



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
TROPICAL**

**Expressão de fatores reguladores da apoptose, leptina e seu receptor  
em complexos cumulus-oócito de ovinos.**

**Diogo Manoel Farias da Silva**

**RECIFE  
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
TROPICAL**

**Expressão de fatores reguladores da apoptose, leptina e seu receptor  
em complexos cumulus-oócito de ovinos.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Aurea Wischral

**Diogo Manoel Farias da Silva**

**RECIFE  
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
TROPICAL**

**Expressão de fatores reguladores da apoptose, leptina e seu receptor  
em complexos cumulus-oócito de ovinos.**

---

**Diogo Manoel Farias da Silva**

Aprovada em 26 de fevereiro de 2014

Banca Examinadora

---

Orientadora: Aurea Wischral

Universidade Federal Rural de Pernambuco - DMV

---

Profa. Dra. Daniela Maria Bastos de Souza

Universidade Federal Rural de Pernambuco - DMFA

---

Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos

Universidade Federal de Campina Grande CES-UAE

---

Dr. André Mariano Batista

Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMV - PNPD

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus em primeiro lugar por me guiar, ajudar e proteger durante toda caminhada até aqui.

A minha família que me apoiou durante todo o estudo;

A minha mãe por sempre ser uma referência em tudo na minha vida, iluminando sempre os meus caminhos;

A Keila Pires, por me apoiar, entender e incentivar. Obrigado por ser esta ótima companheira.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram;

A Professora Aurea Wischral e ao professor Manoel Adrião, que além de me orientarem foram meus padrinhos científicos durante toda a minha formação acadêmica;

Aos meus companheiros do FAMA e agregados;

A André Mariano, um grande companheiro de pesquisa.

À coordenadora do LANAGRO/PE, Dra Diana Pinheiros, Dra. Adriana Leite e Dra. Vânia Lúcia por me apoiarem e permitirem essa realização;

Aos meus colegas de trabalho (DIA/VIR, DIA/BAC e DIA/MOL) do LANAGRO/PE;

A todos aqueles que fizeram parte desta jornada, me ajudando direta ou indiretamente;

A todos estes meu muito obrigado por fazerem parte desta caminhada, que eu acredito esta apenas começando;

Muito Obrigado a Todos.

## SUMÁRIO

	Pag
Lista de Figuras.....	Vi
Resumo.....	Vii
Abstract.....	Viii
1 Introdução.....	8
2 Revisão de Literatura.....	9
3 Objetivos.....	17
4 Referências Bibliográficas.....	18
5 Artigo.....	26
6 Conclusão.....	41
7 Anexo 1.....	42

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag</b>
Fig. 1 - Estrutura morfológica do ovário onde se observa a região medular, responsável pela irrigação e inervação ovariana, e a cortical, onde estão dispostos os folículos em diferentes estágios de desenvolvimento .....	12
Fig. 2 – Via de sinalização desencadeada pela ligação da Leptina ao seu receptor ObRb e possíveis alvos da STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), ativada em linfócitos T. SHP-2 - Src homology 2-containing tyrosine phosphatase. Grb2 - Growth factor receptor-bound protein 2. Jak2 - Janus quinase 2. IRS2 - Insulin receptor substrate 2. PI3K/AKT - phosphatidilinositol 3-kinases/Protein kinases B. SOCS3- Suppressor of cytokine signaling 3. Foxp3- forkhead box P3. RORC – retinoid-related orphan receptor gamma (MORAES-VIEIRA, 2011).....	15

## RESUMO

Fatores reguladores da apoptose podem determinar a viabilidade de oócitos, entretanto há poucos estudos referentes à ação dos genes destes fatores no desenvolvimento do complexo cumulus-oócito (COC) de folículos antrais, nem sua relação com a Leptina (LEP) e seu receptor (LEPR) em ovinos. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do mRNA da LEP, LEPR, e dos fatores que levam a regulação da apoptose (Bcl-2, Bax, p53 e caspase), em oócitos (OO) e células do cumulus (CC) de folículos antrais ovinos de diferentes tamanhos. Foram avaliados 20 pools de OO (20 unidades) e de CC (de 20 COC) obtidos de folículos  $> 3$  mm e  $\leq 3$  mm. A expressão gênica foi avaliada pela extração do mRNA e posterior amplificação do cDNA em real time PCR. Bcl2, p53 e caspase 3 foram expressos em todas as categorias de células e tamanho folicular. A expressão da Bax foi observada apenas em oócitos. LEP e LEPR foram expressos apenas em CC. A maior expressão dos fatores promotores da apoptose foi em OO  $> 3$ mm, enquanto a Bcl2 (anti-apoptótica) foi mais expressa nos OO  $\leq 3$  mm. Comparando OO com CC das mesmas categorias de folículos, houve maior expressão de Bcl2 nos OO  $\leq 3$  mm, e menor de p53 nos OO  $> 3$ mm. LEPR foi mais expressa em CC  $> 3$ mm. Houve correlação positiva entre a expressão de p53 e BAX em oócitos ( $r = 0,66$ ), e entre Bax em OO e LEPR em CC ( $r = 0,64$ ). Conclui-se que a expressão dos genes anti- e pró-apoptóticos em COC pode estar relacionada com o desenvolvimento folicular e oocitário, sendo que os menores ( $\leq 3$  mm) apresentam menor expressão dos fatores promotores da apoptose. Adicionalmente, a leptina pode ser um fator regulatório do desenvolvimento oocitário devido a presença de seus receptores nas CC.

**Palavra Chave:** Expressão Gênica, mRNA, apoptose, folículos ovarianos

## **ABSTRACT**

Factors regulating apoptosis can determine the oocyte viability; however there are few studies about the genes of these factors and their action in the antral follicles cumulus-oocyte complex (COC) development, neither about the relationship with Leptin (LEP) and its receptor (LEPR) in sheep. The aim of this study was evaluate the mRNA expression of LEP, LEPR, and the apoptotic regulating factors (Bcl-2, Bax, p53 and caspase 3), in oocytes (OO) and cumulus cells (CC) from different sizes of antral follicles. Twenty pools of OO (20 unities) and of CC (from 20 COC) harvested from follicles  $> 3$  mm and  $\leq 3$  mm were evaluated. The gene expression was determined after mRNA extraction and further cDNA amplification by real time PCR. Bcl2, p53 and caspase 3 genes were expressed in all cells and follicles size. Bax expression was observed only in OO. LEP and LEPR were expressed only in CC. The expression of apoptosis promoting factors was higher in OO  $> 3$ mm, while Bcl2 (anti-apoptotic) expression was higher in OO  $\leq 3$  mm. Comparing OO with CC from the same size of follicles, there was higher expression of Bcl2 in OO  $\leq 3$  mm, and lower expression of p53 in OO  $> 3$ mm. LEPR tended to be more expressed in CC  $> 3$ mm than  $\leq 3$  mm. Was observed a positive correlation between p53 and BAX expression in OO ( $r = 0.66$ ), and between Bax in OOs and LEPR in CCs ( $r = 0.64$ ). It was concluded that the expression of anti- and pro-apoptotic genes in COC can be related to the follicle and oocyte development, since follicles  $\leq 3$  mm presented lower expression of factors promoting apoptosis. Additionally, leptin can be a regulatory factor of oocyte development due presence of LEPR in CC.

**Key words: Gene Expression, mRNA, apoptosis, ovarian follicles**



## 1 INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura tem crescido substancialmente nos últimos anos, esse crescimento tem sido concentrado em países tropicais e em desenvolvimento, devido o reduzido rebanho nestes países. Sendo assim o rebanho brasileiro acompanhou a tendência mundial fazendo com que o seu efetivo nacional alcançasse 30 milhões de cabeças (12,6 e 13,9 milhões de caprinos e ovinos, respectivamente) concentradas principalmente na região do nordeste (FONSECA, 2006) que apresenta 56,8% do rebanho ovino do Brasil, sendo representado por um efetivo estimado em 9.872.160 animais (IBGE, 2010). O crescimento da ovinocultura brasileira está aliada com o crescente desenvolvimento de biotécnicas ligadas a reprodução, melhoramento genético do rebanho e mudança do sistema tradicional de criação, impulsionando com isso o agronegócio (BANDEIRA et al., 2004).

A inseminação artificial, transferência de embrião, cultivo, maturação e fertilização *in vitro* são algumas das biotécnicas ligadas à reprodução que podem auxiliar o desenvolvimento da ovinocultura brasileira, estas três últimas técnicas têm como objetivo recriar as condições observadas *in vivo* no ovário durante o desenvolvimento folicular, isto é um dos principais entraves da técnica já que existem diversos fatores de crescimento e hormônios que agem, individualmente ou combinados, no processo de ativação, crescimento, diferenciação, maturação e atresia folicular.

O crescimento dos folículos até a fase pré-ovulatória se dá pela ação de vários fatores de crescimento que influenciam o desenvolvimento das células da granulosa (ADASHI et al., 1996). Neste contexto, a Leptina (LEP), um peptídeo pleiotrópico de 16 kDa, tem sido implicado nas funções reprodutivas de várias espécies (GONZALEZ et al., 2000; SWAIN et al., 2004). Outras funções estão relacionadas ao controle da hematopoiese, termogênese, reprodução, angiogênese e homeostase imunológica (LIN et al., 2004).

Além dos fatores que atuam no processo de desenvolvimento folicular, há fatores que regulam o processo de morte celular programada ou apoptose. Os sinais que levam a apoptose têm início antes mesmo da visualização dos processos degenerativos que levam a alterações morfológicas (ASSELIN et al., 2000). O balanço entre os fatores

que promovem sobrevivência e aqueles que induzem a apoptose estabelecerá se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (HSU e HSUEH, 2000). Muitas proteínas, como as pertencentes à família Bcl-2 (Bcl-2 e Bax), caspases (YUAN et al., 2005) e p53, supostamente participam da indução, execução ou supressão de apoptose nas células ovarianas (SABBATINI et al., 1995).

