberrante pode ser prejudicial à sobrevivência do embrião (HARDY *et al.*, 1999).

A apoptose não é um evento que se restringe aos embriões produzidos *in vitro*, contudo, durante o cultivo *in vitro* a apoptose é provavelmente causada por condições sub-ótimas de cultivo e tem sido descrita em embriões de humanos (HARDY, 1999), camundongos (BYRNE *et al.*, 1999), bovinos (MATWEE *et al.*, 2000), equinos (MOUSSA e al., 2004), ovinos (RIZOS *et al.*, 2002a) e suínos (KIDSON *et al.*, 2004). Por esta razão, a detecção de ocorrência de apoptose tem sido usada para avaliar a qualidade do embrião produzido *in vitro*.

A exposição à luz e ao estresse oxidativo, por exemplo, pode causar graves danos ao DNA, condições à que os embriões produzidos *in vitro* estão mais suscetíveis do que embriões *in vivo* (TAKAHASHI *et al.*, 1999). Yang *et al.* (1998) observaram a relação direta entre a ocorrência de apoptose e maior concentração de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) dentro de embriões humanos, no segundo dia de cultivo. Foi relatado também que a concentração de ROS era significativamente maior em embriões com fragmentação citoplasmática em relação aos embriões sem fragmentação, nos quais não foi verificada ocorrência de células apoptóticas por técnica de TUNEL (Hibridização terminal mediada por dUTP – deoxinucleotídeo transferase). Feugang *et al.* (1999) observaram que a adição de  $\beta$ -mercaptoetanol, substância antioxidante que aumenta produção de glutathione, ao meio de cultivo *in vitro* diminuiu a ocorrência de apoptose e aumentou a taxa de eclosão e o índice de Massa Celular Interna (MCI) dos blastocistos.

A ocorrência de apoptose, além de estar diretamente relacionada às condições de cultivo, pode estar relacionada também ao estágio do desenvolvimento embrionário. Matwee *et al.*, (2000) e Gjorret *et al.* (2003b) ao analisarem a ocorrência de apoptose em embriões bovinos desde as primeiras clivagens até o estágio de blastocisto

observaram maior ocorrência de apoptose durante e após o período de ativação genômica, estágio de 8 células, indicando que a apoptose poderia estar sendo sinalizada pela supressão de genes nesses embriões.

A relação entre morfologia e apoptose e estágio do desenvolvimento é uma questão ainda muito discutida (ANTCZAK & VAN BLERKOM, 1999; JURISICOVA *et al.*, 1996; JURISICOVA & ACTON, 2004). Jurisicova *et al.* (1996) avaliaram embriões humanos em estágio de 2 células que apresentavam fragmentação citoplasmática, que é uma característica estreitamente relacionada a apoptose, embora a sua etiologia não seja clara, e verificaram que 75% tinham núcleo positivo para TUNEL. Posteriormente Antczak & Van Blerkom (1999) ao analisarem embriões humanos, em estágio de 2 a 8 células, com vários graus de fragmentação não detectaram marcação positiva para anexina nem para iodeto de propídio.

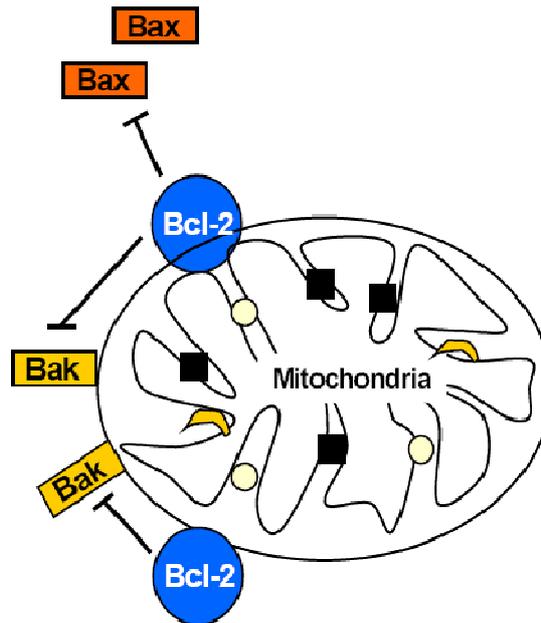
Na PIVE ocorre apoptose tanto em embriões quanto em células do *cumulus oophorus*, influenciando negativamente a competência de desenvolvimento dos oócitos durante a Maturação *in vitro* (IKEDA *et al.*, 2003). Assim, a apoptose em células do *cumulus* também tem sido citada como um importante indicador da competência do oócito e, por conseguinte, da qualidade do embrião produzido *in vitro* (LEE *et al.*, 2001; YUAN *et al.*, 2005).

### 1.3. A MORTE CELULAR PROGRAMADA (MCP).

A apoptose, um tipo de morte celular programada (MCP), é um processo que está envolvido no desenvolvimento, diferenciação, proliferação, homeostase, e remoção de células defeituosas (LEIST & JAATTELA, 2001). A apoptose é importante, por exemplo: para a eliminação de grande número de linfócitos auto-reativos durante os eventos de rearranjo genético na formação dos receptores de antígeno, dessa forma, somente as células imune funcionais são selecionadas, ao mesmo tempo esse mecanismo mantém a população de linfócitos relativamente constante (RATHMELL & THOMPSON, 2002); para a seleção de folículos dominantes contribuindo, assim, na manutenção da homeostase ovariana (HURWITZ & ADASHI, 1992; TILLY *et al.*, 1991); e no desenvolvimento embrionário de roedores, em que a apoptose é essencial para a formação da cavidade amniótica (COUCOUVANIS & MARTIN, 1995).

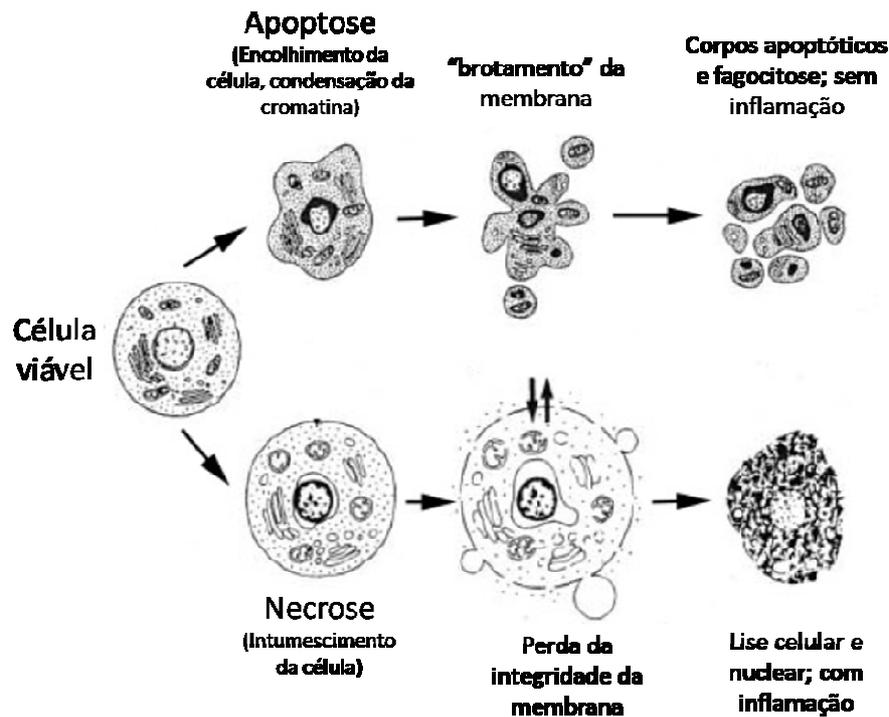
A apoptose é um evento complexo, que pode ser desencadeado por estímulos, dentro ou fora da célula, capazes de ativar uma cascata de moléculas efetoras. A via extrínseca é desencadeada por estímulos externos à célula (TNF $\alpha$ , irradiação, drogas), e a via intrínseca é desencadeada por estímulos internos (dano ao DNA, estresse oxidativo). Ambas levando à ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, de caspases, e oncogenes como o p53 (GEWIES, 2003).

O controle da apoptose é intrincado e ocorre pelo equilíbrio entre os membros da família Bcl-2; pela ativação de fatores transcricionais de sobrevivência celular, como o NF-kB e Mdm2, e regulação de quinases Akt/PKB (KARIN & LIN, 2002; MAYO & DONNER, 2002). Os membros anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Bcl-XL, Bcl-w, A1, e Mcl-1) são capazes de bloquear a ativação de membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, e Bok), dessa forma, inibindo os eventos apoptóticos que por eles seriam desencadeados na mitocôndria (Figura 1), como a liberação de citocromo-c e ERO (SKOMMER *et al.*, 2007).



**Figura 1:** Regulação da apoptose pelos membros da família Bcl-2. Em uma célula viável os membros anti-apoptóticos, Bcl-2, bloqueiam a ativação de membros pró-apoptóticos, Bax e Bak, evitando que estes últimos ativem a liberação de citocromo-c e ROS pela mitocôndria, o que, por sua vez, desencadearia uma cascata de eventos da apoptose. Adaptado de Gewies, 2003.

A célula em apoptose apresenta características morfológicas bem definidas, ilustradas na Figura 2, como deformação e perda de contato com as células vizinhas, cromatina condensada e marginal a membrana nuclear e membrana plasmática danificada. Por fim, a célula fragmenta-se em vesículas encapsuladas chamadas corpos apoptóticos que contêm restos de citosol, cromatina condensada e organelas. Os corpos apoptóticos são absorvidos fagocitados por macrófagos e removidos do tecido sem causar resposta inflamatória (GEWIES, 2003). Na necrose, por sua vez, a membrana é rompida em decorrência de uma injúria e o conteúdo celular é liberado desordenadamente causando danos às células vizinhas e resposta inflamatória no tecido circundante (MAJNO & JORIS, 1995).



**Figura 2:** Eventos celulares dos processos de apoptose e necrose. Apoptose inclui “encolhimento” da célula, condensação da cromatina, com posterior “brotamento” da membrana e formação de corpos apoptóticos que são fagocitados sem causar inflamação. A célula em necrose sofre intumescimento, com perda de integridade da membrana, com posterior lise celular causando inflamação. Adaptado de Gewies, 2003.

Baseando-se nas características morfológicas e bioquímicas de células apoptóticas existe grande número de protocolos de detecção da apoptose. A coloração por hematoxilina e eosina (CAGNOTO *et al.*, 2009), método de COMETA (TAKAHASHI *et al.*, 1999) e detecção da atividade de caspases e proteínas relacionada a apoptose (ALEXANDRE *et al.*, 2000). Os métodos mais utilizados para detecção da apoptose em embriões pré-implantacionais são o TUNEL e Anexina-V/iodeto de propídio (LEVY *et al.*, 1998).

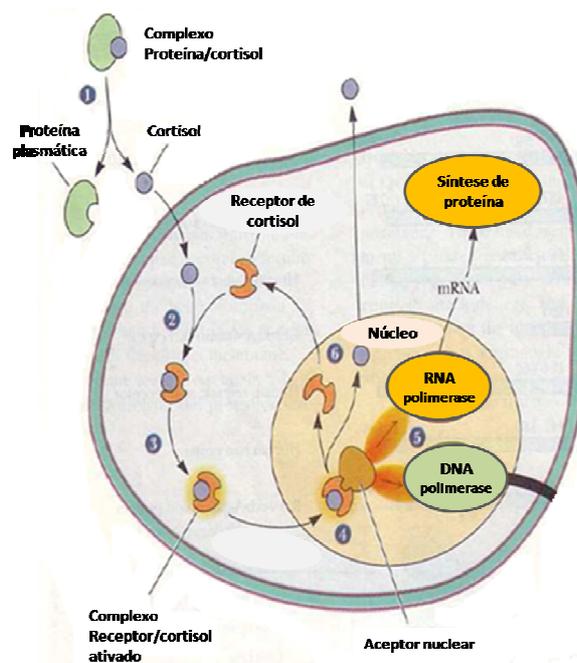
O TUNEL é fundamentado na detecção da fragmentação do DNA nuclear, assim como a maioria das técnicas citadas anteriormente, este é um evento característico da apoptose tardia. E a técnica de Anexina-V é fundamentada na afinidade desta molécula pela fosfatidilserina, fosfolípido de membrana plasmática. Na célula em apoptose inicial a fosfatidilserina geralmente intracelular é exposta na superfície em

função de danos à membrana celular. Quando a apoptose é tardia ocorre fragmentação do DNA nuclear com exposição da extremidade 3', a qual o iodeto de propídeo se intercala. Dessa forma, a Anexina-V/iodeto além de detectar a fragmentação do DNA também detecta a exposição extracelular da fosfatidilserina (ORMED *et. al.*, 1993).

