



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

**APOPTOSE EM EMBRIÕES BOVINOS EM ESTÁGIO DE PRÉ-  
IMPLANTAÇÃO SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO E AO FATOR DE  
NECROSE TUMORAL- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**

**BÁRBARA LOUREIRO**

**Recife**

**2006**

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

**BÁRBARA LOUREIRO**

**APOPTOSE EM EMBRIÕES BOVINOS EM ESTÁGIO DE PRÉ-  
IMPLANTAÇÃO SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO E AO FATOR DE  
NECROSE TUMORAL- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Área de Reprodução, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE** em Ciência Veterinária.

**Recife**

**2006**

Ficha catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

L892a Loureiro, Bárbara  
Apoptose em embriões bovinos em estágio de pré-implantação submetidos ao estresse térmico e ao fator de necrose tumoral- $\alpha$  / Bárbara Loureiro. -- 2006.  
94 f.

Orientador : Paulo Fernandes de Lima  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) -  
Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
Departamento de Medicina Veterinária.  
Bibliografia

CDD 636.208.926.4

1. Reprodução animal
2. Apoptose
  3. Embriões
  4. Bovinos
  5. Estresse térmico
  6. Fator de necrose tumoral-alpha
    - I. Lima, Paulo Fernandes
    - II. Título

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

**APOPTOSE EM EMBRIÕES BOVINOS EM ESTÁGIO DE PRÉ-  
IMPLANTAÇÃO SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO E AO FATOR DE  
NECROSE TUMORAL- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**

Dissertação de Mestrado elaborada por

**BÁRBARA LOUREIRO**

Aprovada pela

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima (Orientador)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Dra. Fabiola F. Paula Lopes  
Médica Veterinária

---

Profa. Dra. Ana Maria Carneiro Leão  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Marcos Correia  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife, 24 de abril de 2006

*“Tentar e falhar é, pelo menos, aprender.  
Não chegar a tentar é sofrer a inestimável perda  
do que poderia ter sido.” (Geraldo Eustáquio)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cada dia que posso trabalhar, estudar e ser feliz, por todas as oportunidades e todas as pessoas maravilhosas que conheci.

Aos meus pais, Carlos Alberto B. Loureiro e Maria José B. Loureiro, por todo o amor, dedicação, coragem, apoio e entusiasmo com tudo que faço.

À minha irmã Êmili, à minha prima Giuli, ao meu primo Gabriel, a tia Cau e a todos que mesmo de longe torcem por mim.

Ao meu tio José Maria e a minha tia Bam pela ajuda e carinho que dedicam a mim e toda a minha família em todos os momentos.

A minha vó Margarida que dedicou muitos anos de sua vida se preocupando se eu já tinha comido, tomado banho ou feito as tarefas da escola.

Ao Professor Marcos A. Lemos de Oliveira, que é uns dos principais responsáveis pela minha maior conquista. Sempre buscando o melhor para cada um de seus alunos.

À Fabiola Paula-Lopes pela inestimável atenção e ajuda na realização deste trabalho, na finalização da dissertação e na conquista do futuro doutorado.

Ao Professor Paulo Fernandes de Lima por estar sempre disposto a ajudar e pelo prazer que mostra em ensinar.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária que, nestes nove anos, contribuíram para a minha formação como Medica Veterinária, pesquisadora e cientista.

A coordenação da Pós-Graduação em Ciência Veterinária e ao CNPq pela oportunidade, apoio nas disciplinas e na realização deste trabalho.

Aos amigos Maico Henrique, Erica Xavier, Isabel Lima-Verde pela convivência e amizade.

A todos os amigos que fiz durante a Pós-Graduação Mariana Ramos, Grazielle Aleixo, Sildivane Silva, Viviane Pina, Jorge Motta que sempre me apoiaram nos momentos bons e nos difíceis.

Ao professor Peter J. Hansen por ter me recebido em seu laboratório, ter acreditado na minha capacidade e pelo entusiasmo com a pesquisa.

A todos os amigos do Animal Science Department, Amber Brad, Jeremy Block, Dean Jousan, Maria Beatriz, Katherine Hendriks, Lilian Oliveira, Luiz Augusto de Paula (Guto), Rodrigo de Assis, Moises Franco que me ensinaram, me ajudaram e me apoiaram no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos que fiz nos EUA, americanos, libaneses, hispanos e brasileiros por todos os momentos alegres e inesquecíveis.