Com intuito de compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e no processo de morte folicular, alguns genes, cujos produtos são mediadores da dinâmica de desenvolvimento folicular, foram selecionados para melhor compreensão da viabilidade do oócito.

O entendimento dos fatores que estão relacionados ao processo de crescimento e morte folicular são algumas das principais ferramentas para melhorar as biotécnicas reprodutivas nas espécies domésticas, em ovinos principalmente por sua importância econômica. Nesse sentido, é necessário entender o comportamento dos folículos antrais em relação à ação dos genes reguladores da apoptose (Bcl2, Bax, p53, caspase 3) e da leptina, durante as fases de crescimento e maturação intra ovariana.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Oogênese e Foliculogênese**

A oogênese consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até o estágio de oócito haplóide fecundado (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Em ovinos e bovinos, ainda na vida embrionária, por volta do 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias de gestação, respectivamente, ocorre a migração das CGP do saco vitelínico para a região das gônadas primitivas. Após um processo marcado pelo crescimento celular e pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, as CGP multiplicam-se ativamente nos ovários e transformam-se em oogônias, as quais possuem alta atividade mitótica e transcricional (EPPIG et al., 2004).

Após a formação das oôgonias, inicia-se a primeira divisão celular, passando pelos estágios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno) da primeira

divisão meiótica (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). No estágio de diplóteno ou vesícula germinativa da prófase I, ocorre a primeira interrupção da meiose, caracterizando os oócitos primários, que permanecem neste estágio até a puberdade (SUH et al., 2002).

Ao atingir a puberdade, com o início da ação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), a meiose é retomada pelos oócitos que terminaram seu crescimento e o núcleo passa do estágio de vesícula germinativa para diacinese (MOORE e PERSAUD, 1994). Na sequência, a vesícula germinativa é rompida e a divisão celular progride passando pelas fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, com expulsão do primeiro corpúsculo polar do oócito secundário (BETTERIDGE et al., 1989). Com o início da segunda divisão meiótica, o núcleo do oócito evolui até o estágio de metáfase II, e a meiose é novamente interrompida (GORDON, 1994). O oócito irá permanecer em metáfase II até o momento da fecundação, momento em que a meiose é retomada e o segundo corpúsculo polar é liberado, formando o oócito haplóide fecundado (MOORE e PERSAUD, 1994).

A foliculogênese é um evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Os folículos ovarianos são compostos por um oócito circundado por células da granulosa (CG). O seu crescimento ocorre no ocorre no córtex ovariano, onde os folículos, ao decorrer do seu desenvolvimento, sofrem alterações morfofisiológicas que envolvem o crescimento e diferenciação do oócito, bem como, a proliferação e diferenciação das CG e a formação de antro (SUH et al., 2002).

## **2.2 Folículos Ovarianos**

Os folículos são as unidades morfofuncionais do ovário, sendo constituídos por um oócito circundado por células da granulosa (CG) e por células tecais (CT), podendo ser divididos, de acordo com o nível de desenvolvimento, em folículos não cavitários ou pré-antrais (folículos primordiais, primários e secundários) e folículos cavitários ou antrais (folículos terciários e folículos de Graaf) (Fig.1). Os folículos ovarianos pré-antrais são responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais no ovário

(GUILBAULT et al., 1986) e representam 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991). Essa estrutura formada, ainda durante a embriogênese, tem seu desenvolvimento controlado por fatores endócrinos e parácrinos (MCGEE e HSUEH, 2000).

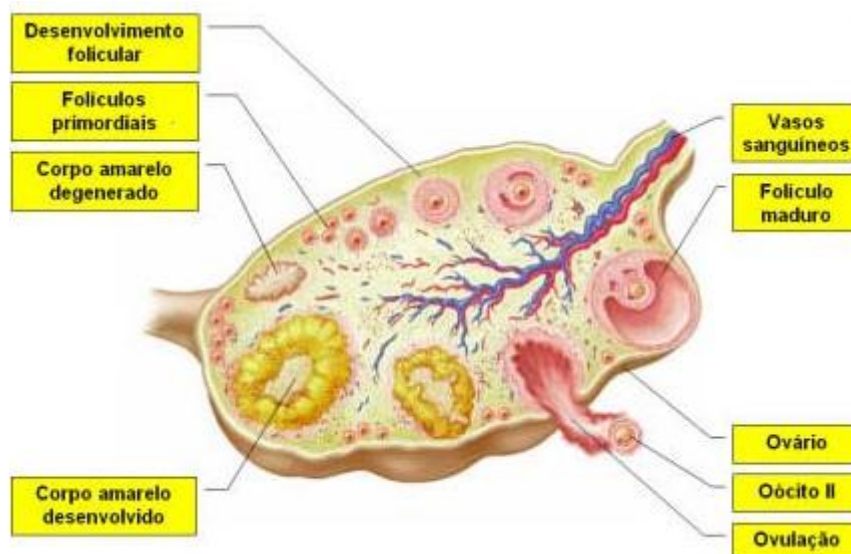


Fig. 1- Estrutura morfológica do ovário onde se observa a região medular, responsável pela irrigação e inervação ovariana, e a cortical, onde estão dispostos os folículos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Fonte: [http://www.notapositiva.com/pt/apntestbs/biologia/12\\_reprod\\_humana\\_man\\_fert.htm](http://www.notapositiva.com/pt/apntestbs/biologia/12_reprod_humana_man_fert.htm).

### 2.3 Desenvolvimento Folicular

Entende-se por ativação o processo irreversível pelo qual folículos primordiais iniciam o seu crescimento (BINELLI et al., 2009). Com a ativação ocorre aumento gradual no diâmetro do oócito, proliferação e mudança na conformação das CG, de achatadas para cubóides. A ativação inicial não depende da ação direta de gonadotrofinas, uma vez que *in vivo* o processo de ativação é contínuo e não relacionado aos padrões cíclicos de liberação de LH e FSH, já *in vitro* a ativação ocorre espontaneamente nos folículos primordiais de várias espécies (WANDJI et al., 1996). Mecanismos autócrinos e parácrinos controlam a ativação dos folículos, sendo os fatores ativadores originados tanto das CG quando do próprio oócito (BINELLI et al., 2009). Devido à falta de vascularização, os folículos primordiais dependem de interações intercomunicantes ou do tipo gap entre as células que compõem os folículos (oócito e CG) e o estroma ovariano (WILLIAMS e ERICKSON, 2012). As junções gap

facilitam a troca de nutrientes como glicose, aminoácidos e nucleotídeos para o oócito, favorecendo o seu crescimento (BONI et al., 2002).

Depois de ativados, os folículos iniciam seu crescimento e progridem pelas fases de folículo pré-antral (primário e secundário) até atingirem os estágios antrais (terciário e pré-ovulatório) com a formação do antro folicular. Tal crescimento folicular é caracterizado pela proliferação e diferenciação das CG, aumento do volume do oócito, e a diferenciação e proliferação das CT.

Os mecanismos que controlam o processo de crescimento folicular ainda são pouco conhecidos (SCOTT et al., 2004), mas sabe-se que em mamíferos o crescimento folicular é controlado tanto por hormônios gonadotróficos e somatotróficos, como por fatores de crescimento. Em conjunto, estes fatores agem no processo de ativação e crescimento folicular como também no crescimento do oócito, proliferação e diferenciação das células da granulosa e teca nos vários estádios de desenvolvimento (MARTINS et al., 2008).

## 2.4 Obtenção de folículos

A coleta de oócito é um dos passos iniciais para utilização de biotécnicas ligadas à reprodução, entre elas encontram-se o cultivo, maturação e fertilização *in vitro* (COX e ALFARO., 2007; BOLS et al., 1996). O modo de obtenção se torna um dos pontos fundamentais por garantir a qualidade oocitária e manter a integridade e o retorno do ciclo estral em pequenos ruminantes, já que algumas das técnicas podem vir a gerar aderências, comprometendo viabilidade reprodutiva das doadoras (GRAFF et al., 1999; STANGL et al., 1999). Algumas das técnicas utilizadas para obtenção de oócito são: punção folicular por laparoscopia ou ultra-sonografia (BALDASSARRE et al., 2001; TERVIT et al., 1995), transvaginal ou transabdominal (GRAFF et al., 1999; COX e ALFARO., 2007). O tamanho mínimo exigido para a realização das aspirações é que o folículo possua 2 mm de diâmetro (TEIXEIRA et al., 2011). Alguns fatores podem influenciar as taxas de recuperação do complexo cumulus-oócito (COC) como, por exemplo, a pressão exercida no momento da aspiração, o calibre da agulha e o bisel (BOLS et al., 1996). Baldassarre et al. (1994) determinaram que a taxa de recuperação utilizando agulha de 16 G chegou a 81%. Rodriguez et al. (2006) avaliaram diversos

tamanhos de folículos pequenos (<3 mm), médios (3-5 mm) e grandes (> 6 mm) e observaram que não houve diferença significativa na recuperação dos oócitos com relação ao tamanho, entretanto a qualidade do oócito de folículos médios e grandes foram maiores em relação aos pequenos. Outros métodos podem ser utilizados para obtenção de oócitos, como o isolamento mecânico e o enzimático, comumente utilizado para isolamento de folículos pré-antrais. Para o método mecânico podem ser utilizados vários equipamentos como *tissue chopper*, lâminas, agulhas dissecantes, filtros de dissociação celular e tesoura cirúrgica. Para o isolamento enzimático podem ser utilizadas as enzimas colagenase e tripsina (FIGUEIREDO et al., 1998).