#### 1.4. AÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES.

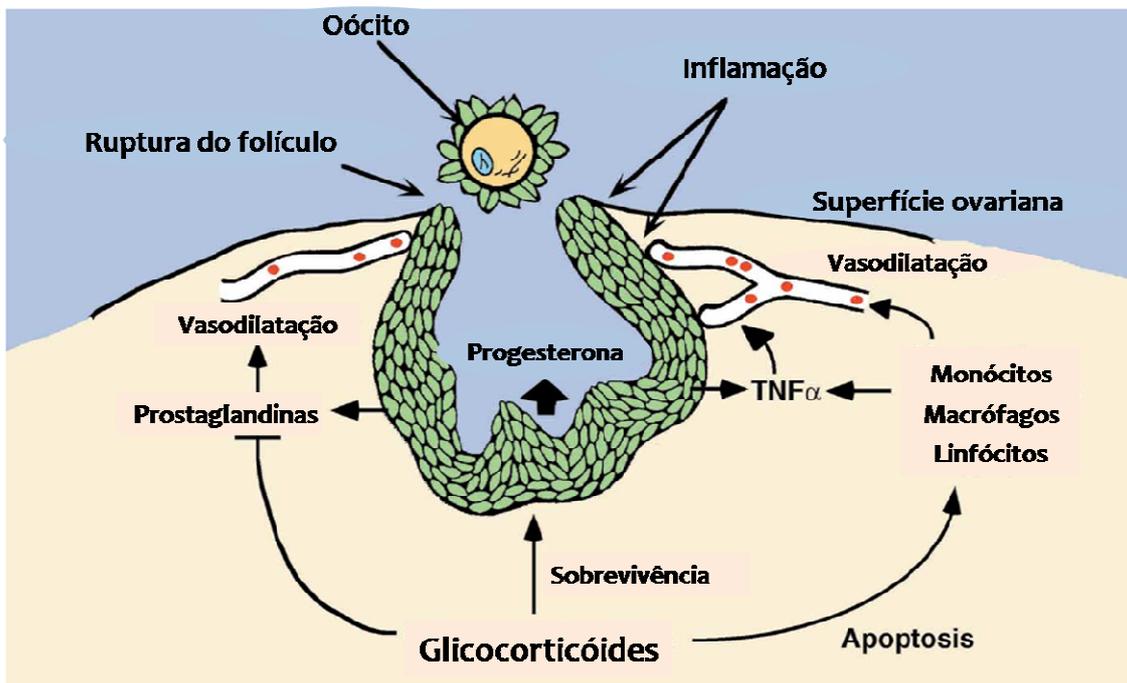
Os glicocorticóides (GCs) são sintetizados na zona fasciculata do córtex da adrenal, em resposta ao hormônio adenocorticotrófico (ACTH) quando os níveis de glicose no plasma estão baixos. O aumento da concentração de ACTH e cortisol no plasma sanguíneo são considerados sinais clássicos de estresse animal, pois os GCs aumentam a aptidão para mobilização de energia e possível mudança comportamental promovendo uma série de alterações no metabolismo energético como o aumento da gliconeogênese no fígado, e degradação protéica nos músculos esqueléticos (DONIN *et al.*, 2007).

O cortisol e a corticosterona são os GCs fisiológicos derivados do colesterol e pertencem à classe de hormônios esteróides. Essa classe de hormônios é transportada na corrente sanguínea ligada a proteínas plasmáticas e ao chegarem à célula alvo ligam-se a receptores citoplasmáticos e ativam receptores nucleares, formando complexos receptor-esteróide/DNA os quais estimulam ou inibem a transcrição gênica (SPINOZA *et al.*, 2002). Dessa forma, exercem ações metabólicas, reguladoras e imunossupressoras, muitas delas relacionadas à fertilidade (Figura 3).



**Figura 3:** Mecanismo de ação do cortisol na célula alvo. O cortisol, hormônio lipossolúvel, é transportado na corrente sanguínea ligado a uma proteína plasmática (1). Na célula alvo atravessa a membrana (2) e forma complexos ativados receptor citoplasmático/cortisol (3). No núcleo da célula ativa aceptores nucleares formando complexos receptores/cortisol/DNA (4). Os quais ativam ou silenciam a transcrição gênica, e em seguida a tradução e síntese protéica (5).

O metabolismo dos GCs é modulado pelas isoenzimas  $11\beta$ HSD ( $11\beta$ -hidroxesteróide desidrogenase) que convertem cortisol a cortisona e vice-versa, influenciando os processos de luteinização, ovulação e oogênese (MICHAEL *et al.*, 2003). O processo de ovulação é um evento inflamatório controlado, promovido por elementos pró-inflamatórios (citocinas, prostaglandinas e  $TNF\alpha$ ), em que primeiro ocorre a degeneração da parede do folículo e superfície ovariana, que culmina na liberação do ócito maduro (AMSTERDAM & SASSON, 2002). Em seguida na resposta anti-inflamatória à ruptura da parede folicular ocorre o aumento da expressão de  $11\beta$ HSD, levando a maior produção de cortisol. O cortisol age sinergicamente a gonadotropinas para o aumento da produção de progesterona, dessa forma, estimulando a esteroidogênese pós-ovulatória e inibindo a apoptose em células da granulosa (Figura 4). Assim ocorre a reparação do epitélio e preparo para a próxima seqüência ovulatória (AMSTERDAM *et al.*, 1998).



**Figura 4:** Metabolismos dos glicocorticóides na ovulação. A cascata pró-inflamatória que promove a degeneração da parede folicular e superfície ovariana, com liberação de citocinas, prostaglandinas e TNF $\alpha$ , aumenta a migração de células de defesa e fagocitárias da corrente sanguínea até o folículo. Em resposta à ruptura da parede ocorre aumento da produção de glicocorticóides que promovem a resposta anti-inflamatória por induzir a apoptose das células sanguíneas, sobrevivência das células da granulosa e incremento da produção de progesterona. Adaptada de Amsterdam & Sasson, 2002.

Dessa forma, o uso de GCs na PIVE tem sido indiretamente associado à maturação oocitária. Foi verificado que a concentração de cortisol, e taxa de conversão de cortisol em cortisona era significativamente maior no líquido folicular de folículos pré-ovulatórios comparados a folículos imaturos da espécie humana (HARLOW *et al.*, 1997; YONG *et al.*, 2000), sugerindo correlação positiva entre a concentração de cortisol local e a maturação oocitária.

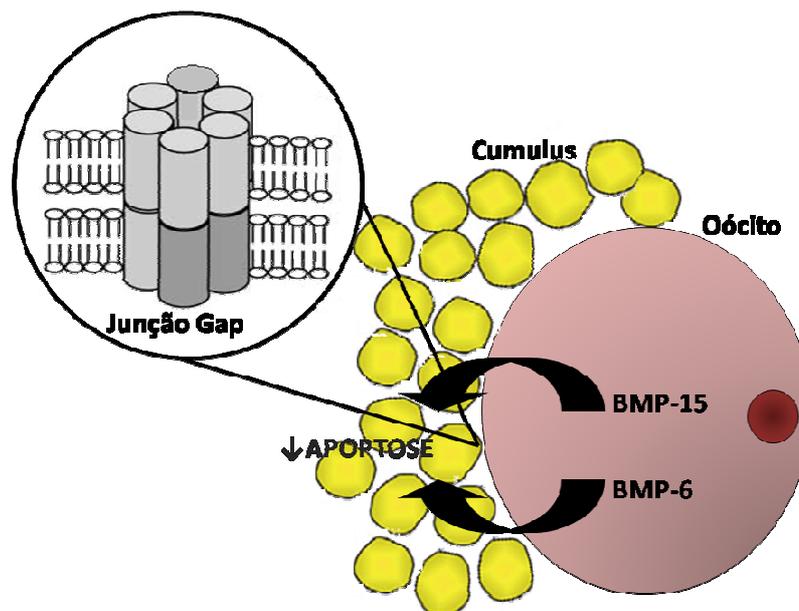
Os GCs são conhecidos por suas ações anti-inflamatórias e depressivas sobre o sistema imune e liberação de citocinas (AUPHAN *et al.*, 1995). Por esta razão são capazes de induzir apoptose em diversos tipos celulares, principalmente, os

pertencentes a linhagem de células hematopoéticas como timócitos (SIKORA *et al.*, 1996), linfócitos T (ANDREAU *et al.*, 1998) e B (PRUSKY *et al.*, 1997) e células cancerígenas (CHAUHAN *et al.*, 1997; MIYOSHI *et al.*, 1997). Por outro lado, apresentam efeitos anti-apoptóticos em outros tipos celulares como células da granulosa de humanos (SASSON *et al.*, 2001), células epiteliais glomerulares de bovinos (MEBMER *et al.*, 1999b) e células da glândula mamária de camundongo (FENG *et al.*, 1995). Dessa forma, dependendo do tipo celular podem exercer ações diversas.

#### 1.5. OS EFEITOS ANTI-APOPTÓTICOS DA DEXAMETASONA.

A Dexametasona (DEX) é um GC sintético que se liga ao receptor de cortisol. Os efeitos anti-apoptóticos da DEX foram primeiramente descritos por Mebmer *et al.* (1999a) em células epiteliais glomerulares de bovinos, a partir daí outros estudos realizados comprovaram que os efeitos anti-apoptóticos da droga são promovidos pela supressão de vias apoptóticas induzidas por TNF $\alpha$  (SASSON *et al.*, 2002), pela ativação do gene supressor tumoral p53 (SASSON *et al.*, 2001) e ainda por meio da modulação de fatores de sobrevivência, como o BCL-2 e NF $\kappa$ B (SASSON & AMSTERDAM, 2002). E ao mesmo tempo pela regulação de vias de sobrevivência celular pela AKT-quinase (WESTFALL *et al.*, 2000) e MAPK (SARKER *et al.*, 2002).

Além de suprimir vias apoptóticas e modular fatores de sobrevivência foi demonstrada a influência positiva da DEX sobre a transcrição de junções de adesão e junções do tipo Gap, bem como a organização do citoesqueleto em células da granulosa de bovinos (SASSON *et al.*, 2003). Sabe-se que a interação entre oócito-célula somática via junções do tipo Gap, ilustrada na figura 5, é essencial para o crescimento do oócito, maturação citoplasmática, comunicação intercelular, e inclusive para a liberação de fatores como o GDF-9 e BMP (Proteínas morfogenéticas dos ossos) que tem ação anti-apoptótica sobre as células da granulosa (HUSSEIN *et al.*, 2005).



**Figura 5:** Interação parácrina entre o oócito e as células da granulosa. O oócito secreta fatores de crescimento BMP que chegam às células da granulosa, através de estruturas de comunicação intercelular, junções gap, sobre as quais exercem ação anti-apoptótica.

Vários estudos têm relatado a importância da interação com a matriz extracelular ou com outras células, mediada por caderinas e junções do tipo Gap, para a ativação de vias de sobrevivência celular, e conseqüente proteção contra a apoptose (PELUSO *et al.*, 2001; SASSON & AMSTERDAM, 2002).

Junções do tipo Gap ocorrem em locais de próxima aposição celular, permitindo a passagem de íons orgânicos, segundo mensageiros e metabólitos de uma célula para outra (BRUZZONE & GOODENOUGH, 1996). São compostas por proteínas denominadas Conexinas, que são diferencialmente expressas ao longo do desenvolvimento de embriões pré-implantacionais (HOUGHTON *et al.*, 2002), período em que são essenciais para os fenômenos de crescimento, compactação e diferenciação celular (WRENZYCK *et al.*, 1996).

Os embriões oriundos de PIVE apresentam fraca compactação, no estágio de mórula, em relação aqueles produzidos *in vivo* (NIEMAN & WRENZYCKI, 2000). Ao analisar os perfis de expressão gênica foi observado que *in vitro*, a Conexina 43 (Cx43) era expressa em oócitos e embriões em estágio de mórula, mas não em estágio de blastocisto, enquanto, *in vivo*, os transcritos de Cx43 eram detectados em estágio de

mórula e blastocisto (WRENZYCKI *et al.*, 1996). Posteriormente, Lonergan *et al.* (2003) verificaram aumento significativo da expressão de Cx43 em embriões bovinos, cultivados *in vivo*, a partir de 16 células até estágio de blastocistos.