A Michel Yaacoub pelo carinho e paciência.

E a todos que estiveram presentes nesta grandiosa conquista.

*Muito Obrigada!*

**Título:** Apoptose em embriões bovinos em estágio de pré-implantação submetidos ao estresse térmico e ao fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

**Autor:** Bárbara Loureiro

**Orientador:** Paulo Fernandes de Lima

## **RESUMO**

Cinco experimentos foram realizados para testar a hipótese de que o estresse térmico e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induzem apoptose em embriões bovinos através de um mecanismo dependente da caspase-9. O experimento 1 determinou se o inibidor de caspase-9, z-LEHD-fmk, bloqueia os efeitos apoptóticos do estresse térmico e do TNF- $\alpha$ . Embriões foram selecionados nos dias 4, 5 e 6 após a fertilização *in vitro* e incubados por 24 h  $\pm$  100  $\mu$ M z-LEHD-fmk reconstituído em 0.5% (v/v) DMSO ou veículo (DMSO) à 1) 38.5°C por 24 h (controle), 2) 41°C por 15 h seguido de 38.5°C por 9 h (estresse térmico), ou 3) 38.5°C por 24 h com 10 ng/mL de TNF- $\alpha$ . A proporção de blastômeros apoptóticos foi analisada utilizando-se a técnica de TUNEL. O experimento foi repetido 4-5 vezes utilizando 172-248 embriões por dia. Nos grupos controle o estresse térmico e o TNF- $\alpha$  aumentaram a proporção de células TUNEL-positivas quando comparados aos embriões incubados a 38.5°C por 24 h ( $P < 0.001$ ). Em contraste, embriões incubados com z-LEHD-fmk e submetidos ao estresse térmico e ao TNF- $\alpha$  não apresentaram aumento nas células TUNEL-positivas (tratamento x inibidor;  $P < 0.05$ ). O experimento 2 testou os efeitos de diferentes concentrações de z-LEHD-fmk nas respostas apoptóticas dos embriões ao TNF- $\alpha$ . Embriões  $\geq 16$  células foram selecionados no dia 6 e incubados na presença de z-LEHD-fmk em 0, 10, and 100  $\mu$ M  $\pm$  10 ng/mL TNF- $\alpha$ . Após 24 h a 38.5°C, os embriões foram lavados, fixados e analisados por TUNEL. O experimento foi repetido 4 vezes (176 embriões). A adição de 10 ng/mL TNF- $\alpha$  aumentou a porcentagem de células TUNEL-positivas e este aumento foi bloqueado por todas as concentrações de z-LEHD-fmk (TNF- $\alpha$  x inibidor;  $P < 0.05$ ). No experimento 3, analisamos se o estresse térmico aumenta a atividade da



caspase-9 e se o z-LEHD-fmk bloqueia este efeito. Embriões em estágio de mórula ou blastocisto inicial foram selecionados no dia 6 e transferidos para novas gotas contendo 100  $\mu\text{M}$  z-LEHD-fmk ou DMSO veículo. Os embriões foram incubados a 38.5°C por 24 h ou 41°C por 15 h seguido de 38.5°C por 9 h. Ao final do estresse térmico os embriões eram lavados e incubados no substrato para caspase-9 (5  $\mu\text{M}$  CaspaLux 9-M<sub>1</sub>D<sub>2</sub>) a temperatura ambiente por 1 h. A atividade da caspase-9 foi determinada avaliando-se a intensidade da fluorescência. Os embriões foram classificados apresentando baixa, média e alta atividade de caspase. O experimento foi repetido 5 vezes utilizando 22-26 embriões/tratamento. O estresse térmico aumentou a porcentagem de embriões classificados como tendo média e alta atividade de caspase-9 e z-LEHD-fmk bloqueou este efeito (tratamento  $P < 0.05$ ; inibidor  $P < 0.001$ ). Para o experimento 4 foram medidos os efeitos do TNF- $\alpha$  na atividade da caspase-9. Embriões no dia 6 foram incubados a 38.5°C por 3, 6, 9, 12, e 15 h com 10 ng/mL TNF- $\alpha$  ou veículo, analisando-se a atividade da caspase-9 foi como descrito anteriormente. O experimento foi repetido 8 vezes utilizando 37-39 embriões/tratamento. A proporção de embriões classificados como média e alta atividade de caspase aumentaram quando expostos ao TNF- $\alpha$  em todos os períodos de exposição, exceto 3 h (tratamento  $P < 0.05$ ; inibidor  $P < 0.01$ ). O experimento 5 foi realizado para analisar os efeitos do estresse térmico e TNF- $\alpha$  na integridade da membrana mitocondrial. Embriões no dia 3.5 foram incubados com  $\pm$  TNF- $\alpha$  a 38.5°C por 24 h ou a 41°C por 15 h seguido por 9 h a 38.5°C. Após os tratamentos os embriões foram lavados e incubados em 20 nM de DiOC<sub>6</sub> a 38.5°C por 20 min no escuro. A despolarização da mitocôndria foi mensurada por quantificação da fluorescência por unidade/área em cada embrião. O estresse térmico causou uma significativa perda no potencial da membrana mitocondrial ( $P < 0.01$ ). Entretanto, TNF- $\alpha$  não apresentou diminuição significativa. O experimento foi repetido 5 vezes (71-78 embriões/tratamento). Concluindo, o mecanismo de ativação da caspase-9 está envolvido na indução da apoptose pelo estresse térmico e TNF- $\alpha$ .