## 2.5 Leptina

A leptina (LEP) é um peptídeo que possui ação na reprodução em várias espécies (GONZALEZ et al., 2000; SWAIN et al., 2004). A expressão do mRNA para o gene LEP tem sido descrito nas células do cumulus e da granulosa humana (CIOFFI et al., 1997), e em oócitos de diferentes estágios foliculares em porcas (CRAIG et al., 2004). Já o mRNA para o gene do receptor da leptina (LEPR) tem sido descrito em oócitos de ratos (MATSUOKA et al., 1999; KAWAMURA et al., 2002), células da granulosa (CIOFFI et al., 1997) e do cumulus humano (CIOFFI et al., 1997; CIOFFI et al., 1996) e blastocisto bovino (BOELHAUVE et al., 2005). Em caprinos, a expressão do mRNA da LEP e LEPR foi identificada em células da granulosa, célula do *cumulus*, célula da teca e oócitos (BATISTA et al., 2013). Estudos determinaram que a LEP pode regular a apoptose via sinalizações de morte mitocondrial através da inibição das caspases (DEVERAUX et al., 1999).

A LEP é um hormônio peptídico, com massa molecular de 16 KD (HARVEY, 2003), não glicosado, pertencente à classe I da superfamília das citocinas, sintetizados principalmente por adipócitos. Possui ação no hipotálamo regulando o apetite e o gasto energético (CHILLIARD et al., 2001) e tem flutuações concomitantes com as mudanças sazonais, indicando uma regulação sazonal em relação a gordura corporal (BARTNESS et al., 2002). Os receptores de Leptina podem ser subdivididos em três categorias: forma secretada, forma curta que é responsável por facilitar o transporte da leptina pela barreira hematocefálica (TARTAGLIA, 1997) e a forma longa, principal

forma que possui as ações fundamentais para as funções da leptina (CHUA et al. 1997; TARTAGLIA, 1997). O receptor de forma longa é responsável por ativar as JAKs quinases, induzindo a fosforilação e ativação do Sinal Tradutor e Ativador de Transcrição 3 (STAT3) (BAUMANN et al., 1996) (Fig. 2). Apesar de ser sintetizada pelo adipócitos, a expressão tanto para leptina como para o seu receptor foi observada em outros tipos de tecidos, demonstrando que possui uma ação multi-sistêmica (CHELIKANI et al., 2003).

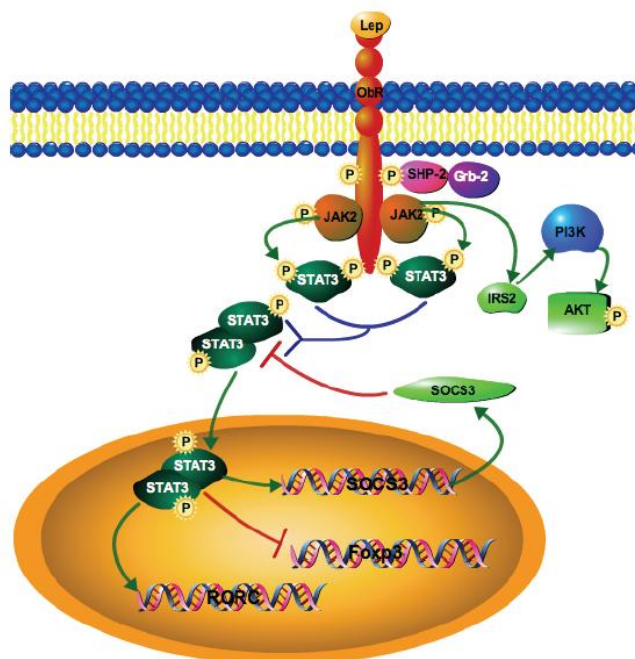


Fig. 2 – Via de sinalização desencadeada pela ligação da Leptina ao seu receptor ObRb e possíveis alvos da STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), ativada em linfócitos T. SHP-2 - Src homology 2-containing tyrosine phosphatase. Grb2 - Growth factor receptor-bound protein 2. Jak2 - Janus quinase 2. IRS2 - Insulin receptor substrate 2. PI3K/AKT - phosphatidilinositol 3-kinases/Protein kinases B. SOCS3- Suppressor of cytokine signaling 3. FcγR2- forkhead box P3. RORC – retinoid-related orphan receptor gamma. (MORAES-VIEIRA, 2011).

## 2.6 Apoptose

O desenvolvimento folicular resulta em uma complexa interação entre proliferação, diferenciação e processo de morte celular, durante a maturação no interior do ovário (GREENWALD; ROY, 1994). Os sinais que levam à morte celular ou apoptose tem início antes mesmo da visualização dos processos degenerativos que levam a alterações morfológicas (ASSELIN et al., 2000). A morte celular ovariana

mantém a homeostasia no ovário dos mamíferos, menos de 1% dos oócitos e folículos sobrevivem até a ovulação pois a grande maioria é eliminado por processos degenerativos conhecidos como atresia (BAKER et al., 1972). Fortes indícios determinam que a atresia folicular possa ocorrer por mecanismos apoptóticos (HUGHES; GOROSPE, 1991). As proteínas pertencentes a família Bcl-2 (Bcl-2 e Bax), a caspase (YUAN et al., 2005) e a p53 (SABBATINI et al., 1995) supostamente participam da indução, execução ou supressão de apoptose nas células ovarianas. Fortes indícios determinam que a atresia folicular possa ocorrer por mecanismos apoptóticos (HUGHES e GOROSPE, 1991).

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTNER, 2000). As vias que podem desencadear a apoptose são: extrínseca (citoplasmática) - ocorrendo a ligação de ligantes específicos a receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), levando a ativação das caspases entre elas a caspase-8 e caspase-3 (BUDIARDJO et al., 1999; DANIEL et al., 2001), e a via intrínseca (mitocondrial) - desencadeada por estresse intra e extracelular, resultando em estímulo de morte celular pela permeabilidade mitocondrial liberando moléculas pró-apoptóticas que ativam as caspases, principalmente caspase-9 e caspase-3 (DEVERAUX e REED, 1999).

### **2.6.1 Família Bcl-2**

Pertencem à família Bcl-2, proteínas que possuem ação de induzir ou suprimir a apoptose, elas participam diretamente na regulação de morte celular (BORNER, 2003). As proteínas Bcl-2 e Bcl-XL desta família inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo *c* (reguladores antiapoptóticos), por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas que a estimulam (pró-apoptóticas) (HENGARTNER, 2000). A homeostase é mantida pelo equilíbrio das proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas; estímulos que aumentam os níveis das proteínas pró-apoptóticas, causando desequilíbrio e levam a promoção da apoptose (PETROS et al., 2004).



### 2.6.2 Caspases-3

As caspases são os iniciadores e executores da apoptose, pertencentes a família das cisteínas proteases que clivam aspartato levando a condensação e fragmentação nuclear, além de externalização de fosfolipídios que sinalizam a fagocitose por parte dos macrófagos (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; BOATRIGT; SALVESEN, 2003)

### 2.6.3 p53

A proteína p53 participa da regulação do ponto de checagem de G1, que tem fundamental importância na manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose (LEMOINE, 1990). Danos no DNA promovem a superexpressão e consequente ativação da p53, resultando na parada do ciclo celular em G1 e iniciando o reparo do DNA (SHERR, 1990). Estudos sugerem que a p53 pode estimular a expressão de genes que reduzem o estresse oxidativo (MATOBA et al., 2006; SABLINA et al., 2005). A p53 é considerada uma proteína importante para a ativação de alguns sistemas de morte celular (SABBATINI et al., 1995).

## 2.7 Expressão mRNA x Real Time

Crescimento, diferenciação e sobrevivência celular estão relacionados a alterações nos padrões de expressão gênica e a determinação da quantificação dos níveis de transcrição de genes específicos é essencial para o entendimento da sua função (ZAMORANO et al., 1996). Com isso, a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) se torna um método *in vitro* para amplificar enzimaticamente as sequências definidas de cDNA (RAPPOLEE et al., 1988) permitindo análise de diferentes amostras de uma única célula no mesmo experimento, sendo a sua sensibilidade a mais flexível dos métodos de quantificação (WANG; BROWN, 1999). O RT-PCR pode ser utilizado para comparar níveis de mRNA em diferentes populações de amostras, caracterizando padrões de expressão do mRNA, discriminando os mRNA intimamente relacionados.

Alguns genes podem ser utilizados como genes de referência para determinação dos níveis de mRNA de genes específicos em mamíferos, dentre eles o GAPDH e o  $\beta$ -Actin. O mRNA da Actina é expresso moderadamente na maioria dos tipos de células e codifica uma proteína do citoesqueleto, sendo um dos mais utilizados como padrão de referência quantitativa para os ensaios de RT-PCR (KREUZER et al., 1999).

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a expressão da LEP, LEPR e dos fatores que levam a regulação da apoptose em folículos antrais ovinos de diferentes tamanhos.

#### **3.2 Objetivo específico**

Avaliar a expressão do mRNA dos genes LEP, LEPR, Bcl-2, Bax, p53 e caspase 3 em oócitos e células do cumulus obtidos de folículos antrais  $\leq 3$  mm e  $> 3$  mm de diâmetro, utilizando a técnica de PCR Real Time .

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; TWARDZIK, D.R. Transforming growth factor-alpha attenuates the acquisition of aromatase activity by cultured rat granulosa cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.33, p.1-13, 1987.

ASSELIN, E.;XIAO, C.W.; WANG, Y.F.;TSANG, B. K. Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis. **Biological Signals and Receptors**, v.9, p. 87-95, 2000.