A fraca compactação pode ser um dos fatores que possivelmente contribuem para a elevada ocorrência de apoptose entre blastocistos de embriões produzidos *in vitro*. Entretanto são poucos os trabalhos que abordam o uso de GCs e a incidência de apoptose durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

#### 1.6. JUSTIFICATIVA

Considerando: 1) A relação da apoptose com a degeneração dos embriões durante o Cultivo *in vitro*; 2) os efeitos anti-apoptóticos da DEX pela regulação de vias de sobrevivência celular e supressão de outras vias apoptóticas; 3) a influência positiva da DEX na organização do citoesqueleto e na comunicação intercelular. Torna-se relevante verificar a relação do uso deste glicocorticóide em diferentes etapas da PIVE de bovinos (na maturação oocitária e cultivo embrionário) com a incidência de apoptose nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário.

## 1.7. OBJETIVOS.

### 1.6.1. Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da Dexametasona na maturação oocitária e no cultivo *in vitro* de embriões bovinos em relação a ocorrência de apoptose no desenvolvimento embrionário.

### 1.6.2. Objetivos específicos

- Correlacionar morfologia e qualidade embrionária, no quarto dia de cultivo, com a ocorrência de apoptose em embriões produzidos *in vitro*.

- Avaliar o efeito da Dexametasona sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos mediante o número total de células, a análise das taxas de clivagem (2º dia de cultivo), e da cinética do desenvolvimento (7º dia de cultivo);

## 1.8. HIPÓTESE.

O uso da Dexametasona poderá melhorar a qualidade do embrião produzido *in vitro* através da diminuição da ocorrência da apoptose.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS.

### 2.1. OBTENÇÃO DE OVÁRIOS E MATURAÇÃO *IN VITRO* DOS OÓCITOS.

Ovários bovinos de fêmeas azebuadas foram obtidos em matadouro frigorífico SOCIPE, localizado na estrada do Tapanã. Os ovários foram lavados com solução PBS, acondicionados em frasco estéril com solução salina de NaCl a 0,9% e transportados, a temperatura ambiente, para o Laboratório de Fecundação *In Vitro* da UFPA em um período máximo de 3 horas.

No laboratório, os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, com auxílio de uma agulha 40 x 12 e seringa de 10 mL, selecionados em meio H-199 (meio TCM-199 com tampão HEPES, suplementado com 11 mg/mL de piruvato, 50 µg/mL de penicilina e 10% de soro fetal bovino- SFB), sob lupa estéreo-microscópica (Olympus S240) em capela de fluxo laminar estéril.

Os CCOs compactos com no mínimo três camadas de células, ooplasma homogêneo, com coloração marrom e circunferência regular (LEIBFRIED & FIRST, 1979), foram incubados em microgotas de 100 µL de meio de MIV (TCM-199 com bicarbonato, suplementado com 10% de SFB, 11 mg/mL de piruvato, 50 µg/mL de penicilina, 0,5 µg/mL de PMSG, e 5,0 µg/mL de hCG) na presença ou ausência de DEX, por 18 a 21 horas sob óleo mineral estéril e temperatura de 38,5°C em ar.

## 2.2. FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV).

Para a FIV, o sêmen de um único touro (*Bos taurus taurus*) foi descongelado a 37,0°C por 30 segundos e depositado, cuidadosamente, sobre um gradiente descontínuo de Percoll (45/90%), centrifugado a 200 g, por 7 minutos para separação dos espermatozóides viáveis. Após centrifugação, o sobrenadante contendo crioprotetor e espermatozóides imóveis foi descartado e o *pellet*, contendo os espermatozóides viáveis, submetido a uma nova centrifugação a 200 g por 3 minutos, em 2 mL de meio TALP- FERT. Em seguida, a concentração espermática foi ajustada para  $2 \times 10^6$  espermatozóides/mL e, 18 a 20 horas após o início da MIV, os CCOs foram fertilizados em microgotas de 80 µL de meio de FIV (meio SOF suplementado com heparina, penicilamina, hipotaurina, epinefrina e albumina sérica bovina- BSA), sob óleo mineral estéril e temperatura de 38,5°C em ar.

## 2.3. CULTIVO *IN VITRO* (CIV).

Após 27 a 30 horas de fecundação, os prováveis zigotos foram submetidos à pipetagens sucessivas para retirada das células do *cumulus oophorus* restantes e espermatozóides aderidos à zona pelúcida e, então, transferidos para microgotas (100 µL) de meio SOF (TERVIT *et al.*, 1972), suplementado com 30 mg/mL de BSA, 50 µg/mL de penicilina, e 10% de SFB, segundo modificações de Holm *et al.* (1999), na presença ou ausência de DEX .

Para dar suporte ao desenvolvimento embrionário foi realizado um sistema de co-cultivo dos embriões com monocamada de células da granulosa mediante a substituição do meio de MIV das microgotas pelo meio SOF.

#### 2.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.

A concentração de DEX adotada neste trabalho, 0,1µg/mL, foi baseada nos resultados obtidos por Carvalho (2009). Para a obtenção dos embriões foram realizadas 5 repetições. Em cada repetição foram utilizados 160 oócitos, divididos em 2 placas, a primeira destinada para avaliação de apoptose no quarto dia de cultivo (Experimento 1), e a segunda para a avaliação da cinética, desenvolvimento embrionário e contagem do número total de blastômeros no sétimo dia de cultivo (Experimento 2). Cada placa continha 80 oócitos divididos de forma aleatória e proporcional entre os quatro grupos experimentais, ilustrados na tabela 1: grupo Controle (sem adição de DEX); grupo DEX MIV (com adição de DEX somente na etapa de maturação oocitária); grupo DEX CIV (com adição de DEX somente na etapa de cultivo *in vitro*); e grupo DEX M/C (com adição de DEX nas etapas de maturação e cultivo *in vitro*).

**Tabela 1:** Grupos experimentais com presença ou ausência de DEX.

Grupos	DEX na MIV	DEX na CIV
CTRL	-	-
DEX MIV	+	-
DEX CIV	-	+
DEX M/C	+	+

CTRL: Controle, sem adição de DEX;

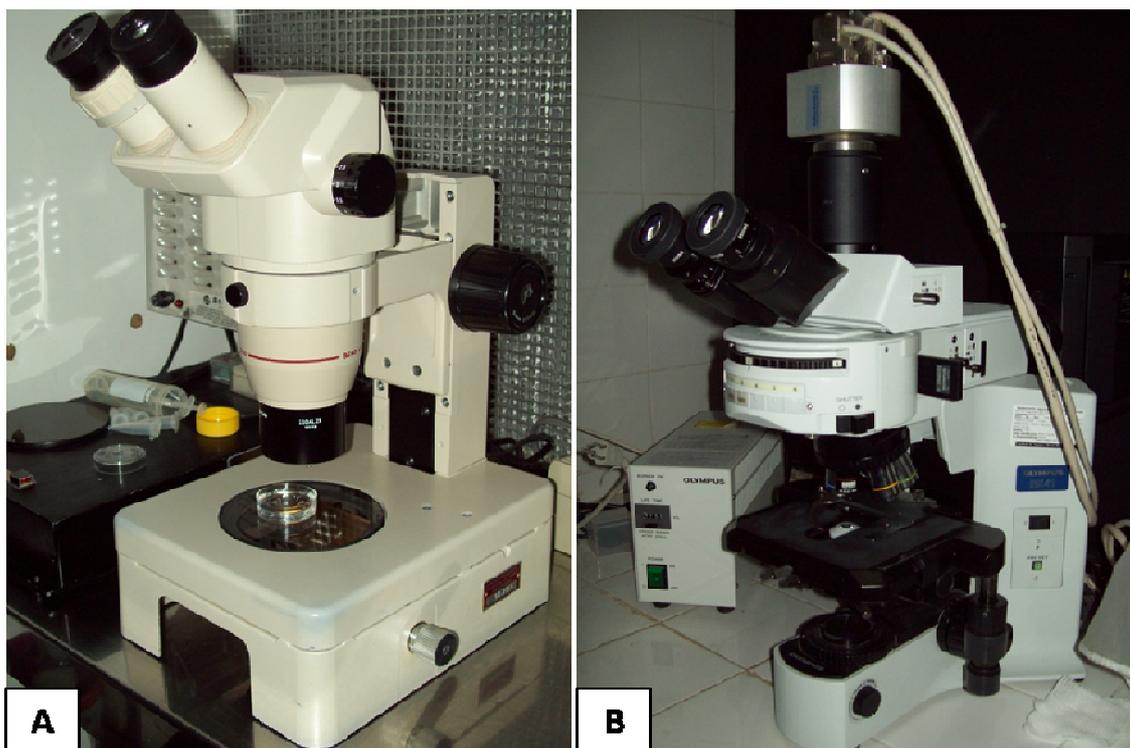
DEX MIV: Adição de DEX somente na etapa de maturação;

DEX CIV: Adição de DEX somente na etapa de cultivo;

DEX M/C: Adição de DEX nas etapas de maturação e cultivo;

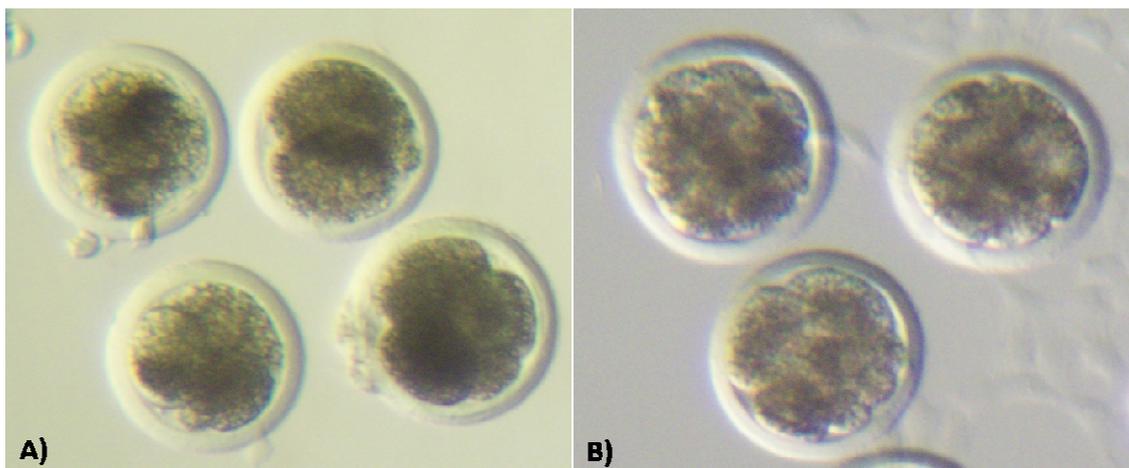
## 2.5. EXPERIMENTO 1. CORRELAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA COM A OCORRÊNCIA DA APOPTOSE.

Para avaliação da qualidade, no quarto dia de cultivo, os embriões foram classificados morfológicamente com auxílio de estereomicroscópio ilustrado na figura 6<sup>a</sup> (Olympus S240), segundo o número total de células. Em seguida foi feita a avaliação da apoptose, realizada por meio da técnica de marcação com Anexina V e iodeto de propídeo (Molecular Probes, Inc.; Eugene, OR, USA), e visualização por microscopia de epifluorescência ilustrado na figura 6B (Olympus BX41). Posteriormente, os embriões foram reclassificados segundo a presença de fragmentação citoplasmática, além do número total de células, em três categorias de qualidade: RUIM, REGULAR e BOM. Por fim, foi avaliada a ocorrência de apoptose nos grupos experimentais, e nas categorias de qualidade dentro de cada grupo experimental.