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

Dissertação de Mestrado em Ciência Veterinária

Recife, 24 de Abril de 2006

**Title:** Apoptosis in preimplantation bovine embryos caused by heat stress and Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

**Author:** Bárbara Loureiro

**Advisor:** Paulo Fernandes de Lima

**ABSTRACT**

We tested the hypothesis that heat shock and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induce apoptosis in bovine embryos through a caspase-9 dependent mechanism. Experiment 1 determined whether the caspase-9 inhibitor, z-LEHD-fmk, blocks the apoptotic effects of heat shock and TNF- $\alpha$ . Embryos were collected on day 4, 5, and 6 after in vitro insemination and cultured for 24 h in the presence of either 100  $\mu$ M z-LEHD-fmk reconstituted in 0.5% (v/v) DMSO or vehicle (DMSO) at either 1) 38.5°C for 24 h (control), 2) 41°C for 15 h followed by 38.5°C for 9 h (heat shock), or 3) 38.5°C for 24 h with 10 ng/mL murine TNF- $\alpha$ . The proportion of blastomeres undergoing apoptosis was determined using TUNEL labeling. The experiment was replicated 4-5 times/day using 172-248 embryos/day. In control embryos, heat shock and TNF- $\alpha$  increased the proportion of cells that were TUNEL-positive as compared to embryos cultured at 38.5°C for 24 h ( $P < 0.001$ ). For embryos incubated with z-LEHD-fmk, in contrast, neither heat shock nor TNF- $\alpha$  caused an increase in TUNEL labeling (treatment x inhibitor;  $P < 0.05$ ). Experiment 2 tested effects of different concentrations of z-LEHD-fmk on apoptotic responses of embryos to TNF- $\alpha$ . Embryos  $\geq 16$  cells were collected on Day 6 and cultured in the presence of different concentrations of z-LEHD-fmk (0, 1, 10, and 100  $\mu$ M)  $\pm$  10 ng/mL TNF- $\alpha$ . After 24 h at 38.5°C, embryos were washed, fixed, and analyzed by TUNEL. The experiment was replicated 4 times (176 embryos).