BAKER, H.W., BURGER, H.G., HUDSON, B., DE KRETZER, D.M. Partial hypogonadotropic hypogonadism: studies of pituitary function and of pituitary-testicular relationship in two patients. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 50, p. 861-872, 1972.

BALDASSARRE, H., KEEFER, C.L.; GAUTHIER, M.; BHATIA, B.; BEGIN, I.; PIERSON, J.; LAURIN, D.; TRIGGS, T.; DOWNEY, B.R.; KARATZAS, C.N. Laparoscopic ovum pick-up and zygote recovery in goats treated with deslorelin implants before superovulation. **Theriogenology**, v. 55, p. 776, 2001.

BALDASSARRE, H.; MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; CASTRO, T.E.; FISCHER, E.I.C.; DE MATOS, D.G. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science**, v. 35, p. 145–150, 1994.

BANDEIRA, D.A.; SANTOS, M.H.B.; NETO, J.C.; NUNES, J.F. Aspectos gerais da caprino-ovinocultura no Brasil e seu reflexos produtivo e reprodutivo. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. p.1-8.

BARTNESS, T.J.; DEMAS, G.E.; SONG, C.K. Seasonal changes in adiposity: The roles of the photoperiod, melatonin and other hormones and sympathetic nervous system. **Experimental Biology and Medicine** (Maywood), v. 227, p. 363-376, 2002.

BATISTA, A.M., SILVA, D.M.F., RÊGO, M.J.B.M., SILVA, F.L.M., SILVA, E.C.B., BELTRÃO, E.I.C., GOMES FILHO, M.A., WISCHRAL, A., GUERRA, M.M.P. The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 141, p. 142– 147, 2013.

BAUMANN, H.; MORELLA, K.K.; WHITE, D.W.; DEMBSKI, M.; BAILON, P.S.; KIM, H. LAI, C.F.; TARTAGLIA, L.A. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. **Proceedings of the National Academy of Science – USA**, v. 93, p. 8374-8378, 1996.

BETTERIDGE, K.J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R.B.; XU, K.P.; KING, W.A.

Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 87-98, 1989.

BINELLI, M.; PORTELA, V. M.; MURPHY, B. D. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, Belo Horizonte, n.6, p.134-139, dez. 2009.

BOATRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 725-731, 2003.

BOELHAUVE, M., SINOWATZ, F., WOLF, E., PAULA-LOPES, F.F. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 737–744, 2005.

BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.M.; KRUIF, A.D. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 1001–1014, 1996.

BONI, R.; CUOMO, A.; TOSTI, E. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade. Calcium current activity, and calcium stores. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 836-842, 2002.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, p.615-647, 2003.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.5-13, 2006.

BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 15, p. 269-90, 1999.

CHELIKANI, P.K.; GLIMM, D.R.; KENNELLY, J.J. Short communication: tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2369–2372, 2003.

CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C.; FAULCONNIER, Y.; LEROUX, C.; DJIANE, J.; BOCQUIER, F. Leptin in ruminants: gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 271–295, 2001.

CHUA, S.C. JR.; KOUTRAS, I.K.; HAN, L.; LIU, S.M.; KAY, J.; YOUNG, S.J. CHUNG, W.K.; LEIBEL, R.L. Fine structure of the murine leptin receptor gene: Splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. **Genomics**, v. 45, p. 264-270, 1997.

CIOFFI, J.A., SHAFER, A.W., ZUPANCIC, T.J., SMITH-GBUR, J., MIKHAIL, A., PLATIKA, D., SNODGRASS, H.R. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. **Nature Medicine**, v. 2, p. 585–589, 1996.

CIOFFI, J.A., VAN BLERKOM, J., ANTCZAK, M., SHAFER A., WITTMER, S., SNODGRASS, H.R. 1997. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 467–472, 1997.

COX, J.F., ALFARO, V. In Vitro Fertilization and Development of OPU Derived Goat and Sheep Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 83–87, 2007.

CRAIG, J., ZHU, H., DYCE, P.W., PETRIK, J., LI, J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Endocrinology**, v. 145, p. 5355–5363, 2004.

DANIEL, P.T.; WIDER, T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v. 15, p. 1022-1032, 2001.

DEVERAUX, Q.L.; REED, J.C. IAP family proteins- suppressors of apoptosis. **Genes & Development**, v. 13, p. 239-252, 1999.

EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C.; O'BRIEN, M.J. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.119-127, 1992.

FIGUEIREDO, J.R.; AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M.; GONÇALVES, P.B.D. Utilização do potencial de oócitos imaturos incluídos em folículos pré-antrais na reprodução de mamíferos. **Ciência Animal**. v.8, n.1, p. 23-29, 1998.

FONSECA, J. F. **Biotécnicas da Reprodução em Ovinos e Caprinos**. EMBRAPA, 2006. Sobral -CE

GONZALEZ, R.R.; CABALLERO-CAMPO, P.; JASPER, M.; MERCADER, A.; DEVOTO, L.; PELLICER, A.; SIMON, C. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, p. 4883–4888, 2000.

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: CAB International: Raven Press, p. 4349, 1994.

GRAFF, K.J.; MEINTJES, M.; DYER, V.W.; PAUL JB, DENNISTON, R.S.; ZIOMEK, C.; GODKE, R.A. Transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology**, v. 51, p. 1099–1119, 1999.

GREENWALD, G.S., ROY, S. Follicular development and its control. In: Knobil E, Neill JD, editors. **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press. 1994. p. 629–724.

GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; HAIBEL, G. K. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 127-135, 1986.

HARVEY, J. Leptin: A multifaceted hormone in the central nervous system. **Molecular Neurobiology**, v. 28, p. 245-258, 2003.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HSU, S.Y.; HSUEH, A.J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis. An ovarian paradigm. **Physiological Reviews**, v.80, p.593-614, 2000.

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

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Pesquisa Pecuária Municipal. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 14 de Setembro de 2011.

KAWAMURA, K., SATO, N., FUKUDA, J., KODAMA, H., KUMAGAI, J., TANIKAWA, H., NAKAMURA, A., TANAKA, T. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. **Endocrinology**, v. 143, p. 1922–1931, 2002.

KREUZER, K.A.; LASS, U.; LANDT, O.; NITSCHKE, A.; LASER, J.; ELLERBROK, H.; PAULI, G.; HUHN, D.; SCHMIDT, C.A. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. **Clinical Chemistry**, v. 45, p. 297–300, 1999.

LEMOINE, N.R. **The c-ras oncogenes and GAP**. London: John Willey & Sons; 1990.

LIN, J.; YAN, G.T.; WANG, L.H. Leptin fluctuates in intestinal ischemia-reperfusion injury as inflammatory cytokine. **Peptides**, v. 25, p. 2187-2193, 2004.

MARTINS, F. S.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.36-49, 2008.

MATOKA, S.; KANG, J.G.; PATINO, W.D.; WRAGG, A.; BOEHM, M.; GAVRILOVA, O.; HURLEY, P.J.; BUNZ, F.; HWANG, P.M. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science** (New York), v. 312, p. 1650–1653, 2006.

MATSUOKA, T., TAHARA, M., YOKOI, T., MASUMOTO, N., TAKEDA, T., YAMAGUCHI, M., TASAKA, K., KURACHI, H., MURATA, Y. Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, p. 480–484, 1999.

MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. **Endocrine Reviews**, v.21, p.200–214, 2000.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. Início do desenvolvimento humano. In: Moore, K.L. e Persaud, T.V.N. **Embriologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5<sup>a</sup> ed., 1994. p. 13-38.

MORAES-VIEIRA, P. M. **Leptina: Um modulador central das respostas imunes**. Tese (Doutorado em Imunologia)- São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo- São Paulo, 2011.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 299-306, 1997.

PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, p. 83-94, 2004.

RAPPOLEE, D.A.; MARK, D.; BANDA, M.J.; WERB, Z. Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping. **Science**, v. 241, p. 708–712, 1988.

RODRIGUEZ, C. ANEL, L. ALVAREZ, M. ANEL, E. BOIXO, J.C. CHAMORRO, C.A. PAZ, P. Ovum Pick-Up in Sheep: A Comparison between Different Aspiration Devices for Optimal Oocyte Retrieval. **Reprod. Dom. Anim.** v. 41, p. 106-113, 2006.



SABBATINI, P.; LIN, J.; LEVINE, A. J.; WHITE, E. Essential role for p53-mediated transcription in E1A induced apoptosis. **Genes & Development**, v.9, p.2184–2192, 1995.

SABLINA, A.A.; BUDANOV, A.V.; ILYINSKAYA, G.V.; AGAPOVA, L.S.; KRAVCHENKO, J.E.; CHUMAKOV, P.M. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. **Nature Medicine**, v. 11, p. 1306–1313, 2005.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.167, p. 205-218, 1991.

SCOTT, J.E.; CARLSSON, I.B.; BAVISTER, B.D.; HOVATTA, O. Human ovarian tissue cultures: extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions. **Reproductive Biomedicine Online**, v.9, p. 287-293, 2004.,

SHERR, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Research**, v. 60, p. 3689-3695, 2000.

STANGL, M.; KUH HOLZER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. **Theriogenology**, v. 52, p. 709–716, 1999.

SUH, C. S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G. F. The ovarian life Cycle: A contemporary view. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v.3, p.5-12, 2002.

SWAIN, J.E.; DUNN, R.L.; MCCONNELL, D.; GONZALEZ-MARTINEZ, J.; SMITH, G.D. Direct effects of leptin on mouse reproductive function: regulation of follicular, oocyte, and embryo development. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1446–1452, 2004.