**Figura 6:** Estereomicroscópio (A) e Microscópio de epifluorescência (B).

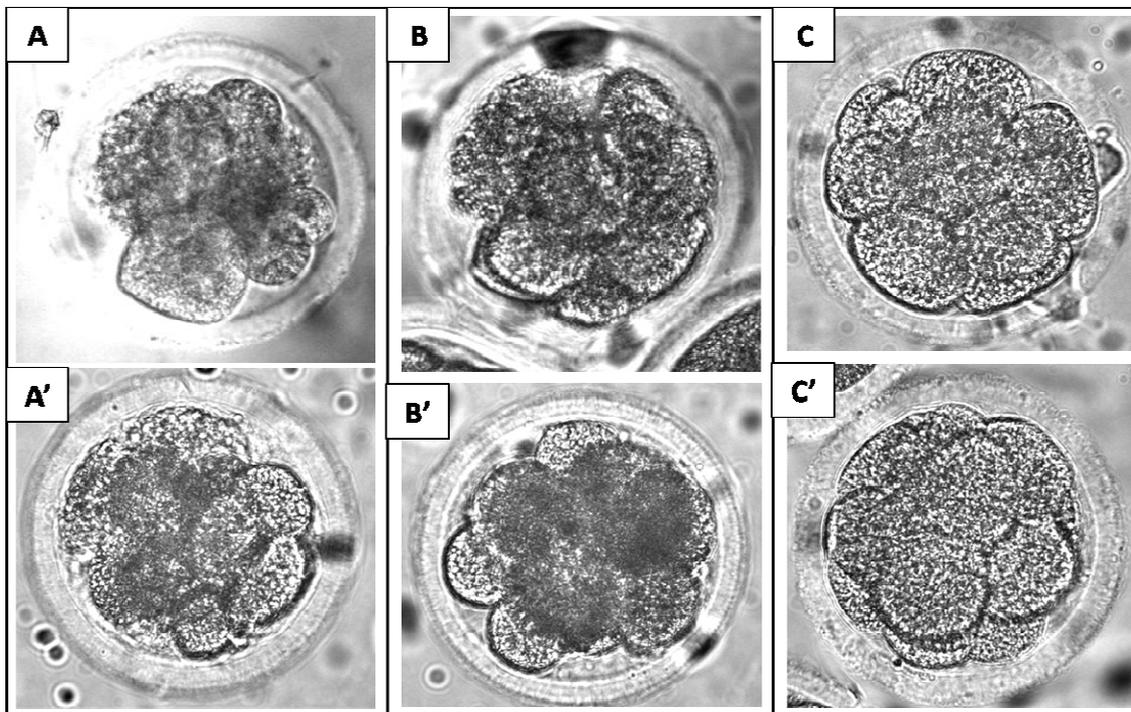
Os embriões apresentando número de células menor e maior que sete, foram classificados como sendo de desenvolvimento “lento” (Figura 7A) e “rápido” (Figura 7B), respectivamente. Após a classificação os embriões foram lavados em tampão de ligação 1X gelado (200  $\mu$ L do tampão de Ligação 5X em 800  $\mu$ L de água deionizada), e colocados em solução com Anexina V (1,25  $\mu$ L de Anexina V e 20  $\mu$ L de reagente de ligação em 500  $\mu$ L do tampão de ligação 1X) a 4°C durante 15 minutos. Os embriões foram novamente lavados em tampão de ligação 1X, e transferidos para solução com iodeto de propídeo (10  $\mu$ L de iodeto de propídeo em 500  $\mu$ L do tampão de ligação 1X) com adição de fluorocromo hoechst (10  $\mu$ g/mL) a 4°C por 15 minutos. Após a última lavagem em tampão de ligação 1X os embriões de desenvolvimento lento e rápido foram, separadamente, montados entre lâmina e lamínula e avaliados sob microscopia de epifluorescência.



**Figura 7:** Imagens de embriões bovinos no quarto dia de cultivo *in vitro*, obtidas na lupa estéreo-microscópica, apresentando desenvolvimento “lento” (A) e “rápido” (B).

Com o auxílio do microscópio de epifluorescência os embriões foram classificados em três categorias de qualidade, a saber: RUINS, REGULARES e BONNS. Para tanto, foram consideradas as seguintes características morfológicas: número de células e presença de fragmentação citoplasmática. Foram considerados RUINS aqueles que apresentavam número de células inferior a 7 e fragmentação citoplasmática abundante; REGULARES aqueles com número de células entre 8 e 11 e presença de

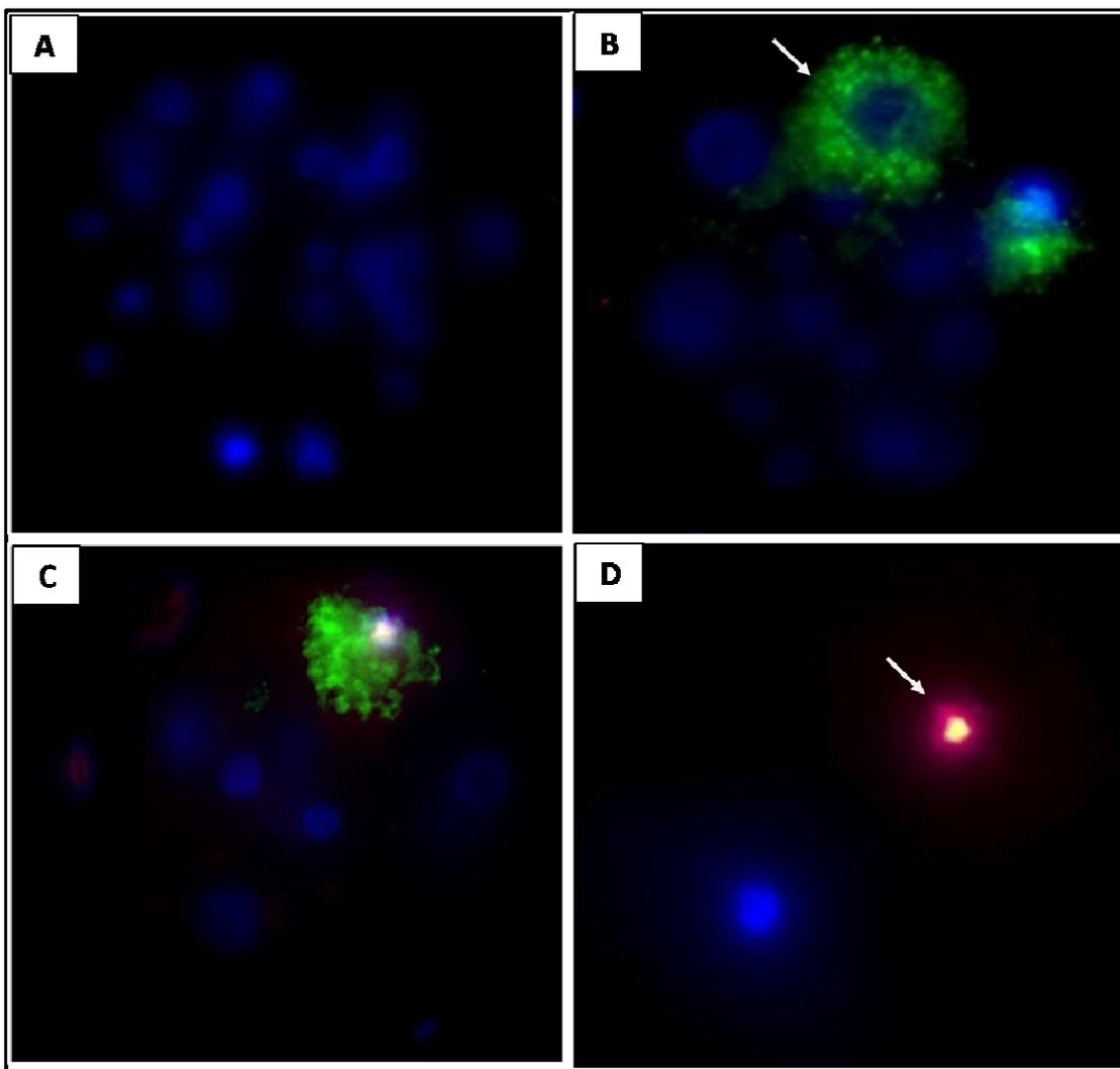
fragmentação; e BONS os que apresentavam número de células entre 12 e 20 e fragmentação mínima ou inexistente (Figura 8).



**Figura 8:** Embriões classificados como RUINS, REGULARES E BONS (A, B, e C, respectivamente), sob luz comum para a avaliação da fragmentação citoplasmática no quarto dia de cultivo *in vitro*. Embriões classificados como RUINS apresentando poucas células, menos de 7, e abundante fragmentação citoplasmática (A, A'). Embriões classificados como REGULARES, com número de células entre 8 e 11, e pouca fragmentação citoplasmática (B, B'). Embriões classificados como BONS com número de células entre 12 e 20, e ausência de fragmentação citoplasmática (C, C').

Em seguida, foi analisada a ocorrência de apoptose entre os grupos experimentais, assim como em cada categoria de qualidade (RUINS, REGULARES e BONS) dentro dos grupos experimentais. Era considerada a ocorrência de pelo menos 1 blastômero apoptótico nos embriões. Os blastômeros marcados somente com anexina-V, evidenciando dano à membrana, estavam em apoptose inicial, aqueles marcados somente com iodeto de propídeo, evidenciando dano ao DNA, estavam em necrose. E os marcados simultaneamente com anexina-V e iodeto de propídeo, evidenciando dano à membrana e ao DNA, estavam em apoptose tardia (ORMED *et al.*, 1993).

Os blastômeros anexina e iodeto de propídeo negativos eram considerados não apoptóticos. Nestes somente o núcleo dos blastômeros era evidenciado pela marcação com fluorocromo Hoechst. De acordo com a marcação de fluorescência os embriões foram distribuídos em três categorias, como ilustrado na figura 9: **Não Apoptóticos**, embriões com nenhum blastômero apoptótico (**A**); **Apoptóticos**, embriões com pelo menos um blastômero em apoptose inicial (**B**) e/ou tardia (**C**); e **Necrose**, com pelo menos um blastômero em necrose (**D**).

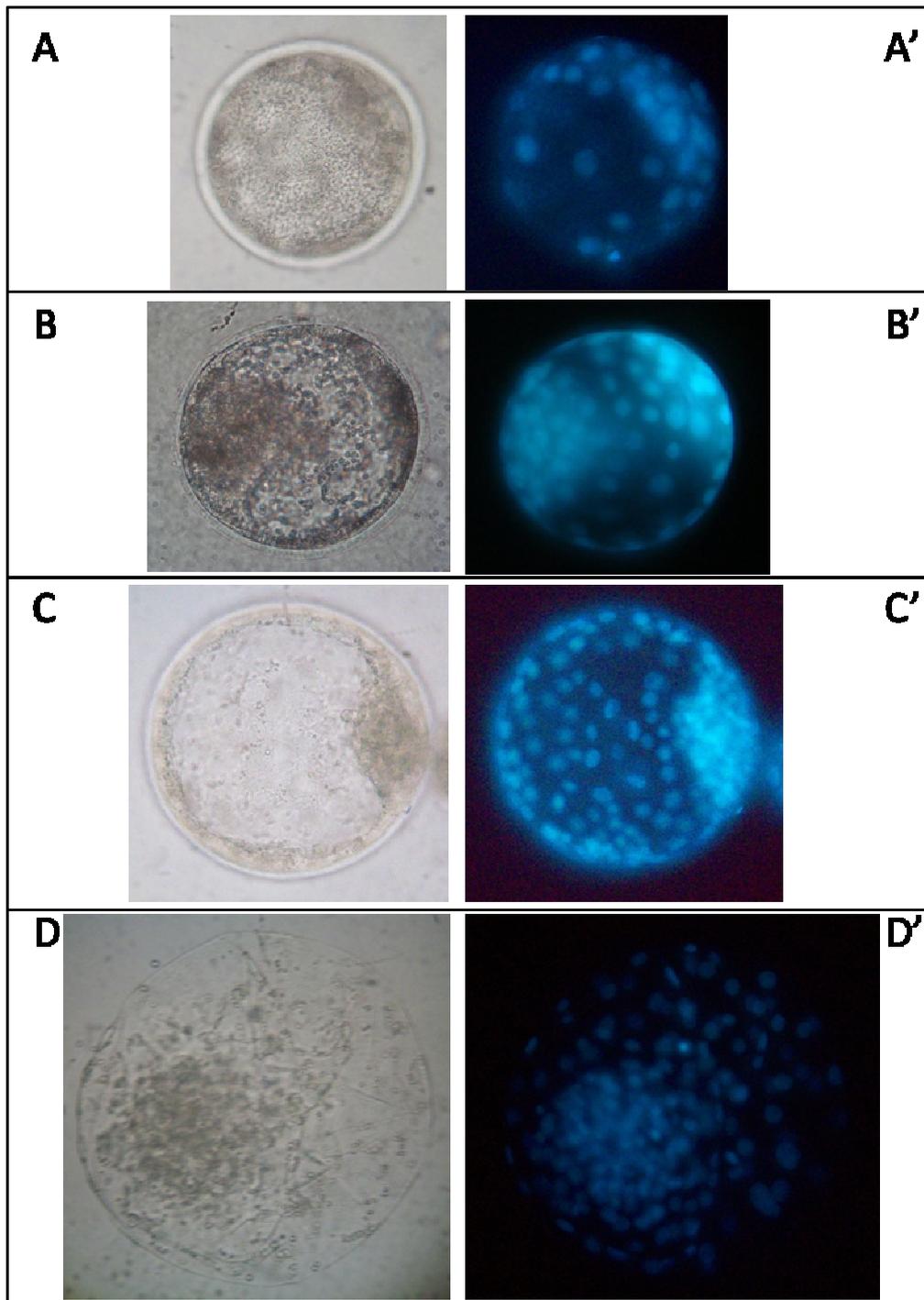


**Figura 9:** Embriões com diferentes números de células corados com Hoechst (cor azul), Anexina V (cor verde), e/ou iodeto de propídeo (cor vermelha) sob microscopia de epifluorescência. **(A)** Embrião **Não Apoptótico** de 22 células marcado somente com Hoechst; **(B)** Embrião **Apoptótico** de 14 células apresentando 2 células marcadas somente com anexina-V (apoptose inicial, seta); **(C)** Embrião **Apoptótico** de 8 células apresentando 1 célula marcada simultaneamente com anexina-V e iodeto de propídeo (apoptose tardia); **(D)** Embrião em **Necrose**, apresentando 1 célula marcada somente com iodeto de propídeo (necrose, seta);