Addition of 10 ng/mL TNF- $\alpha$  increased the percentage of cells that were TUNEL-positive and this increase was blocked by all concentrations of z-LEHD-fmk (TNF- $\alpha$  x inhibitor;  $P < 0.05$ ). For Exp. 3, we analyzed whether heat shock increases caspase-9 activity and whether z-LEHD-fmk blocks this increase. Embryos at the morula or early blastocyst stage were collected on day 6 and transferred to a new drop with 100  $\mu$ M z-LEHD-fmk or DMSO vehicle. Embryos were then cultured at either 38.5°C for 24 h or 41°C for 15 h followed by 38.5°C for 9 h. At the end of heat shock, embryos were washed and then incubated in a caspase-9 substrate (5  $\mu$ M CaspaLux 9-M<sub>1</sub>D<sub>2</sub>) at room temperature for 1 h. Caspase-9 activity was then determined by evaluation of fluorescent intensity. Embryos were classified as having low, medium or high caspase activity. The experiment was replicated 5 times using 22-26 embryos/treatment. Heat shock increased the percent of embryos classified as having medium and high caspase-9 activity and z-LEHD-fmk blocked this effect (treatment  $P < 0.05$ ; inhibitor  $P < 0.001$ ). For Exp. 4, effects of TNF- $\alpha$  on caspase-9 activity were evaluated. Embryos at day 6 were cultured at 38.5°C for 3, 6, 9, 12, and 15 h with 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or vehicle and then caspase-9 activity was measured as described before. The experiment was replicated 8 times using 37-39 embryos/treatment. The proportion of embryos classified as having medium or high caspase activity was increased by TNF- $\alpha$  at all time points except 3 h (treatment  $P < 0.05$ ; inhibitor  $P < 0.01$ ). Exp. 5 was performed to analyze the effects of heat shock and TNF- $\alpha$  on mitochondrial membrane integrity. Embryos at Day 3.5 were incubated at 38.5°C for 24 h  $\pm$  TNF- $\alpha$  or were incubated at 41°C for 15 h followed by 9 h at 38.5°C (heat shock). After treatment, embryos were washed and incubated in 20 nM of DiOC<sub>6</sub> at 38.5°C for 20 min in the dark. Mitochondrial depolarization was measured by quantifying the fluorescence units/area of each embryo. Heat shock caused loss in mitochondria membrane potential ( $P < 0.01$ ). However, TNF- $\alpha$  did not show a significant decrease on membrane polarization. The experiment was

replicated 5 times (71-78 embryos/treatment). In conclusion, activation of caspase-9 dependent pathways is involved in the induction of apoptosis by heat shock and TNF- $\alpha$ .

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

Master's Dissertation in Veterinary Science

Recife, April 24<sup>th</sup>, 2006

## Lista de FIGURAS

		Páginas
Figure 1	Representative photomicrographs illustrating the frequency of apoptotic nuclei in embryos as affected by heat shock and treatment with tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).	68
Figure 2	Induction of apoptosis by heat shock and TNF- $\alpha$ in bovine embryos at days 4, 5 and 6 after insemination.	69
Figure 3	Effects of different concentrations of the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk on apoptotic responses of embryos to TNF- $\alpha$ .	70
Figure 4	Representative photomicrographs illustrating induction of caspase-9 activity by heat shock in embryos at Day 6 after insemination.	71
Figure 5	Induction of caspase-9 activity by heat shock	72
Figure 6	Representative photomicrographs illustrating activation of caspase-9 activity in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).	73
Figure 7	Time-course for activation of Caspase-9 on embryos at day 6 after insemination exposed to TNF- $\alpha$ .	74
Figure 8	Representative photomicrographs illustrating effects of heat shock and tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) on mitochondria membrane integrity.	75
Figure 9	Effects of heat shock and TNF- $\alpha$ on mitochondrial membrane integrity on embryos at day 3 ½ after insemination.	75

**Lista de ABREVIATURAS**

MCP	Morte celular programada
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
DISC	Complexo de sinalização para indução da morte celular
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase nick-end labeling
Apaf-1	Fator ativador de apoptose-1
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose
TRAIL	TNF-relacionado a indução de apoptose
CARD	Domínio recrutador de caspase
SMase	Esfingomielinase
SM	Esfingomielina
S1P	Esfingosina 1-fosfato
S1PR	Receptor para esfingosina 1-fosfato
SAPK	“Stress-activated protein kinase”
MIC	Massa inter celular
VDAC	Canal ânion-voltagem-dependente
IGF-1	“Insulin-like growth factor” – fator de crescimento semelhante à insulina
IGFR	“ Insulin-like growth factor-1 receptor”- receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
PKA	Proteína quinase A

PKB/Akt	Proteína quinase B
PI3K	Proteína fosfatilinositol-3 Quinase
z-LEHD-fmk	Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-FMK.TFA
z-DEVD-fmk	Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-FMK
LEHD-AMC	Ac-Leu-Glu-Val-Asp-AMC
FAAD	Proteína associada ao domínio da morte Fas
Bax	Proteína pró-apoptose
Bad	Proteína pró-apoptose
Bcl-2	Proteína anti-apoptose
Bcl-xL	Prpteína anti apoptose
BID	Proteína pró-apoptose - induz liberação do citocromo c
Asp	Aspartato
AGE	Ativação do genoma embrionário
HSP70	Proteína do estresse térmico 70
HSP90	Proteína do estresse térmico 90
FLIP	Fator anti-apoptose - se liga ao FAAD

## SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Apoptose ou Morte celular programada	4
2.2 As caspases	7
2.3 Mecanismos de sinalização para indução da apoptose	9
2.3.1 Mecanismo mitocondrial	10
2.3.2 Mecanismo de apoptose induzido pelos receptores para a morte celular (intrínseco ou extrínseco)	11
2.4 Estresse térmico nos embriões	13
2.5 Bases bioquímicas na indução da apoptose pelo estresse térmico	14
2.6 Consequências do estresse térmico para o desenvolvimento embrionário	16
2.7 Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ e apoptose	17
2.8 Bases bioquímicas na indução da apoptose pelo Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$	18
2.9 Apoptose em embriões em estágio de preimplantação	20
2.10 Ocorrência da apoptose nos diferentes estágios de desenvolvimento	22
2.10.1 Estágio de clivagem e de compactação	22
2.10.2 Blastocisto	23
2.11 Fatores reguladores da apoptose	24



3	CONCLUSÃO	28
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
5	PUBLICAÇÕES	44
5.1	Heat shock and tumor necrosis factor- $\alpha$ induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9 dependent mechanism	45
5.2	Efeitos do estresse térmico na reprodução de bovinos	76

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Apoptose ou morte celular programada (MCP) é um evento comum no princípio da formação do organismo, podendo também ocorrer na presença de patogenias ou estas associadas ao desenvolvimento anormal, sendo induzida por uma variedade de teratogênicos, entre estes o estresse térmico (MIRKES e LITTLE, 1998; MIRKES e LITTLE, 2000; MIRKES e LITTLE, 2002) e o TNF- $\alpha$  (BUZZARD *et al.*, 1998).

Os processos de desenvolvimento e maturação do oócito, fertilização e desenvolvimento do embrião em estágio de pré-implantação podem ser interrompidos por alterações no microambiente do trato reprodutivo. Este fenômeno tem sido melhor caracterizado quando o animal é exposto ao estresse térmico. Exposições a elevadas temperaturas podem alterar a foliculogênese (WOLFESON *et al.*, 2000), desorganizar a função do oócito (ZERON *et al.*, 2001; AL-KATALANI *et al.*, 2002) e interromper o desenvolvimento embrionário (EALY *et al.*, 2000). O TNF- $\alpha$  está presente em processos inflamatórios como mastites e laminites causando perda embrionária precoce (SOTO *et al.*, 2004).

O estresse térmico e a TNF- $\alpha$  induzem apoptose através de diferentes mecanismos.

Não está claro se o mecanismo de indução da apoptose pelo estresse térmico em embriões é semelhante ao de outras células. Nas células em geral, o estresse térmico ativa o mecanismo mitocondrial para a indução da apoptose (ZOU *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1997; ANTONSSON, 2003), causando despolarização da mitocôndria, liberação do citocromo c, ativação do Apaf-1 e, em presença de adenosina tri-fosfato (dATP/ATP), a formação de

um grande complexo com a pró-caspase-9, levando a conversão desta em caspase-9, que irá mediar a ativação da caspase-3, fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e morte celular (MIRKES e LITTLE, 1998; MIRKES e LITTLE, 2000; MIRKES e LITTLE, 2002).

O TNF- $\alpha$  pode ativar a apoptose através de dois mecanismos diferentes (SCAFFIDI *et al.*, 1998). No modelo extrínseco, o TNF com seus receptores levam à formação do complexo sinalizador para a indução da morte celular (DISC) e ativação da caspase-8, que causa direta ativação da caspase-3 e a morte celular (LI *et al.*, 1998). Em alguns casos, entretanto, a formação do DISC é muito reduzida, mas a pequena quantidade de caspase-8 que esta ativa é suficiente para induzir a atividade apoptogênica da mitocôndria. A caspase-8 cliva o BID, proteína da família das proteínas Bcl-2, que gera um fragmento C-terminal que se desloca para a mitocôndria, causando despolarização e liberação do citocromo c. Este modelo é conhecido como intrínseco (LUO *et al.*, 1998; WEI *et al.*, 2000).

Ainda não se é conhecida a razão pela preferência entre os mecanismos intrínseco ou extrínseco nos embriões bovinos em resposta ao TNF- $\alpha$  quando ativam os receptores para a morte celular.