TARTAGLIA, L.A. The leptin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 6093-6096, 1997.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; OLIVEIRA, M.E.F.; MOTHEO, T.F.; SILVA, A.S.L.; BARROS, F.F.P.C.; COUTINHO L.N.; FLÔRES, F.N.; LOPES, M.C.S.; BANDARRA, M.B.; SILVA, M.A.M.; VASCONCELOS, R.O.; RODRIGUES, L.F.S.; VICENTE, W.R.R. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic

evaluation of the ovary and influence on oocyte production. **Animal Reproduction Science**, v.127, p.169–175, 2011.

TERVIT, H.R.; SMITH, J.F.; MCGOWAN, L.T.; PUGH, P.A. Birth of lambs from embryos produced *in vitro* following laparoscopic recovery of follicular oocytes. **Proceedings of Australian Society for Reproductive Biology**, v. 27, p. 68, 1995.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p. 1717-1751, 2005.

WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P. W.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.942-948, 1996.

WANG, T.; BROWN, M.J. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 198–201, 1999.

WILLIAMS, C. J.; ERICKSON, G. F. Morphology and physiology of the ovary. **Endotext**. <http://www.endotext.org/chapter/morphology-and-physiology-of-the-ovary/> 2012.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J.L.M.R.; DEWULF, J.; VAN ZEVEEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v 63, p. 2147-2163, 2005.

ZAMORANO, P.L.; MAHESH, V.B.; BRANN, D.W. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview. **Neuroendocrinology**, v. 63, p. 397–407, 1996.

## **5 ARTIGO**

### **Expressão de fatores reguladores da apoptose, leptina e seu receptor em complexos cumulus-oócito de ovinos**

(O artigo formatado para o periódico Animal Reproduction Science)

Disponíveis em: <http://www.journals.elsevier.com/animal-reproduction-science/>

**Expressão de fatores reguladores da apoptose, de leptina e de receptor de leptina em complexos cumulus-oócito de ovinos**

**D.M.F. SILVA<sup>a,\*</sup>, A.M BATISTA<sup>b</sup>, S.S DUARTE<sup>a</sup>, S.S.N ROCHA<sup>a</sup>, E.N.B. MONTARROYOS<sup>a</sup>, C.R.C. SILVA<sup>a</sup>, M. ADRIÃO<sup>a</sup>, A. WISCHRAL<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Dpto de Morfologia e Fisiologia Animal, FAMA, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

<sup>b</sup> Dpto de Medicina Veterinária, ANDROLAB, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

\* E-mail contato (Autor): [diogodmfs@hotmail.com](mailto:diogodmfs@hotmail.com) tell: (81) 9485-2843

---

**Resumo**

Fatores reguladores da apoptose podem determinar a viabilidade de oócitos, entretanto há poucos estudos referentes à ação dos genes destes fatores no desenvolvimento do complexo cumulus-oócito (COC) de folículos antrais, nem sua relação com a Leptina (LEP) e seu receptor (LEPR) em ovinos. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do mRNA da LEP, LEPR, e dos fatores que levam a regulação da apoptose (Bcl-2, Bax, p53 e caspase), em oócitos (OO) e células do cumulus (CC) de folículos antrais ovinos de diferentes tamanhos. Foram avaliados 20 pools de OO (20 unidades) e de CC (de 20 COC) obtidos de folículos  $> 3$  mm e  $\leq 3$  mm. A expressão gênica foi avaliada pela extração do mRNA e posterior amplificação do cDNA em real time PCR. Bcl2, p53 e caspase 3 foram expressos em todas as categorias de células e tamanho folicular. A expressão da Bax foi observada apenas em oócitos. LEP e LEPR foram expressos apenas em CC. A maior expressão dos fatores promotores da apoptose foi em OO  $> 3$ mm, enquanto a Bcl2 (anti-apoptótica) foi mais expressa nos OO  $\leq 3$  mm. Comparando OO com CC das mesmas categorias de folículos, houve maior expressão de Bcl2 nos OO  $\leq 3$  mm, e menor de p53 nos OO  $> 3$ mm. LEPR foi mais expressa em CC  $> 3$ mm. Houve correlação positiva entre a expressão de p53 e BAX em oócitos ( $r = 0,06$ ), e entre Bax em OO e LEPR em CC ( $r = 0.64$ ). Conclui-se que a expressão dos genes anti- e pró-apoptóticos em COC pode estar relacionada com o desenvolvimento folicular e oocitário, sendo que os menores ( $\leq 3$  mm) apresentam menor expressão dos fatores promotores da apoptose. Adicionalmente, a leptina pode ser um fator regulatório do desenvolvimento oocitário devido a presença de seus receptores nas CC.

Palavras-Chave: Expressão gênica, mRNA, apoptose, folículos ovarianos, leptina

### **Abstract**

Factors regulating apoptosis can determine the oocyte viability; however there are few studies about the genes of these factors and their action in the antral follicles cumulus-oocyte complex (COC) development, neither about the relationship with Leptin (LEP) and its receptor (LEPR) in sheep. The aim of this study was evaluate the mRNA expression of *LEP*, *LEPR*, and the apoptotic regulating factors (Bcl-2, Bax, p53 and caspase 3), in oocytes (OO) and cumulus cells (CC) from different sizes of antral follicles. Twenty pools of OO (20 unities) and of CC (from 20 COC) harvested from follicles  $> 3$  mm and  $\leq 3$  mm were evaluated. The gene expression was determined after mRNA extraction and further cDNA amplification by real time PCR. Bcl2, p53 and caspase 3 genes were expressed in all cells and follicles size. Bax expression was observed only in OO. *LEP* and *LEPR* were expressed only in CC. The expression of apoptosis promoting factors was higher in OO  $> 3$ mm, while Bcl2 (anti-apoptotic) expression was higher in OO  $\leq 3$  mm. Comparing OO with CC from the same size of follicles, there was higher expression of Bcl2 in OO  $\leq 3$  mm, and lower expression of p53 in OO  $> 3$ mm. *LEPR* tended to be more expressed in CC  $> 3$ mm than  $\leq 3$  mm. Was observed a positive correlation between p53 and BAX expression in OO ( $r = 0.06$ ), and between Bax in OOs and *LEPR* in CCs ( $r = 0.64$ ). It was concluded that the expression of anti- and pro-apoptotic genes in COC can be related to the follicle and oocyte development, since follicles  $\leq 3$  mm presented lower expression of factors promoting apoptosis. Additionally, leptin can be a regulatory factor of oocyte development due presence of *LEPR* in CC.

**Key words: Gene expression, mRNA, apoptosis, ovarian follicles, leptin**

### **1. Introdução**

O entendimento dos fatores que estão relacionados ao desenvolvimento do oócito e a fatores reguladores da apoptose, durante a foliculogênese, são importantes para determinar a sua viabilidade, estabelecendo indicadores de qualidade para um perfeito desenvolvimento embrionário inicial. Durante o desenvolvimento folicular apenas um número limitado de folículos são selecionados para ovulação, ao passo que os restantes sofrem atresia nas várias fases do desenvolvimento (Baker et al., 1972; Mariana et al., 1991).

Durante a foliculogênese, a apoptose é considerada o mecanismo básico de atresia folicular (Hsueh et al., 1994). Este processo elimina as células de uma forma controlada por genes e desempenha um papel importante no ovário (Goodman & Hodgen, 1993). No folículo ovariano, a apoptose pode ser ativada nas células da teca, células granulosas (Yang & Rajamahendram, 2000), células do cumulus (Yuan et al., 2005) e oócito (Yang & Rajamahendram, 2002). Estudos anteriores mostraram que os sinais apoptóticos aparecem inicialmente nas camadas externas das células do cumulus, enquanto que o oócito é o último componente do complexo cumulus-oócito (COC) afetado pela apoptose (Hussein et al., 2005).

A apoptose em células foliculares vizinhas influencia a capacidade de desenvolvimento dos oócitos (Yuan et al., 2005; Yang & Rajamahendram, 2000). No entanto, os sinais visíveis de atresia precoce nas células foliculares pode não necessariamente prejudicar o desenvolvimento do oócito, mas, pelo contrário, pode promover os oócitos a adquirir a capacidade de desenvolvimento (Hendriksen et al., 2000; Han et al., 2006).

Alguns parâmetros são utilizados para determinar a qualidade do oócito como diâmetro do folículo e OO, morfologia do complexo cumulus-oócito (COC) (Anguita et al., 2007; Han et al., 2006), níveis dos fatores de crescimento como a IGF-I (Manikkam et al., 1997), G6PDH (Mohammadi-Sangcheshmeh et al., 2011) e GDF-9 (McPherron & Lee, 1993), e fatores reguladores da apoptose como as proteínas pertencentes a família Bcl-2 (Bcl-2 e Bax), caspase (Yuan et al., 2005) e a p53 (Sabatine et al., 1995).

O estudo de expressão gênica em COCs não só permitirá uma melhor compreensão da regulação do crescimento e maturação do oócito, mas também poderá produzir marcadores moleculares para o potencial de desenvolvimento do oócito ovino. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão dos genes relacionados com a apoptose (Bcl-2, Bax, Caspase-3, p53 e leptina) em oócitos e células de cumulus isoladas de COCs oriundos de folículos de diferentes tamanhos.

## **2. Material e Método**

### *2.1. Coleta*

Foram coletados ovários de ovelhas (*Ovis aries*) adultas, abatidas no matadouro municipal de Paudalho/PE. Os ovários foram transportados ao laboratório em soro

fisiológico, acondicionados em gelo (4 °C). Os ovários foram usados para obter os complexos cumulus-oócitos (COC) por aspiração de pequenos ( $\leq 3\text{mm}$ ) e grandes ( $> 3\text{mm}$ ) folículos antrais (Batista et al., 2013). Foram utilizados somente COCs envolvidos por pelo menos três camadas de células do cumulus e oócito com citoplasma granuloso, além de não apresentarem sinais morfológicos de apoptose como retração celular e núcleo picnótico (Araújo et al., 2010).