## 2.6. EXPERIMENTO 2. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.

A avaliação do desenvolvimento embrionário incluiu três análises: análise das taxas de Clivagem (segundo dia de cultivo) e Blastocisto (no sétimo dia de cultivo); análise da Cinética do desenvolvimento, ou seja, taxa de formação de Blastocisto Inicial (BI), Blastocisto (BL), Blastocisto Expandido (BX) e Blastocisto Eclodido (BE), e por último a contagem do número total de células (Figura 10).

Após a análise da cinética do desenvolvimento, sob microscopia ótica no sétimo dia de cultivo, os embriões de cada grupo experimental foram fixados em formol salino tamponado e armazenados sob refrigeração, para posterior avaliação qualitativa mediante a contagem do número total de blastômeros por meio da marcação com fluorocromo Hoechst (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e observação por microscopia de epifluorescência.



**Figura 10:** Classificação dos embriões no sétimo dia de cultivo *in vitro*, sob luz comum (A, B, C, D) e sobre epifluorescência com coloração por Hoechst (A', B', C', D'). Embriões em estágio de blastocisto inicial (A, A'), blastocisto (B, B'), blastocisto expandido (C, C') e blastocisto eclodido (D, D').

## 2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A análise quantitativa através da comparação das taxas de clivagem, de formação de blastocisto, de cinética do desenvolvimento e do número total de células foi realizada por análise da variância, ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, quando solicitado, e nível de significância 5%. As análises de apoptose entre as categorias RUIINS, REGULARES e BONS foram feitas por teste de qui-quadrado com nível de significância de 5%. A análise de embriões **Não Apoptóticos**, **Apoptóticos** e com **Necrose** entre os grupos experimentais foi feita por ANOVA dois critérios. Foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (AYRES *et. al.*, 2007).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. EXPERIMENTO 1: CORRELAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA COM A OCORRÊNCIA DA APOPTOSE.

Para a avaliação da ocorrência de apoptose foi analisado o total de 75 embriões: 21 pertencentes ao grupo CTRL; 20 ao grupo de DEX MIV; 14 de DEX CIV; e 20 ao grupo de DEX M/C. Os embriões em cada grupo experimental foram classificados em RUINS, REGULARES e BONS (Tabela 2).

**Tabela 2:** Classificação dos embriões, no quarto dia de cultivo, baseada na morfologia e número de células nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	n	Classificação em Categorias		
		RUINS (%)	REGULARES (%)	BONS (%)
CTRL	21	6 (28,6)	10 (47,6)	5 (23,8) <sup>A</sup>
DEX MIV	20	6 (30,0)	9 (45,0)	5 (25,0) <sup>A</sup>
DEX CIV	14	3 (21,4) <sup>a</sup>	2 (14,3) <sup>a</sup>	9 (64,3) <sup>b,B</sup>
DEX M/C	20	7 (35,0)	7 (35,0)	6 (30,0) <sup>A</sup>

n= número de embriões analisados por Anexina-V;

CTRL: Controle, sem adição de DEX;

DEX MIV: Adição de DEX somente na etapa de Maturação;

DEX CIV: Adição de DEX somente na etapa de Cultivo;

DEX M/C: Adição de DEX nas etapas de Maturação e Cultivo;

Não houve diferença entre o número de embriões RUINS, REGULARES e BONS dentro do grupo CTRL (28,6%, 47,6% e 23,8%, respectivamente;  $p > 0,05$ ), do grupo DEX MIV (45%, 35% e 20%, respectivamente;  $p > 0,05$ ) e do grupo DEX M/C (40%, 35% e 25%, respectivamente;  $p > 0,05$ ). Porém, no grupo com DEX CIV, o percentual de embriões BONS (64,3%) foi superior ( $p=0,006$ ) ao percentual de embriões RUINS e REGULARES (21,4%, 14,3%, respectivamente) assim como foi

superior ao percentual de embriões BONS dos grupos com relação aos grupos CTRL, DEX MIV e DEX M/C (64,3% vs 23,8%, 20,0% e 25,0%;  $p > 0,05$ ).

Posteriormente, foi analisada a ocorrência de apoptose dentro das categorias RUINS, REGULARES e BONS. Foi observado que 50, 44,4, 33,3 e 37,5% dos embriões RUINS nos grupos CTRL, DEX MIV, DEX CIV e DEX M/C, respectivamente, apresentavam pelo menos um blastômero apoptótico, assim como 20, 0, 50 e 28,6%, respectivamente, dos embriões REGULARES e 20, 75, 22,2 e 0%, respectivamente, dos embriões BONS (Tabela 3).

**Tabela 3:** Ocorrência da apoptose em embriões de diferentes qualidades nos grupos experimentais.

Grupos	n	% Apoptose dentro de cada Categoria		
		RUINS	REGULARES	BONS
CTRL	21	50,0 <sup>a,b</sup>	20,0 <sup>a,b</sup>	20,0 <sup>a</sup>
DEX MIV	20	44,4 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	75,0 <sup>b</sup>
DEX CIV	14	33,3 <sup>a</sup>	50,0 <sup>a</sup>	22,2 <sup>a</sup>
DEX M/C	20	37,5 <sup>a</sup>	28,6 <sup>a,b</sup>	0 <sup>a</sup>

n= número de embriões analisados por Anexina-V;

CTRL: Controle, sem adição de DEX;

DEX MIV: Adição de DEX somente na etapa de Maturação;

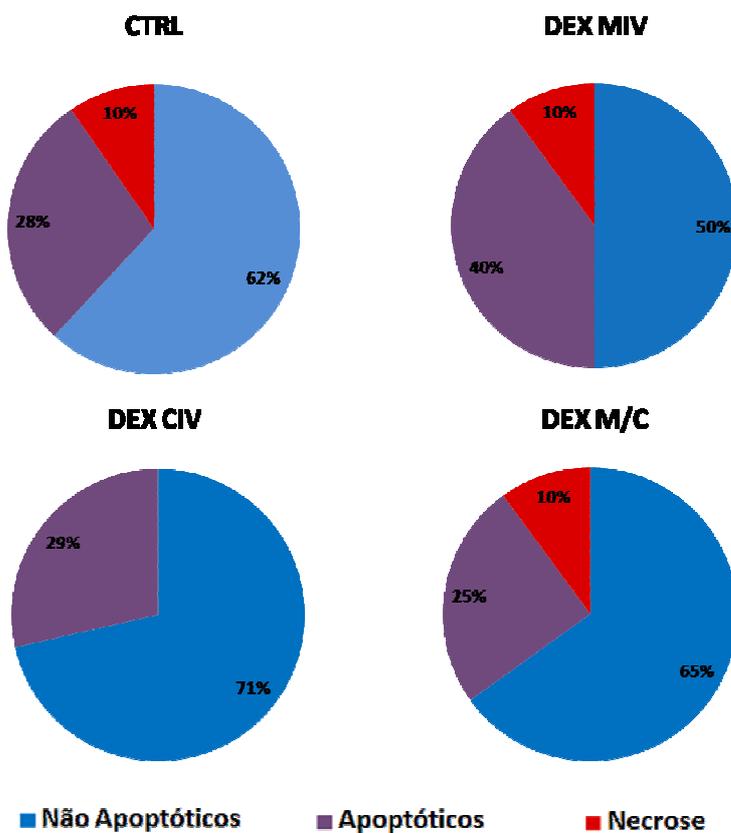
DEX CIV: Adição de DEX somente na etapa de Cultivo;

DEX M/C: Adição de DEX nas etapas de Maturação e Cultivo;

Com relação aos embriões considerados como REGULARES, observou-se que houve diferença da ocorrência da apoptose somente entre os grupos DEX MIV e DEX CIV (0% vs 50%, respectivamente;  $p < 0,05$ ). Já com relação aos embriões considerados como BONS, observou-se que os grupos DEX MIV e DEX M/C apresentaram o maior e menor percentual de embriões com apoptose (75,0% e 0%), respectivamente, em comparação aos demais grupos ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença entre as demais comparações ( $p > 0,05$ ).

Além da análise da apoptose dentro das categorias RUINS, REGULARES e BONS também foi avaliada a ocorrência de apoptose dentro dos grupos experimentais. Para tanto, os embriões dos grupos CTRL, DEX MIV, DEX CIV e DEX M/C foram enquadrados em três categorias: **Não Apoptóticos** - embriões com nenhuma célula apoptótica (61,9%, 50%, 71,4% e 65%, respectivamente); **Apoptóticos** - com pelo menos 1 célula em apoptose inicial e/ou tardia (28,6%, 40%, 28,6% e 25%, respectivamente); e **Necrose** - com pelo menos 1 célula em necrose (9,6%, 10%, 0% e 10%, respectivamente).

Os resultados estão mostrados na Figura 11. Comparando-se as categorias entre os grupos experimentais, observou-se que o grupo DEX CIV foi o que apresentou um maior número de embriões **Não Apoptóticos** ( $p < 0,05$ ) e o grupo DEX MIV apresentou maior número de embriões **Apoptóticos** ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença entre as demais comparações ( $p > 0,05$ ).

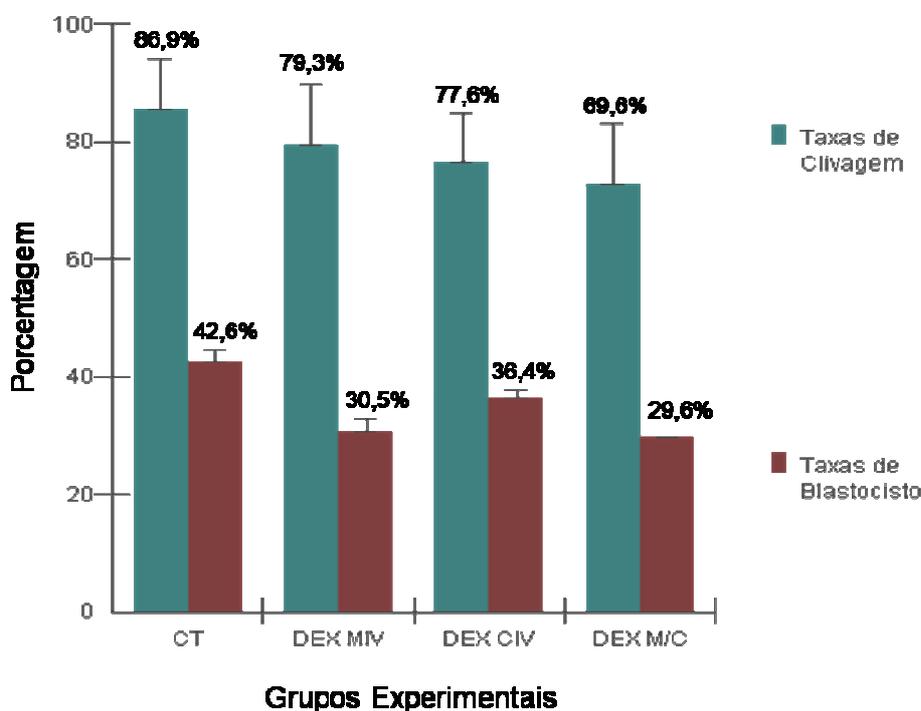


**Figura 11:** Distribuição em cada grupo experimental, dos embriões **Não Apoptóticos** (azul), **Apoptóticos** (roxo), e em **Necrose** (vermelho).