Entender a patobiologia dos efeitos do estresse térmico e do TNF- $\alpha$  nos embriões em estágio de pré-implantação e delinear o processo celular que limita os efeitos destes estresses são fatores pertinentes ao entendimento e redução das injúrias celulares causadas por outras condições que reduzem o desenvolvimento embrionário. Há várias evidências que indicam que os mecanismos (cascatas) de injúria celular e citoproteção entre vários estresses celulares são os mesmos. Desvendar e compreender a função protetora nos

embriões em estágio de desenvolvimento pode levar ao desenvolvimento de procedimentos que minimizem a perda embrionária causada por uma variedade de perturbações ao microambiente do embrião, sendo ainda aplicável à melhoria da produção de embriões *in vitro*.

Neste propósito, este trabalho teve como objetivo elucidar os mecanismos da apoptose induzida pelo estresse térmico e TNF- $\alpha$  nos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário e se estes são dependentes da ativação da caspase-9.

Para tal, foram desenvolvidos experimentos nos quais embriões bovinos produzidos *in vitro* em estágio de pré-implantação (dias 4, 5 e 6 após fertilização) tratados com o inibidor de caspase-9 z-LEHD-fmk foram submetidos ao estresse térmico de 41° C e TNF- $\alpha$  e analisados utilizando-se as técnicas de TUNEL, mensuração da atividade da referida caspase e avaliação da integridade da membrana mitocondrial.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Apoptose ou Morte celular programada

Apoptose ou morte celular programada (MCP) é um importante mecanismo na regulação do número de células durante o desenvolvimento, fazendo com que haja uma renovação homeostática das células na vida adulta (JACOBSON *et al*, 1997), garantindo a remoção de células danificadas ou que não sejam necessárias em organismos multicelulares. A apoptose é caracterizada por uma série de distintas alterações morfológicas e bioquímicas na célula tais como fragmentação do DNA, condensação da cromatina e divisão da membrana plasmática em pequenas partes (WYLLIE *et al.*, 1980). Entretanto, a apoptose é um processo essencial, estando envolvido em diversas patologias. Aumentos da apoptose estão associados a infarto do miocárdio, arterosclerose, falência cardíaca, infertilidade, diabetes, AIDS, hepatite, falência renal e doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla, Alzheimer's, Huntington e Parkinson's. Por outro lado, ausência de apoptose está associada a várias formas de câncer e doenças autoimunes (KRAMMER, 2000).

A apoptose é um processo que utiliza ATP como fonte de energia onde as células são eliminadas de maneira ordenada. O maquinário de morte celular pode ser ativado de diversas maneiras, através de sinais extracelulares ou intracelulares gerados pela própria célula, sendo seu principal componente um grupo de enzimas proteolíticas conhecidas como caspases (MARTIN e GREEN, 1995; NICHOLSON e THORNBERRY, 1997)

Apoptose em células embrionárias tem recebido atenção especial devido a seu potencial em responder a subcondições de desenvolvimento ou a estresses (BETTS e KING, 2001). Aumentos na incidência de morte celular é um importante indicador de um ambiente inadequado para o embrião tanto *in vivo* como *in vitro*. Por esta razão, conhecimentos detalhados sobre as características da apoptose durante o desenvolvimento embrionário são necessários. O estudo da apoptose fornece ainda novas informações no processo fisiológico que ocorre durante o crescimento do embrião, as quais podem ajudar na produção de embriões de melhor qualidade e conseqüentemente melhores taxas de sobrevivência embrionária (BETTS e KING, 2001).

Usando-se os procedimentos atuais de produção de embriões *in vitro*, menos da metade dos oócitos bovinos e humanos que são inseminados alcançam o estágio de blastocisto (XU *et al.*, 1992; KESINTEPE e BRACKET, 1996) e destes muitos não implantam após a transferência. As explicações para esta alta taxa de fracasso no desenvolvimento continuam desconhecidas. Entretanto, embriões em estágio de desenvolvimento possuem diferentes proporções de células que são classicamente caracterizadas para a morte celular (HARDY, 1997; MATWEE *et al.*, 2000).