Após a coleta dos COCs, as células do *cumulus* (CC) foram separadas mecanicamente, através de sucessivas pipetagens de cada COC, sob estereomicroscópio, até que nenhuma célula do cumulus estivesse aderida ao oócito (OO). Pools de OOs desdudados e CCs obtidas de 20 COCs, de cada tamanho folicular, foram coletadas e imediatamente submetidas a extração do RNA total. O experimento foi realizado com 20 replicatas, totalizando 400 OOs e CCs por categoria de tamanho (folículos antrais  $< 3\text{ mm}$  e  $\geq 3\text{mm}$ ).

## 2.2. *Extração do RNA total e Transcriptase Reversa.*

O RNA total foi extraído de cada pool de células utilizando kit RNeasy<sup>®</sup> Micro (QIAGEN<sup>®</sup>) de acordo com o protocolo do fabricante. Para eliminar a contaminação com DNA genômico, todas as amostras de RNA foram tratadas com RNA-free DNase (Promega, Madison, USA). O RNA foi quantificado pela absorbância em 260 nm e a pureza do RNA foi determinada baseada na relação de 260/280 nm por espectrofotometria (BioMate<sup>TM</sup>3, Thermo<sup>®</sup>) e somente amostras com realação entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas.

Para obtenção do DNA complementar total (cDNA) foi utilizado o Kit ImProm-II<sup>(TM)</sup> Reverse Transcription System (Promega<sup>®</sup>). Foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  do primer (iniciador da reação) Oligo(dT)<sub>15</sub> ao volume de 4  $\mu\text{L}$  do RNA total (até 1 $\mu\text{g}$ ), em seguida incubado em termobloco a 70 °C por 5 minutos e esfriado a 4 °C por 5 minutos. A essa mistura foi adicionado 4  $\mu\text{L}$  do buffer Improm-II<sup>TM</sup> (5X), 2,4  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTP (0,5mM de cada dNTP) e 1,0 da enzima transcriptase reversa Improm-II<sup>TM</sup>, totalizando um volume final de 20  $\mu\text{L}$  da reação, incubada em termobloco 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e inativação da enzima em 70 °C por 15 minutos.

## 2.3. *Quantificação do cDNA*

A concentração das amostras de cDNA total foi avaliada no espectrofotômetro (BioMate™3 da Thermo®) na diluição 1:250. As amostras foram padronizadas na concentração de 100 ng/μL e estocadas em freezer – 80 °C.

#### 2.4. PCR Real-Time (RT-PCR).

A expressão do mRNA para os genes relacionados à apoptose (Bcl2, Bax, p53 e Caspase-3) e para os genes de leptina (*LEP*) e seu receptor (*LEPR*) foi avaliada a partir da amplificação de segmentos dos genes com os oligonucleotídeos iniciadores relacionados na Tabela 1. Os iniciadores das amplificações dos genes da Bcl2, Bax, p53 e caspase-3 foram construídos utilizando o programa Primer 3 Plus (Untergasser et al., 2007) com base nas sequências nucleotídicas obtidas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD). A sequência dos iniciadores para os genes *LEP* e *LEPR* foi estabelecida por Batista et al. (2013), as quais apresentaram 100% de homologia para a espécie ovina.

As reações de Real-time PCR foram realizadas com o kit de amplificação Qiagen - Quantifast™ SYBR Green PCR, em termociclador (Rotor-Gene Q da Qiagen®), as reações foram realizadas em duplicadas com controle negativo para identificar reações inespecíficas.

Em cada reação foram utilizados 2,0 μL do cDNA (100ng/μL), 7,5 μL do Qiagen - Quantifast™ SYBR Green PCR, 0,5 μL de primer sense e anti-sense (10 pM) e 5,5μL de H<sub>2</sub>O Milli Q, totalizando um volume final de 15 μL. Os seguintes ciclos foram empregados: temperatura inicial de 95°C por 5 min (ativação da enzima), 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos (captação da fluorescência) . As condições do Melting foram: temperatura de 60 a 95°C, com incremento de 0,5°C/5segundos.

O gene de referência utilizado para normatizar as expressões dos genes em estudo foi o β-Actin. A quantificação relativa da expressão dos genes foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak; Schmittgen, 2001).

#### 2.5. Análise Estatística

Os dados que não foram normalmente distribuídos de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov, foram transformados em raiz quadrada ou logaritmo natural. Os



dados de Bcl2, p53 e caspase-3 foram analisados por análise de variância e pelo teste de Tukey quando houve diferença significativa. Já os dados de Bax e *LEPR* foram analisados pelo teste t de Student (Graphpad Instat, version 3.10; 2009, SA). A correlação entre duas variáveis específicas foi determinada com o teste de Pearson. A probabilidade  $P \leq 0.05$  indicou que a diferença foi significativa, e probabilidades entre  $P > 0.05$  e  $\leq 0.1$  indicaram que a diferença se aproximou da significância (tendência). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.).

**Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos usados para a amplificação de cada gene em reações de PCR Real-Time**

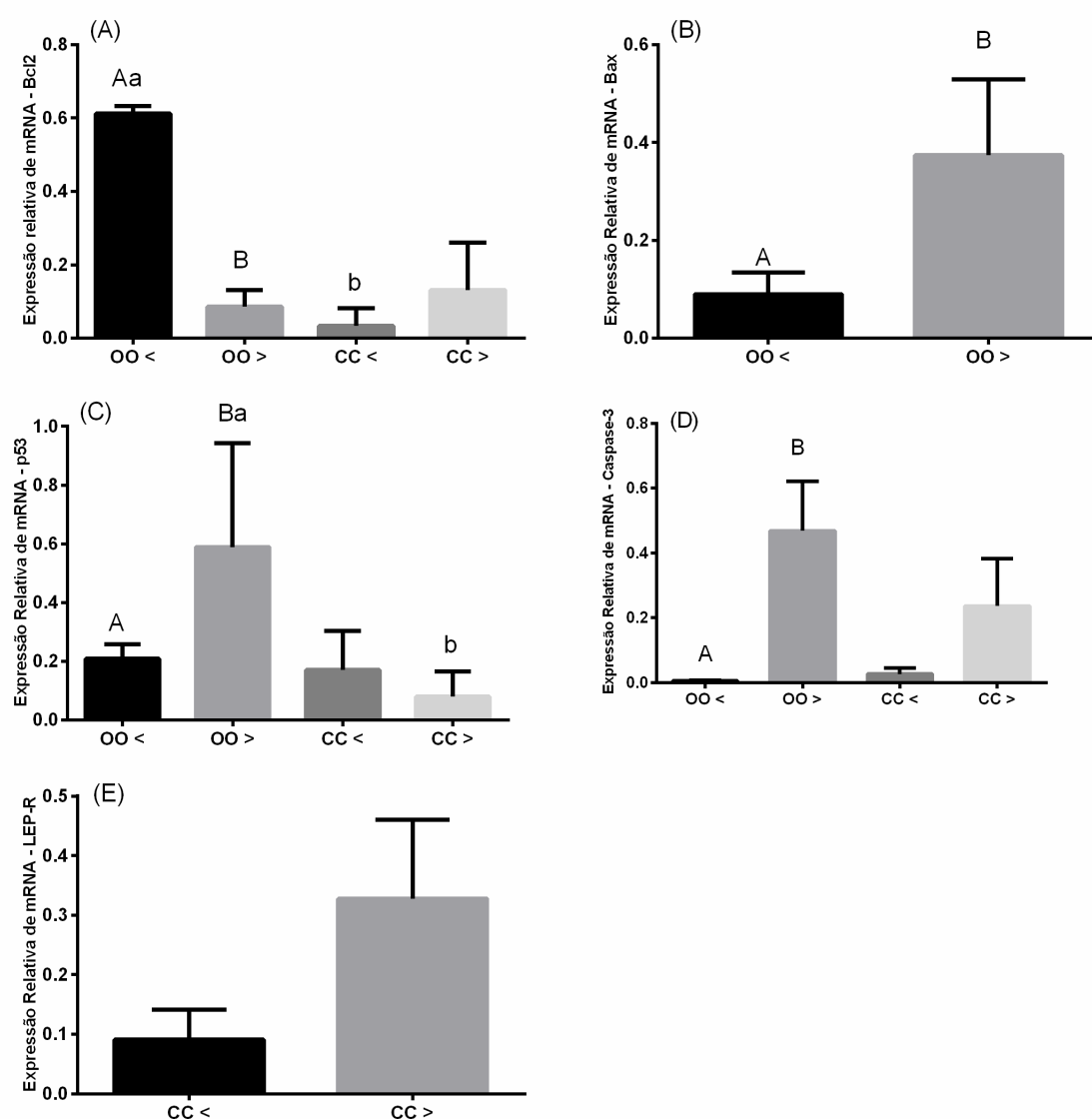
Gene	Sequência	Amplificação (bp)	Referência/GeBank
Bcl2	F:ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA R:CTAGGGCCATACAGCTCCAC	146bp	DQ152929.1
Bax	F:GCAGAG GATGAT CGCAGCTG R:CAGGGCCTTGAGCACCAG	148bp	U92569
Caspase	F: AAGCCATGGTGAAGAAGGAA R: TGTCGTCCTCAGAACCACTG	133bp	XM_004021690.1
p53	F:GGGGAAAGCAGGGCTCACTCT R:GGGATATGGGTGGGGATGTCAA	151bp	FJ855223.1
<i>LEP</i>	F:GCCTATGTGGGCATCCTTTA R:TGGAACAGGGAGGAAGACTG	199bp	Batista et al (2013)/ GU944974
<i>LEPR</i>	F:GCTCTGCTTTTGACGACTCC R:ATAAGCCCTTGCTCCTCCTC	196bp	Batista et al (2013)/ AY846770
$\beta$ -Actin	F:ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT R:TCCTTGATGTCACGGACGATTTC	200bp	Celestino et al., (2010)/AF481159

### 3. Resultados

Os resultados relativos a expressão do mRNA dos genes estudados estão apresentados na Figura 1. A expressão dos fatores relacionados à regulação da apoptose (Bcl2, Caspase-3 e p53) foi detectada nos OO e nas CC de folículos menores e maiores. A expressão do gene da Bax foi observada em OO, independente do tamanho do folículo, entretanto não foi observada a expressão de Bax em nenhuma categoria de CC. As expressões do mRNA de *LEP* e de *LEPR* não foram detectadas nos OO em nenhuma categoria de folículos. Nas CC, foi determinada a expressão de *LEP* apenas nos

folículos menores. Por outro lado, foi observada expressão de *LEPR*, nas CC nos dois tipos de folículos, com tendência a ser maior nos folículos > 3 mm ( $P = 0,1$ ).