### 3.2. EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.

Para avaliar o efeito da DEX sobre o desenvolvimento embrionário foram analisadas as taxas de clivagem, blastocisto e de cinética do desenvolvimento. Para tanto, foram realizadas 5 repetições nas quais foram empregados 482 oócitos distribuídos da seguinte forma entre os grupos experimentais: 115 no grupo CTRL, 121 no grupo DEX MIV, 121 no DEX CIV, e 125 no grupo DEX M/C.

O percentual de embriões clivados após a fecundação (2º dia de cultivo) e o percentual de embriões que atingiram o estágio de blastocisto (7º dia de cultivo) foi de 86,9% e 42,6%, respectivamente, no grupo CTRL, não sendo verificada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em relação aos outros grupos experimentais de DEX MIV (79,3% e 30,5% respectivamente), de DEX CIV (77,6% e 36,4% respectivamente) e DEX M/C (69,6% e 29,6% respectivamente). A DEX não afetou as taxas de clivagem e de formação de blastocistos independente da etapa em que tenha sido utilizada (Figura 12).



**Figura 12:** Taxas de clivagem (barras verde) e formação de blastocisto (barras vinho) nos diferentes grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).

Ao analisar a cinética do desenvolvimento foi observada semelhança na distribuição de BI, BL, BX e BE nos grupos CTRL (26,4%, 26,4%, 28,6% e 26,5%, respectivamente) e DEX MIV (18,9%, 32,4%, 35,1% e 13,5%, respectivamente). Nos grupos de DEX CIV (25%, 45,4%, 15,9% e 13,6%, respectivamente) e DEX M/C (8,1%, 42,3%, 29,7% e 18,9%, respectivamente) houve predomínio ( $p < 0,05$ ) de embriões BL, que representaram, respectivamente, 45,4% e 43,2% do total de embriões obtidos nesses grupos (Tabela 4).

**Tabela 4:** Cinética do desenvolvimento, no sétimo dia de cultivo. Embriões em estágio de blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e eclodido (BE) em cada grupo experimental ( $p < 0,05$ ).

Grupos	Bi		BL		BX		BE	
	n (%)	Média ( $\pm$ dp)	n (%)	Média ( $\pm$ dp)	n (%)	Média ( $\pm$ dp)	n (%)	Média ( $\pm$ dp)
CTRL	11 (26.4) <sup>aA</sup>	1.8 (0.98)	11 (26.4) <sup>aA</sup>	1.8 (1.16)	14 (28.6) <sup>aA</sup>	2.3 (0.81)	13 (26.5) <sup>aA</sup>	2.1 (2.63)
DEX MIV	7 (18.9) <sup>aAB</sup>	1.1 (0.75)	12 (32.4) <sup>abA</sup>	2.0 (1.26)	13 (35.1) <sup>bA</sup>	2.1 (1.16)	5 (13.5) <sup>aB</sup>	0.8 (0.75)
DEX CIV	11 (25.0) <sup>aA</sup>	1.8 (1.16)	20 (45.4) <sup>bB</sup>	3.3 (1.21)	7 (15.9) <sup>aA</sup>	1.1 (1.16)	6 (13.6) <sup>aB</sup>	0.8 (1.60)
DEX M/C	3 (8.1) <sup>ab</sup>	0.5 (0.83)	16 (43.2) <sup>bAB</sup>	2.6 (2.16)	11 (29.7) <sup>abA</sup>	1.8 (0.98)	7 (18.9) <sup>aAB</sup>	1.0 (1.09)

CTRL: Controle, sem adição de DEX;

DEX MIV: Adição de DEX somente na etapa de Maturação;

DEX CIV: Adição de DEX somente na etapa de Cultivo;

DEX M/C: Adição de DEX nas etapas de Maturação e Cultivo;

<sup>ab</sup> Sobreescritos minúsculos diferentes na mesma linha indicam diferença estatística.

<sup>AB</sup> Sobreescritos maiúsculos na mesma coluna indicam diferença estatística.

Para a estimação do número total de células, 111 embriões de diferentes classificações morfológicas foram analisados, sendo: 22 do grupo CTRL, 31 do grupo DEX MIV, 29 do grupo DEX CIV, e 29 do grupo DEX M/C (Tabela 5). Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) do número total de células entre os grupos CTRL ( $104 \pm 54$ ), DEX MIV ( $84 \pm 32$ ), DEX CIV ( $94 \pm 36$ ) e DEX M/C ( $94 \pm 32$ ).

**Tabela 5:** Número total de células em embriões nos diferentes grupos experimentais, no sétimo dia de cultivo ( $p > 0,05$ ).

Grupos	n	Média do n° total de células ( $\pm dp$ )
CTRL	22	$104 \pm 54$
DEX MIV	31	$84 \pm 32$
DEX CIV	29	$94 \pm 36$
DEX M/C	29	$94 \pm 32$

n= número total de embriões analisados por coloração com Hoescht;

CTRL: Controle, sem adição de DEX;

DEX MIV: Adição de DEX somente na etapa de Maturação;

DEX CIV: Adição de DEX somente na etapa de Cultivo;

DEX M/C: Adição de DEX nas etapas de Maturação e Cultivo;

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. EXPERIMENTO 1: CORRELAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA COM A OCORRÊNCIA DA APOPTOSE.

A apoptose tem sido largamente utilizada como um parâmetro para a avaliação da qualidade de embriões cultivados *in vitro*, e de diferentes substâncias adicionadas aos meios de cultivo. Makarevich e Markkula (2002) ao adicionarem IGF-I, conhecido fator de crescimento e maturação oocitária, ao meio de cultivo, observaram a diminuição do índice de células apoptóticas por embrião, e o aumento da taxa de blastocistos e número total de células de embriões bovinos. Entretanto, o mesmo efeito não era observado quando o IGF-I era adicionado somente ao meio de maturação.

Da mesma forma, foram observados diferentes efeitos da Dexametasona em relação a ocorrência de apoptose de acordo com a etapa de cultivo em que foi utilizada. Quando utilizada somente na etapa de Maturação foi observada maior ocorrência de células apoptóticas por embrião (40%,  $p < 0,05$ ), em relação aos demais grupos experimentais (28,6, 28,6 e 25%, nos grupos CTRL, DEX CIV e DEX M/C, respectivamente), principalmente nos embriões com número de células entre 12 e 20, ou seja, de desenvolvimento rápido (categoria BONS, 75%,  $p < 0,01$ ). Quando utilizada no Cultivo a taxa de apoptose nos embriões da mesma categoria, BONS, não foi diferente do grupo Controle ( $p > 0,05$ ). No entanto, quando a Dexametasona foi utilizada simultaneamente nas etapas de Maturação e Cultivo *in vitro* não foi observada apoptose em embriões da categoria BONS, sugerindo um efeito benéfico da droga.

Embora o mecanismo de ação da droga nos embriões não seja claro, uma provável via seria através das células da granulosa. Foi demonstrado o bloqueio da apoptose em células da granulosa por glicocorticóides (SASSON & AMSTERDAM, 2002), e estas influenciariam tanto a maturação oocitária quanto o posterior desenvolvimento embrionário, principalmente em sistemas de co-cultivo com camada de células da granulosa, como foi feito neste trabalho. Isto explicaria, os diferentes efeitos da droga aplicada em diferentes etapas do cultivo embrionário.

A Dexametasona parece ter agido sobre os embriões diferentemente dependendo também do número de células, pois, quando utilizada na Maturação *in vitro*, não foi observada ocorrência de células apoptóticas em embriões com número de células entre 8 e 11 (categoria REGULARES), em comparação a 75% dos embriões com número de células entre 12 e 20 (categoria BONS) que apresentavam apoptose. Contudo, a relação entre morfologia e formação do embrião não é muito clara.

A apoptose, a fragmentação citoplasmática e a clivagem tardia de embriões (ALIKANI *et al.*, 1999; JURISICOVA *et al.*, 2004; LONERGAN *et al.*, 2000) são reportadas como características morfológicas relacionadas negativamente com a formação de blastocisto, mas nem sempre essa relação é exata. Alikani *et al.* (2000) observaram que esta relação é complexa. Esses pesquisadores relacionaram tempo de clivagem e padrão de fragmentação citoplasmática, no 3º dia de cultivo, e habilidade de formação de blastocistos, no 5º dia. Embriões humanos exibindo número de células menor que 7, formaram 13,8% de blastocistos com morfologia normal (índice de ICM ótimo e trofoectoderma coeso) em comparação a embriões entre 7 e 9, 41,9%, e com mais de 9 células, 27,5%. Os autores sugerem que, em alguns casos, embriões que clivam rápido e com maior número de células após a compactação, podem exibir alto nível de aberrações cromossômicas (MAGLI *et al.*, 1998).

No presente estudo todos os grupos experimentais tinham embriões com número de células menor que 7, e maior grau de fragmentação citoplasmática (categoria RUINS), exibindo pelo menos um blastômero apoptótico. É conhecida a relação entre fragmentação e apoptose, todavia, não foi esclarecida a etiologia da fragmentação e nem comprovada uma relação de causa e efeito entre elas (ANTCZAK & VAN BLERKOM, 1999; JURISICOVA *et al.*, 1996). No entanto, a remoção microcirúrgica da fragmentação de embriões humanos no terceiro dia de cultivo, antes da transferência, aumentou o potencial de implantação dos embriões (ALIKANI *et al.*, 1999).

Por outro lado, a Dexametasona parece não ter influenciado o número de células e fragmentação citoplasmática nos grupos experimentais, pois não houve diferença entre as categorias RUINS, REGULARES e BONS ( $p > 0,05$ ), exceto quando a Dexametasona foi utilizada na etapa de Cultivo *in vitro*, em que houve aumento do número de embriões com número de células entre 12 e 20 e presença mínima de

fragmentação citoplasmática (categoria BONS, 64.3%,  $p=0,006$ ). No entanto, a taxa de apoptose dos embriões desta categoria não diferiu do grupo Controle, sugerindo que a Dexametasona melhorou ou sincronizou os embriões na questão do número de células e fragmentação citoplasmática, mas aparentemente não teve influência sobre a ocorrência de apoptose quando utilizada somente no cultivo *in vitro* dos embriões.

A ocorrência de apoptose está diretamente relacionada às condições de cultivo e também ao estágio do desenvolvimento embrionário. Em embriões de camundongo a apoptose era detectada somente a partir do estágio de 4 células, período que coincide com a ativação do genoma embrionário nesta espécie (SCHULTZ, 1993). Estudos anteriores de Matwee *et al.* (2000) e Byrne *et al.* (1999) que analisaram a ocorrência de apoptose, pela técnica de TUNEL, em embriões bovinos produzidos *in vitro*, observaram a inexistência de apoptose anterior ao estágio de ativação genômica do embrião (9 a 16 células) e ocorrência de pelo menos um blastômero apoptótico em cerca de 5% a 30% dos embriões entre 8-16 células tendendo a aumentar até se tornar presente em praticamente todos os embriões em estágio de blastocisto.

No presente trabalho este padrão não foi observado visto que grande parte dos embriões com até 7 células (categoria RUINS) apresentavam pelo menos um blastômero apoptótico (50,0, 66,6, 31,8 e 28,5% nos grupos CTRL, DEX MIV, DEX CIV e DEX M/C, respectivamente), independente do uso de Dexametasona na Maturação ou no Cultivo *in vitro* dos embriões. E mais de 28% dos embriões entre 8 e 20 células (categorias REGULARES e BONS) apresentaram pelo menos um blastômero apoptótico (40,0, 75, 72,2 e 28,6% nos grupos CTRL, DEX MIV, DEX CIV e DEX M/C, respectivamente).

Porém, em comparação ao trabalho de Matwee *et al.* (2000), no presente estudo a apoptose foi avaliada mediante o ensaio da Anexina V que é utilizado para identificar células em estádios iniciais de apoptose, enquanto que a técnica de TUNEL, utilizada por Matwee *et al.* (2000) identifica células em estágio tardio, quando o dano ao DNA é irreversível.

Isto explicaria porque estudos anteriores (BYRNE *et al.*, 1999; MATWEE *et al.*, 2000; GJØRRET *et al.*, 2007) usando a técnica de TUNEL não observaram a ocorrência de apoptose durante as primeiras divisões do embrião. Sendo especulado que

a apoptose, ao reduzir o número de células, poderia comprometer a capacidade do embrião continuar o desenvolvimento. Enquanto, no estágio de blastocisto a apoptose seria mais facilmente tolerada, pois somente as células danificadas ou com anormalidades cromossômicas seriam seletivamente eliminadas sem comprometer a viabilidade do embrião (DE LA FUENTE & KING, 1998).

No entanto é possível que a apoptose tenha caráter reversível. No estudo de Dumont *et al.* (2000) em que linfócitos T foram expostos a estaurosporina, substância indutora de apoptose, foi relatada a capacidade de reversibilidade da ruptura da membrana e condensação da cromatina, que são características típicas da apoptose. Em outro estudo (MIRANDA *et al.*, 2009) foi induzida a apoptose em fibroblastos, confirmada por detecção com Anexina e iodeto de propídeo, que foram usados como doadores de núcleo para Transferência de Núcleo de Célula Somática, resultando em prenhez. Demonstrando que, em alguns casos é possível “recuperar” fibroblastos apoptóticos transferindo-os para oócitos, contudo outros fibroblastos não tiveram a mesma resposta, sugerindo a existência de um “ponto” no processo apoptótico a partir do qual este se torne irreversível.

Especula-se que a apoptose poderia ser ou não efetivada na célula através de mecanismos dependentes da intensidade e duração do estímulo do agente indutor, e da seqüência dos eventos de ativação da apoptose (MARTELI *et al.*, 2001). Da mesma forma, no presente estudo é possível que nos embriões cultivados *in vitro* a apoptose em estágio inicial no quarto dia de cultivo, possa ter caráter reversível. Uma vez que não foi observada diferença das taxas de blastocisto e nem de número total de células no sétimo dia de cultivo, independente do uso da Dexametasona.

#### 4.2. EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A uso de GCs tem sido indiretamente associado à maturação oocitária (AMSTERDAM & SASSON, 2002). Foi relatado, em peixes, o estímulo da maturação final dos oócitos promovido pelo cortisol (SORENSEN *et al.*, 2004). Contudo, no presente estudo, a utilização de Dexametasona (concentração de 0,1µg/mL) na maturação não afetou as taxas de clivagem e formação de blastocisto, visto que não foi observada diferença em relação ao grupo controle. Corroborando estudo de Carvalho (2009) que também não observou efeito sobre a taxa de maturação destes, no entanto, observou influência positiva sobre a qualidade dos embriões, medida em termos de número total de células ao utilizar Dexametasona (concentração de 0,1µg/mL) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Em camundongos o uso de GCs (nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/ml) também teve pouca ou nenhuma influência na maturação de CCOs (ANDERSEN, 2003).

No presente estudo a Dexametasona independente da etapa em que foi utilizada, Maturação e/ou Cultivo *in vitro*, não afetou as taxas de desenvolvimento embrionário, clivagem e blastocisto e nem a qualidade embrionária, medida em termos de número total de células, visto que não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais ( $104 \pm 54$ ,  $84 \pm 32$ ,  $94 \pm 36$  e  $94 \pm 32$  nos grupos CTRL, DEX MIV, DEX CIV e DEX M/C, respectivamente), diferindo do estudo de Carvalho (2009) no qual embriões com maior número de células eram obtidos utilizando Dexametasona na Maturação *in vitro*.

Embora não tenha afetado as taxas de desenvolvimento embrionário, a Dexametasona parece ter influenciado a cinética do desenvolvimento, visto que foi observada menor ocorrência ( $p < 0,05$ ) de BE nos grupos suplementados com a droga (13,5, 13,6 e 18,9% nos grupos DEX MIV, DEX CIV e DEX M/C, respectivamente) quando comparado ao grupo CTRL (26,5%). Corroborando o estudo de Merris *et al.* (2007) no qual o uso de DEX (5 a 80 µg/mL) não afetou as clivagens iniciais de embriões de camundongos, porém, a expansão e a capacidade de eclosão dos blastocistos foram prejudicadas a partir de 10 µg/mL.

Ao mesmo tempo foi observada maior porcentagem de BL nos grupos DEX CIV (45,4%) e DEX M/C (43,2%) comparado ao grupo Controle (26,4%). Embora com menor porcentagem de embriões BE e predomínio de embriões BL o número total de células não foi reduzido nestes grupos, uma vez que os embriões em estágio de BI e BL nos grupos de DEX CIV e DEX M/C (70,4% e 51,3% do total de blastocistos obtidos, respectivamente) tinham maior número de células quando comparados aos embriões BL dos demais grupos.

## 5. CONCLUSÕES

A suplementação de Dexametasona nas etapas de Maturação e/ou Cultivo *in vitro* não melhorou a qualidade, medida em termos de desenvolvimento embrionário e número total de células, no sétimo dia de cultivo, dos embriões produzidos *in vitro*.

No entanto, o uso de Dexametasona pode influenciar a ocorrência de apoptose em embriões bovinos, no quarto dia de cultivo, dependendo do número de células do embrião.

A ação da Dexametasona sobre a apoptose varia de acordo com a etapa de cultivo em que é utilizada, visto que, foi verificada maior e menor taxa de apoptose nos grupos com Dexametasona na Maturação e Cultivo *in vitro*, respectivamente. Contudo, não houve diferença das taxas de blastocisto, e número total de células entre os grupos, levando a crer que a apoptose em seu estágio inicial pode ser um processo reversível.

## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

- ALEXANDRE, S.; RAST, C.; NGUYEN-BA, G. & VASSEUR, P. Detection of Apoptosis Induced by Topoisomerase Inhibitors and Serum Deprivation in Syrian Hamster Embryo Cells. **Experimental Cell Research**, **255**: 30-39. 2000.
- ALIKANI, M.; CALDERON, G.; TOMKIN, G.; GARRISI, J.; KOKOT, M. & COHEN, J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. **Human Reproduction**, **15**: 2634-2643. 2000.
- ALIKANI, M.; COHEN, J.; TOMKIN, G.; GARRISI, G. J.; MACK, C. & SCOTT, R.T. Human embryo fragmentation *in vitro* and its implications for pregnancy and implantation. **Fertility and Sterility**, **71**: . 1999.
- AMSTERDAM, A.; DANTES, A.; HOSOKAWA, K.; SCHERE-LEVY, C.P.; KOTSUJI, F. & AHARONI, D. Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. **Steroids**, **63**: 314-318. 1998.
- AMSTERDAM, A. & SASSON, R.. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **189**: 1-9. 2002.
- ANDERSEN, C,Y. Effects of glucocorticoids on spontaneous and folliclestimulating hormone induced oocyte maturation in mouse oocytes during culture. **J Steroid Biochemistry Molecular Biology**, **85**: 423-7. 2003.
- ANDREAU, K.; LEMAIRE, C.; SOUVANNAVONG, V. & ADAM, A. Induction of apoptosis by dexamethasone in the B cells lineage. **Immuno Pharmacology**, **40**: 67-76. 1998.
- ANTCZAK, M. & VAN BLERKOM, J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. **Human Reproduction**, **14**: 429-447. 1999.

- AUPHAN, N.; DIDONATO, J.A.; ROSETTE, C.; HELMBERG, A. & KARIN, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. **Science**, **13**: 270: 286-90. 1995.
- AYRES, M.; AYRES, J.R.M.; AYRES, D.L. & SANTOS, A.S. **Bioestat 5.0 Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém:Sociedade Civil Mamirauá/Brasília: CNPq/Conservation International, Manual do programa Bioestat. 2007.
- BALABAN B. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. **Reproduction Biomedical Online**, **8**: 695-700. 2004.
- BRUZZONE, R.; WHITE, T.W. & GOODENOUGH, D.A. The cellular internet: on-line with connexins. **BioEssays**, **18**: 709-718. 1996.
- BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R. & LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal Reproduction Fertility**, **117**: 97-105. 1999.
- CAGNOTO, D.G.; GUERRA, R.R.; ALBERTO, M.V.; AMBRÓSIO, C.E.; SANTOS, J.M. & MIGLINO, M.A. Morfologia e desenvolvimento ultraestrutural do sistema renal de embriões bovinos com idade gestacional entre 10 e 50 dias. **Ciência Rural**, 0103-8478. 2009.
- CARVALHO, C.M.F. **Efeito da Dexametasona na Maturação e Cultivo *in vitro* de embriões bovinos**. Trabalho de Conclusão de Curso. Pará. Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA. 2009.
- CHAUHAN, D.; PANDEY, P.; OGATA, A.; TEOH, G.; TREON, S.; URASHIMA, M.; KHARBANDA, S. & ANDERSON, K.C. Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. **Oncogene**, **15**: 837-843. 1997.
- COPP, A.J. Interaction between inner cell mass and trophoctoderm of the mouse blastocyst I. A study of cellular proliferation. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, **48**: 109-125. 1978.

- COUCOUVANIS, E. & MARTIN, G.R. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. **Cell**, **83**: 279-287. 1995.
- DE LA FUENTE, R. & W. KING, A. Developmental Consequences of Karyokinesis Without Cytokinesis during the First Mitotic Cell Cycle of Bovine Parthenotes' **Biology of Reproduction**, **58**: 952-962. 1998.
- DONIN, D.S.; HEINEMANN, R. & MOREIRA, N. Estresse térmico e suas conseqüências sobre as características do sêmen de machos suínos. **Rev Bras Reproduction Animal**, **31**: 456-461. 2007.
- DONNISON, M. & PFEFFER, P.L. Isolation of Genes Associated with Developmentally Competent Bovine Oocytes and Quantitation of Their Levels During Development. **Biology of Reproduction**. **71**: 1813-1821. 2004.
- DUMONT, C.; DURRBACH, A.; BIDERE, N.; ROULEAU, M.; KROEMER, G.; BERNARD, G.; HIRSCH, F.; CHARPENTIER, B.; SUSIN, S.A. & SENIK, A. Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult. **Blood**, **96**: 3. 2000.
- EL RAZEK, A.I.M.; CHARPIGNY, G.; KODJA, S.; MARQUANT, L.; GUIENNE, B.; MERMILLOD, P. & GUYADER, C.J. Differences in lipid composition between *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, **53**: 346. 2000.
- FENG, Z.; MARTI, A.; JEHN, B.; ALTERMATT, H.J.; CHICAIZA, G. & JAGGI, R. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. **Journal of Biological Chemistry**, **131**: 1095-1103. 1995.
- FEUGANG, A.J.M.; DE ROOVERA, R.; MOENSA, A.; LEONARDA, S.; DESSYA, F. & DONNAYA, I. Addition of b-mercaptoethanol or Trolox1 at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, **61**: 71-90. 2004.
- GARDNER, D.K. & LANE, M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. **Human Reproduction**, **13**: 148-159. 1998.