A expressão do mRNA para o gene da Bcl2 foi maior em OO derivados de folículos menores do que em CC de folículos menores e do que OO dos folículos maiores ( $P < 0,0001$ ). Não foi observada diferença para a expressão da Bcl2 entre CC de diferentes tamanhos de folículos ( $P > 0,05$ ).



**Figura 1:** Níveis relativos de mRNA dos genes Bcl2 (A), Bax (B), p53 (C), Caspase-3 (D), e *LEPR* (E), em oócitos (OO) e células do cumulus (CC) de folículos maiores ou

menores do que 3 mm. Letras maiúsculas, sobre a barra, indicam diferenças de expressão entre os mesmos tipos de células isoladas a partir de folículos de diferentes tamanhos ( $P < 0,001$ ). Letras minúsculas indicam diferenças entre os diferentes tipos celulares isoladas a partir de folículos na mesma categoria de tamanho ( $P < 0,001$ ).

Considerando os genes Bax e p53, observou-se maior expressão em OO derivados de folículos maiores ( $P < 0,01$ ) do que os menores. Apesar de ter sido observada a expressão do gene p53 nas CC, não foi observada diferença entre folículos de diferentes tamanhos. O mRNA para o gene Caspase 3 foi mais expresso ( $P < 0,0001$ ) em OO de folículos maiores, do que OO de folículos menores, entretanto não houve diferença significativa entre as CC derivadas de folículos menores e maiores ( $P > 0,05$ ).

A análise de correlação entre a expressão do mRNA dos genes p53 e Bax em oócitos de folículos menores e maiores, demonstrou haver correlação positiva entre a expressão dos dois genes ( $r = 0,66$ ,  $P = 0,02$ ). Também foi observada correlação positiva entre Bax nos OO e LEPR nas CC ( $r = 0,64$ ).

#### **4. Discussão**

A análise da expressão relativa dos mRNA dos fatores que regulam a apoptose (Bcl2, Bax, p53 e Caspase 3) e do fator crescimento *LEP* e seu receptor (*LEPR*), demonstrou haver diferenças entre as células do COC e entre os tamanhos de folículos.

De um modo geral, os genes reguladores da apoptose em ovelhas foram expressos tanto nos OO e CC de folículos antrais menores e maiores que 3 mm. Níveis de apoptose em CC podem ser utilizados como marcadores de viabilidade do oócito para posterior desenvolvimento embrionário. Em estudos *in vitro*, baixo nível de atresia observado nas células do cumulus não afetou o desenvolvimento embrionário (bovinos, Blondin; Sirard, 1995) e a qualidade embrionária (humanos, Høst et al., 2000). Com isso, pode-se supor que as células do cumulus sofrem apoptose devido ao estresse metabólico sofrido ao dar suporte nutricional ao oócito através junções do tipo gap, já que são responsáveis por transporte de moléculas e por transmitir sinais elétricos entre a CC e o OO (Boni et al., 2002). Vassena et al. (2002) relataram que a atresia folicular precoce tem efeito benéfico para a competência de oócito, entretanto o mecanismo de ação ainda é desconhecido.

Os níveis de mRNA para o gene Bcl-2 foram aumentados enquanto os níveis para os genes Bax, p53 e Caspase 3 foram reduzidos em OO de folículos menores, indicando que essas células podem apresentar menor ação da apoptose em relação aos OO de folículos maiores. Yange et al. (1998) determinaram que folículos médios e grandes apresentavam níveis elevados de Bax em relação a folículos pequenos, sugerindo que os folículos menores tendem a ser mais saudáveis e que boa parte dos folículos grandes podem estar em processo de degeneração. A comunicação do OO com as células do cumulus (CC) é um parâmetro que pode determinar a qualidade do oócito já que suas conexões permitem a troca de moléculas entre si através de junções do tipo GAP (Tanghe et al., 2002), levando a determinar que a incidência de apoptose em células do cumulus pode afetar a qualidade do oócito (Yuan et al., 2005; Corn et al., 2005).

A observação da correlação positiva entre os genes p53 e Bax nos oócitos deste estudo, corrobora com Sirotkin et al. (2012), que determinaram que a p53 estimula os níveis de Bax em ovário suíno, indicando a atuação da p53 na indução da apoptose nas células foliculares. A relação inversa entre a expressão do gene Bax, estimuladora da apoptose (pró-apoptótica), e do gene Bcl-2, que possui ação anti-apoptótica, pela prevenção da liberação de citocromo-c (Borner, 2003; Hengartner, 2000), leva a ativação da Caspase 3 (proteína efetora da apoptose) (Zheng e Flavell, 2000; Kumar, 2007) aumentando a permeabilidade da membrana mitocondrial e estabelecendo a morte celular caspase dependente (Arnooult et al., 2003). O gene p53 é um mediador na resposta ao estresse celular, tendo sua ação no mecanismo de reparo do DNA e na remoção de células danificadas através do processo de apoptose, regulando a expressão de Bax (Sabbatini et al., 1995). Por isso, níveis aumentados de p53 induzem o aumento dos níveis de Bax, com objetivo de reparar os danos celulares que poderá levar a apoptose.

Quanto a leptina, o estudo demonstrou que o mRNA dos genes *LEP*, em folículos menores, e *LEPR*, em folículos menores e maiores, foram expressos apenas nas CC's. Muñoz-Gutiérrez et al. (2005) conseguiram determinar a expressão de receptor de leptina em células da granulosa e de leptina nas célula da granulosa e teca, esses achados corroboram com a os deste estudo em relação a expressão de *LEPR* nas células do cumulus, já que elas representam uma diferenciação das células da granulosa.

A presença do mRNA da *LEPR* nas CC de folículos menores e maiores, sugere que essas células sejam sensíveis a estímulos da *LEP*. Em bovinos, a expressão de *LEPR* em células do cumulus e oócitos já foi determinada, onde o estudo demonstrou que adição de *LEP* durante o cultivo *in vitro* aumentou a maturação nuclear quando os oócitos estavam envoltos com células do cumulus, estimulando o desenvolvimento do oócito, entretanto o mesmo não aconteceu com oócitos desnudos (ausência de células do cumulus), indicando a possibilidade da leptina influenciar as células do cumulus a produzir fatores que atuem no oócito via junção do tipo gap (Paula-Lopes et al., 2007).

A expressão do gene do *LEPR* nas CC de folículos maiores foi positivamente correlacionada com a expressão do gene *Bax* (promotor da apoptose) no OO, podendo sugerir que o aumento nos níveis do receptor tem o objetivo de proporcionar a ação da *LEP* que iria atuar no OO através das junções do tipo gap das CC, principalmente na maturação nuclear do OO.

Neste estudo, o gene do *LEPR* nas CC tendeu a ser mais expresso em folículos maiores do que nos menores, estes dados corroboram com os achados de Batista et al. (2013), que observaram o mesmo comportamento da expressão do gene do *LEPR* nas células da granulosa de caprinos.

As diferenças observadas entre folículos maiores e menores deste estudo, do ponto de vista da apoptose, devem ser avaliados considerando a dinâmica folicular. Folículos que ainda estão em crescimento ( $\leq 3$  mm), apresentaram menor expressão de genes relacionados a apoptose do que aqueles que já estabeleceram a dominância ( $> 3$ mm). Por outro lado, os níveis elevados de caspase 3 observados nos OOs de folículos maiores em relação aos menores, podem estar relacionados a folículos que já estariam submetidos ao processo de atresia, pela presença de um folículo dominante e consequente privação de hormônios gonadotróficos que permitiriam a sua manutenção na fase final do desenvolvimento.

O crescimento folicular é um processo contínuo e independente da fase do ciclo estral (Uribe-Velásquez et al., 2011). Durante um ciclo ocorrem, em média, 3 ondas foliculares quando são recrutados grupos de folículos (Ginther et al., 1989; Knopf et al., 1989), cujo crescimento é promovido pela estimulação do hormônio folículo estimulante (FSH) (Viñoles et al., 2002). Em pequenos ruminantes apenas os folículos maiores que 2 mm podem ser recrutados, os folículos menores são menos sensíveis ao

recrutamento (Driancourt et al., 1985). Normalmente, um folículo exercerá sua dominância enquanto os remanescentes (folículos pequenos e médios 2-5 mm) sofrem regressão ou atresia devido a diminuição do FSH (Vassena et al., 2002; Menchaca et al., 2010) e ação da inibina (Viñoles et al., 2002). Segundo Hagemann et al. (1999), a presença de folículos dominantes afeta irreversivelmente o desenvolvimento de folículos médios, comparado com folículos menores ( $\leq 3\text{mm}$ ) e maiores (ovulatórios).