- GEWIES, A. Introduction to Apoptosis. **ApoReview**. 1-26. 2003.
- GJØRRET, J.O.; FABIAN, D.; AVERY, B. & MADDOX-HYTTE, P. Active Caspase-3 and Ultrastructural Evidence of Apoptosis in Spontaneous and Induced Cell Death in Bovine *In vitro* Produced Pre-Implantation Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, **74**: 961-971. 2007a.
- GJØRRET, J.O.; KNIJN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.I. & MADDOX-HYTTEL P. Chronology of Apoptosis in Bovine Embryos Produced In Vivo and In Vitro. **Biology of Reproduction**, **69**: 1193-1200. 2003b.
- HARDY K. Apoptosis in the human embryo. **Reviews Reproduction**, **4**: 125-34. 1999.
- HARDY, K.; STARK, J. & WINSTON, R.M.L. Maintenance of the Inner Cell Mass in Human Blastocysts from Fragmented Embryos. **Biology of Reproduction**, **68**: 1165-1169. 2003.
- HARLOW, C.R.; JENKINS, J.M. & WINSTON, R.M.L. Increased follicular fluid total and free cortisol levels during the luteinizing hormone surge. **Fertility Sterility**, **68**: 48-53. 1997.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; GREVE, T. & CALLESEN. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, **52**: 683-700. 1999.
- HOUGHTON, F.D.; BARR, K.J.; WALTER, G.; GABRIEL, H.D.; GRUMMER, R.; TRAUB, O.; LEESE, H.J. & KIDDER, G.M. Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development. **Biology of Reproduction**, **66**: 1403-1412. 2002.
- HURWITZ, A, & ADASHI, E.Y. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **84**: 19-23. 1992.
- HUSSEIN, T.S.; FROILAND, D.A.; AMATO, F.; THOMPSON, J.G. & GILCHRIST, R.B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic

- paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, **118**: 5257-5268. 2005.
- IKEDA, S.; IMAI, H. & YAMADA, M. Apoptosis in cumulus cells during *in vitro* maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. **Reproduction**, **125**: 369-376. 2003.
- JURISICOVA, A. & ACTON, B.M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. **Reproduction**, **128**: 281-291. 2004.
- JURISICOVA, A.; LATHAM, K.E.; CASPER, R.F. & VARMUZA, S.L. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. **Molecular Reproduction Development**; **51**: 243-253. 1996.
- KARIN, M. & LIN, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. **Nature Immunology**, **3**: 221-7. 2002.
- KHURANA, N.K. & NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or in vivo. **Biology Reproduction**, **62**: 847-56. 2000.
- KIDSON, A.; RUBIO-POMAR, F.J.; VAN KNEGSEL, A.; VAN TOL, H.T.; HAZELEGER, W. & DUCRO-STEVERINK, D.W. Quality of porcine blastocysts produced *in vitro* in the presence or absence of GH. **Reproduction**, **127**: 165-77. 2004.
- KÖLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E. & SINOWATZ, F. Growth Hormone Inhibits Apoptosis in *In vitro* Produced Bovine Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, **61**: 180-186. 2002.
- LEE, K.S.; JOO, B.S.; NA, Y.J.; YOON, M.S.; CHOI, O.H. & KIM, W.W. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, **18**: 490-8. 2001.
- LEIBFRIED, L. & FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**. **48**: 76-86. 1979.

- LEIST, M. & JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, **8**: 589-98. 2001.
- LEVY, R.; BENCHAIIB, M.; CORDONIER, H.; SOUCHIER, C. & GUERIN, J.F. Annexin V labelling and terminal transferase-mediated DNA end labelling (TUNEL) assay in human arrested embryos. **Molecular Human Reproduction**, **4**: 775-783. 1998.
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D. & EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, **65**:137-152. 2006.
- LONERGAN, P.; GUTIERREZ, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.A. & DE LA FUENTE, J. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, **57**: 146-152. 2000.
- LONERGAN, P.; PEDERSEN, H.G.; RIZOS, D.; GREVE, T.; THOMSEN, P.D. & FAIR, T. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. **Biology Reproduction**, **71**: 1096-1100. 2004.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MOREIRA, P.M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE J. & BOLAND, M.P. Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage *In vitro* or In Vivo. **Biology of Reproduction**, **69**: 1424-1431. 2003.
- MAGLI, M.C.; GIANAROLI, L.; MUNNÉ, S. & FERRARETTI, A.P. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor prognosis patients. **Journal Assist Reproduction**, **15**: 297-301. 1998.
- MAJNO, G. & JORIS, I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis: An Overview of Cell Death. **American Journal of Pathology**, **146**: 3-15. 1995.

- MAKAREVICH, A.V. & MARKKULA, M. Apoptosis and Cell Proliferation Potential of Bovine Embryos Stimulated with Insulin-Like Growth Factor I During *In vitro* Maturation and Culture. **Biology of Reproduction**, **66**: 386-392. 2002.
- MARTELLI, A.M.; ZWEYER, M.; OCHS, R.L.; TAZZARI, P.L.; TABELLINI, G.; NARDUCCI, P. & BORTUL, R. Nuclear apoptotic changes: an overview. **Journal Cell Biochemistry**, **82**: 634-46. 2001.
- MATWEE, C.; BETTS, D.H. & KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, **8**: 57-68. 2000.
- MAYO, L.D. & DONNER, D.B. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. **Trends Biochem Sci**, **27**: 462-7. 2002.
- MEBMER, U.K.; BRINER, V.A. & PFEILSCHIFTER, J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. **Kidney International**, **55**: 2322-2337. 1999a.
- MEBMER, U.K.; WINKEL, G.; BRINER, V.A. & PFEILSCHIFTER, J. Glucocorticoids potently blocks tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide-induced apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells upstream of caspase 3 activation. **British Journal Pharmacology**, **127**: 1633-1640. 1999b.
- MERRIS, V.V.; WEMMEL, K.V., & CORTVRINDT, R. In vitro effects of dexamethasone on mouse ovarian function and pre-implantation embryo development. **Reproductive Toxicology**, **23**: 32-41. 2007.
- MICHAEL, A.E.; THURSTON, LM. & MICHAEL, T.R. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. **Reproduction**, **126**: 425-441. 2003.
- MINGOTI, G.Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005. CD-ROM.
- MIRANDA, M.S.; BRESSAN, F.F.; ZECCHIN, K.G.; VERCESI, A.E.; MESQUITA, L.G.; MERIGHE, G.K.F.; KING, W.A.; OHASHI, O.M.; PIMENTEL, J.R.V.; PERECIN, F. & MEIRELLES, F.V. Serum-Starved Apoptotic Fibroblasts Reduce

- Blastocyst Production but Enable Development to Term after SCNT in Cattle. **Cloning and Stem Cells**, **11**: 1-9. 2009.
- MIYOSHI, H.; OHKI, M.; NAKAGAWAT, T. & HONMAL, Y. Glucocorticoids induce apoptosis in acute myeloid leukemia cell lines with a t (8; 21) chromosome translocation. **Leukemia Research**, **21**: 45-50. 1997.
- MOHR, L.R. & TROUNSON, A.O. Comparative ultrastructure of hatched human, mouse and bovine blastocysts. **Journal of Reproduction and Fertility**, **66**: 499-504. 1982.
- MOUSSA, M.; TREMOLEDA, J.L.; DUCHAMP, G.; BRUYAS, J.F.; COLENBRANDER, B. & BEVERS, M.M. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5 8C. **Theriogenology**, **61**: 921-32. 2004.
- NIEMAN, H. & WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, **53**: 21-34. 2000.
- ORMED, M.G.; XIAO-MING, S.; BROWN, D.; SNOWDEN, R.T. & COHEN, G. M. Quantification of Apoptosis and Necrosis by Flow Cytometry. **Acta Oncologica**, **32**: 417-424. 1993.
- PELUSO, J.J.; PAPPALARDO, A. & FERNANDEZ, G. E-Cadherin-Mediated Cell Contact Prevents Apoptosis of Spontaneously Immortalized Granulosa Cells by Regulating Akt Kinase Activity. **Biology of Reproduction**, **64**: 1183-1190. 2001.
- Portal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA: [HTTP://www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acessado em 7/12/09.
- PRUSCHY, M.; SHI, Y.Q.; CROMPTON, N.E.A.; STEINBACH, J.; AGUZZI, A.; GLANZMANN, C. & BODIS, S. The proto-oncogene c-fos mediates apoptosis in murine T-lymphocytes induced by ionizing radiation and dexamethasone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **241**: 519-524. 1997.
- RATHMELL, J.C. & THOMPSON, C.B. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. **Cell**, **109**: 97-107. 2002.

Revista da Sociedade Brasileira de Tecnologia de embriões, **SBTE. O embrião**. Ano X, Edição 42. Julho/Agosto 2009.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M.P. & LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, **62**: 320-7. 2002a.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. & LONERGAN, P. Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development *In vitro* Versus *In Vivo*: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. **Molecular Reproduction and Development**, **61**: 234-248. 2002b.

SASSON, R. & AMSTERDAM, A. Stimulation of Apoptosis in Human Granulosa Cells from *in vitro* Fertilization Patients and Its Prevention by Dexamethasone: Involvement of Cell contact and Bcl-2 Expression. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, **87**: 3441-3451. 2002.

SASSON, R.; SHINDER, V.; DANTES, A.; LAND, A. & AMSTERDAM, A. Activation of multiple signal transduction pathways by glucocorticoids: protection of ovarian follicular cells against apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **311**: 1047-1056. 2003.

SASSON, R.; TAJIMA, K. & AMSTERDAM, A. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. **Endocrinology**, **142**: 802-811. 2001.

SASSON, R.; WINDER, N.; KEES, S. & AMSTERDAM, A. Induction of apoptosis in granulosa cells by TNF $\alpha$  and its attenuation by glucocorticoids involve modulation of Bcl-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **294**: 51-59. 2002.

SARKER, M.; RUIZ-RUIZ, C.; ROBLEDO, G. & LOPEZ-RIVAS, A. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway antagonizes TRAIL-induced

- apoptosis downstream of BID cleavage in human breast cancer MCF-7 cells. **Oncogene**, **21**: 4323-4327. 2002.
- SCHULTZ, R.M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. **Bioessays**, **15**: 531-538. 1993.
- SIKORA, E.; ROSSINI, G.P.; GRASSILLI, E.; BELLESIA, E.; SALOMONI, P. & FRANCESCHI, C. Interference between DNA binding activities of AP-1 and GR transcription factors in rat thymocytes undergoing dexamethasone-induced apoptosis. **Acta Biochemical Polonica**, **43**: 721-731. 1996.
- SKOMMER, A.J.; WLODKOWIC, D. & DEPTALA, A. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family. **Leukemia Research**, **31**: 277-286. 2007.
- SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L. & BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Guanabara Koogan, 3ed., 2002.
- SORENSEN, A.P.W.; MURPHYA, C.A.; LOOMISB, K.; MANIAKB P. & THOMAS, P. Evidence that 4-pregnen-17,20 $\beta$ ,21-triol-3-one functions as a maturation-inducing hormone and pheromonal precursor in the percid fish, *Gymnocephalus cernuus*. **General and Comparative Endocrinology**, **139**: 1-11. 2004.
- TAKAHASHI, M.; SAKA, N.; TAKAHASHI, H.; KANAI, Y.; SCHULTZ, R.M. & OKANO, A. Assessment of DNA Damage in Individual Hamster Embryos by Comet Assay. **Molecular Reproduction and Development**, **54**: 1-7. 1999.
- TERVIT, H.R.; WHITTINGAHM, D.G. & ROWSON, L.E.A. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, **30**: 493-497. 1972.
- THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryos metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, **60/61**: 263-275. 2000.
- TILLY, J.L.; KOWALSKI, K.I.; JOHNSON, A.L. & HSUEH, A.J. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. **Endocrinology**, **129**: 2799-801. 1991.

- TROUNSON, A. & BONGSO, A. Fertilization and development in humans. **Current Topics in Developmental Biology** **32**: 59–101. 1996.
- VAN SOOM, A.; MATEUSEN, B.; LEROY, J. & DE KRUIF, A. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? **Reproduction Biomedical Online**, **7**: 664-70. 2003.
- VAN SOOM, A.; SEBAERT, M.Y. & DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to the inner cell mass and trophoctoderm in *in vitro* produced embryos. **Molecular Reproduction and Development**, **47**: 47-56. 1997.
- VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F. & LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, **32**: 100-109. 2008.
- WAGSTAFF, P.; KANG, H.Y.; MYLOTT, D.; ROBBINS, P.J. & WHITE, M.K. Characterization of the Avian GLUT1 Glucose Transporter: Differential Regulation of GLUT1 and GLUT3 in Chicken Embryo Fibroblasts. **Molecular Biology of the Cell**, **6**: 1575-1589. 1995.
- WESTFALL, S.D.; HENDRY, I.R.; OBHOLZ, K.L.; RUEDA, B.R. & DAVIS, J.S. Putative role of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway in the survival of granulosa cells. **Endocrine**, **12**: 315-321. 2000.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W. & NIEMANN, H. Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, **108**: 17-24. 1996.
- YANG, H.W.; HWANG, K. J.; KWON, H. C.; KIM, H. S.; CHOI, K. W. & OH, K. S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, **13**: 998-1002. 1998.
- YONG, P.Y. K.; THONG, K. J.; ANDREW, R.; WALKER, B.R. & HILLIER, S.G. Development-Related Increase in Cortisol Biosynthesis by Human Granulosa Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, **85**: 12. 2000.

YUAN, A.Y.Q.; VAN SOOM, A.A.; LEROYA, J.L.; DEWULFA, J.M.R.; VAN ZEVEERENB, A.; DE KRUIFA, A. & PEELMAN, L.J. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, **63**: 2147-2163. 2005.