Em conclusão, o estudo determinou que os genes responsáveis pela regulação da apoptose estão presentes em OO e CC de folículos antrais e os genes promotores da apoptose (Bax e Caspase-3) são mais expressos em folículos maiores, sugerindo que os COCs obtidos de folículos maiores são mais afetados pelo processo de morte celular. A *LEP* e o *LEPR* são expressos apenas em CC sugerindo que a *LEP* e seu receptor tenham ação na regulação do crescimento folicular e maturação de oócitos de ovinos, no entanto estudos mais aprofundados são necessários para determinar este mecanismo de ação.

## Referências

- Anguita, B., Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D., Van Soom, A. 2007. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology*. 67. 537–549.
- Araújo, V. R., Silva, C.M.G., Magalhães, D.M., Silva, G.M., Bão, S.N., Silva, J.R.V., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P. 2010. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. *Pesq. Vet. Bras.* 30. 305-310.
- Baker, H.W., Burger, H.G., Hudson, B., De Kretser, D.M. 1972. Partial hypogonadotropic hypogonadism: studies of pituitary function and of pituitary-testicular relationship in two patients. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 50. 861-872.
- Batista, A.M., Silva, D.M.F., Rêgo, M.J.B.M., Silva, F.L.M., Silva, E.C.B., Beltrão, E.I.C., Gomes Filho, M.A., Wischral, A., Guerra, M.M.P. 2013. The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 141. 142– 147.
- Blondin, P., Sirard, M.A. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41. 54-62.

- Boelhaue, M., Sinowatz, F., Wolf, E., Paula-Lopes, F.F. 2005. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol. Reprod.* 73. 737–744.
- Boni, R., Cuomo, A., Tosti, E. 2002. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade. Calcium current activity, and calcium stores. *Biol. Reprod.* 66. 836-842
- Borner, C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.* 39. 615-647.
- Celestino, J.J.H., Bruno, J.B., Lima-Verde, I.B., Matos, M.H.T., Saraiva, M.V.A., Chaves, R.N., Martins, F.S., Almeida, A.P., Cunha, R.M.S., Lima, L.F., Name, K.P.O., Campello, C.C., Silva, J.R.V., Bão, S.N., Figueiredo, J.R., 2010. Steady-state level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth in vitro. *Mol.Reprod. Dev.* 77. 231–240.
- Corn, C.M., Hauser-Kronberger, C., Moser, M., Tews, G., Ebner, T. 2005. Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. *Fertil. Steril.* 84. 627–633.
- Driancourt, M. A., Cahill. L.P. 1984. Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 71. 205-211.
- Ginther, O.J., Knopf, L., Kastelic, J.P. 1989. Temporal association among ovarian events in cattle during oestrouscycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 87. 223–230.
- Goodman, A.L., Hodgen, G.D. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* 39. 1–73.
- Hagemann, L., Beaumont, S., Berg, M., Donnison, M., Ledgard, A., Peterson, A., 1999. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.* 53. 451–458.
- Han, Z-B., Lan, G-C., Wu, Y-G., Han, D., Feng, W-G., Wang, J-Z., Tan, J-H. 2006. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus–oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction.* 132. 749–758.
- Hendriksen, P.J., Vos, P.L., Steenweg, W.N., Bevers, M.M., Dieleman, S.J. 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology.* 53. 11–20.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407. 770-776.
- Høst, E., Mikkelsen, A.L., Lindenberg, S., Smidt-Jensen, S. Host, E., 2000. Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of corresponding oocyte. *Acta Obst. Gynecol. Scand.* 79. 936-940.

- Hsueh, A.J.W., Billig, H., Tsafiriri, A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* 15. 707–724.
- Hussein, T.S., Froiland, D.A., Amato, F., Thompson, J.G., Gilchrist, R.B. 2005. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell Sci.* 118. 5257–5268.
- Knopf, L., Kastelic, J.P., Schallenberger, E., Ginther, O.J. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 6. 111–119.
- Kumar, S. 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 14. 32–43. (doi:10.1038/sj.cdd.4402060)
- Livak, K., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25, 402–408.
- Manikkam, M., Rajamahendran, R. 1997. Progesterone-induced atresia of the proestrous dominant follicle in the bovine ovary: changes in diameter, insulin-like growth factor system, aromatase activity, steroid hormones, and apoptotic index. *Biol. Reprod.* 57. 580–587.
- Mariana, J.C., Monniaux, D, Driancourt, M.A., Mauleon, P. Folliculogenesis. 1991. In: Cupps PT (ed.), *Reproduction in Domestic Animals*, 4th ed. San Diego, CA: Academic Press. 119–171.
- McPherron, A.C., Lee, S.J. 1993. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J. Biol. Chem.* 268. 3444–3449.
- Menchaca, A., Vilarino, M., Crispo, M., Castro, T., Rubianes, E. 2010. New treatments approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod. Fertil. Develop.* 22. 113-118.
- Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Held, E., Ghanem, N., Rings, F., Salilew-Wondim, D., Tesfaye, D. 2011. G6PDH-activity in equine oocytes correlates with morphology, expression of candidate genes for viability, and preimplantative in vitro development. *Theriogenology.* 76. 1215–1226.
- Muñoz-Gutiérrez, M., Findlay, P.A., Adam, C.L., Wax, G., Campbell, B.K., Kendall, N.R., Khalid, M., Forsberg, M., Scaramuzzi, R.J., 2005. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. *Reproduction.* 130. 869–881.
- Paula-Lopes, F.F., Boelhauve, M., Habermann, F.A., Sinowatz, F., Wolf, E. 2007. Leptin Promotes Meiotic Progression and Developmental Capacity of Bovine Oocytes Via Cumulus Cell-Independent and -Dependent Mechanisms. *Biol.Reprod.* 76. 532–541.



- Sabbatini, P., Lin, J., Levine, A. J., White, E. 1995. Essential role for p53-mediated transcription in E1A induced apoptosis. *Genes Dev.* 9. 2184–2192.
- Sirotkin, A.V., Benčo, A., Tandlmajerová, A., Vašíček, D. 2012. Involvement of transcription factor p53 and leptin in control of porcine ovarian granulosa cell functions. *Cell Prolif.* 45. 9–14.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A. 2002. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 61. 414–24.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.M. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35. W71-W74. doi:10.1093/nar/gkm306.
- Uribe-Velásquez, L.F., Souza, M.I.L., Osorio, J.H. 2011. Efeito do tempo da aplicação de prostaglandina na resposta folicular em ovelhas durante o ciclo estral. *Rev. Bras. Zootec.* 40. 985-991.
- Vassena, R., Reuben, J., Mapletoft, R.J., Allodi, J.S., Adams, P. G. 2002. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative of follicular status. *Theriogenology.* 60. 923-932.
- Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., Rubianes, E. 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology,* 51. 13551-1361.
- Yang, H.W., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, H.S., Choi, K.W., Oh, K.S. 1998. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.* 13. 998-1002.
- Yang, M.Y., Rajamahendran, R. 2000. Morphological and Biochemical Identification of Apoptosis in Small, Medium, and Large Bovine Follicles and the Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I on Spontaneous Apoptosis in Cultured Bovine Granulosa Cells. *Biol. Reprod.* 62. 1209–1217.
- Yang, M.Y., Rajamahendran, R. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 70. 159–69.
- Yuan, Y.Q., Van Soom, A., Leroy, J.L.M.R., Dewulf, J., Van Zeveren, A., de Kruif, A., Peelman, L.J. 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology.* 63. 2147-2163.
- Yuan, Y.Q., Van Soom, A., Leroy, J.L., Dewulf, J., Van Zeveren, A., de Kruif, A. 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology.* 63. 2147–2163.
- Zheng, T.S., Flavell, R.A. 2000. Divinations and surprises: genetic analysis of caspase function in mice. *Exp. Cell Res.* 256. 67–73.

## 6 CONCLUSÃO

O estudo determinou que os genes responsáveis pela regulação da apoptose estão presentes em OO e CC de folículos antrais e podem estar relacionados com o desenvolvimento folicular e oocitário. Em folículos menores ( $\leq 3$  mm) há menor expressão dos fatores promotores da apoptose, sugerindo que COC's de folículos menores são mais indicados para serem usados em técnicas de cultivo, maturação e fertilização in vitro. A *LEP* e o *LEPR* são expressos apenas em CC, com maior expressão de seus receptores nas CC  $> 3$ mm, sugerindo que a *LEP* e seu receptor tenham ação na regulação do crescimento folicular e maturação de oócitos de ovinos, no entanto, estudos mais aprofundados são necessários para determinar este mecanismo de ação.

## 7. ANEXO

### Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - UFRPE



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Recife, 24 de Abril de 2013.

#### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto de pesquisa intitulado “Determinação da expressão do mRNA das proteínas relacionadas a apoptose, e folículos e do complexo cumulus ootocius, após cultivo *in situ* e maturação *in vitro*, na espécie ovina”, coordenado pela Profa. Áurea Wschral, Processo Nº 23082.016487/2012-27, Controle E02, está fora da alçada desta Comissão uma vez que o material biológico, ovários, objeto dos estudos, será obtido em matadouros comerciais, sujeitos à legislação específica vigente no país, estando, portanto, dispensado de avaliação de seus aspectos éticos na utilização de animais por esta CEUA.

Carlos Antonio Alves Pontes

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UFRPE