Existem várias evidências indicando que a apoptose representa um dos mecanismos celulares induzidos durante o estresse térmico (ROTH e HANSEN, 2004-a) ou exposição ao TNF- $\alpha$  (LI *et al.*, 1998; LUO *et al.*, 1998; WEI *et al.*, 2000). No embrião bovino produzido *in vitro* (BYRNE *et al.*, 1999; MATWEE *et al.*, 2000) e nos produzidos por transferência de células somáticas do núcleo (GJORRET *et al.*, 2005) existem alguns sinais morfológicos de apoptose durante os estágios iniciais de clivagem. Enquanto o oócito em maturação pode apresentar apoptose, pelo menos em resposta ao estresse térmico (ROTH e

HANSEN, 2004-a) o embrião em estágio de 2 células é contrário a indução de apoptose causada por estresse térmico, arsênio e TNF- $\alpha$  (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002-b; KRININGER *et al.*, 2002; SOTO *et al.*, 2003). Baseando-se em resultados utilizando o estresse térmico, a capacidade de indução da apoptose é adquirida entre os estágios de 8 a 16 células (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002-b). As consequências da apoptose podem ser dependentes do estágio de desenvolvimento, sendo a indução da apoptose uma das razões pela qual a competência do oócito em fertilizar-se e desenvolver-se é reduzida pelo estresse térmico (ROTH e HANSEN, 2004-a). Entretanto, uma quantidade limitada de apoptose pelo estresse térmico pode ser benéfica no dia 4 do desenvolvimento, pois a adição do inibidor de caspase z-DEVD-fmk, exacerbou os efeitos deletérios do estresse térmico no desenvolvimento ao estágio de blastocisto (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002-a).

A apoptose pode ser medida por critérios bioquímicos. Quando o DNA é clivado em fragmentos nucleossômicos, a eletroforese de genoma isolado de células apoptóticas exibe uma escala de incrementos de aproximadamente 185 bp (pares de base). Devido ao pequeno número de células do embrião em estágio de pré-implantação, é impossível se usar técnicas de eletroforese para detectar a escala de DNA apoptótico. Entretanto, o desenvolvimento do método “terminal deoxynucleotidyl transferase nick-end labeling” (TUNEL) possibilitou o acesso a fragmentação do DNA *in situ* (GAVRIELI *et al.*, 1992). Com o uso do método do TUNEL pode-se observar a fragmentação do DNA em oócitos (ROTH e HANSEN, 2004-a), mórulas e blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, mas não pode-se observar em zigotos e precoces estágios de clivagem embrionária (MATWEE *et al.*, 2000; PAULA-LOPES e HANSEN, 2002-b). Entretanto, tratamento com stauporina, um inibidor de proteína quinase, conhecido por induzir apoptose, demonstrou que embriões

em estágio inicial de clivagem são capazes de apresentar o processo de apoptose através da exibição de típicas características morfológicas que sugerem que os efetores da morte celular estão realmente presentes (MATWEE *et al.*, 2000).

## 2.2 As caspases

O envolvimento das caspases na apoptose foi inicialmente documentado em 1991 por ELLIS *et al.*, quando observavam a regulação do programa de morte celular durante o desenvolvimento do nematódeo *Caenorhabditis elegans*. As caspases são uma família de proteases altamente conservadas que utilizam a cisteína como grupo nucleofílico para clivagem do substrato e de ligações peptídicas no lado carboxílico dos resíduos aspartases (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998). Todos os estímulos que desencadeiam a apoptose agem através da ativação das caspases. Caspases ativas podem promover a ativação de outros membros da família das caspases e a proteólise de diversos tipos de proteínas celulares, o que contribui para o controle da morte celular (MURPHY e MARTIN, 2003).

As caspases são sintetizadas como proenzimas inativas que requerem um processo proteolítico no resíduo interno aspartato (Asp) para uma completa atividade catalítica. Estruturalmente as caspases estão organizadas em um prodomínio, uma subunidade maior e uma subunidade menor. Após ativação, as subunidades maior e menor são liberadas da proenzima por clivagem da ligação Asp-X entre o prodomínio e a subunidade maior. Da mesma forma as subunidades maior e menor são separadas por uma segunda clivagem em uma ligação Asp-X entre esses dois domínios. A presença de resíduos Asp em sítios de clivagem internos impossibilita certas caspases de se auto ativarem ou serem ativadas por outras caspases como parte do processo de amplificação da cascata. Caspases ativas são



geralmente tetraméricas, formadas por duas subunidades maiores e duas menores, possuindo dois sítios ativos (MURPHY e MARTIN, 2003).

As caspases envolvidas na apoptose são divididas em dois grupos baseado-se no comprimento de seus prodomínios: caspases iniciadoras, as quais incluem caspases-1, -2, -8, -9 e -10; e caspases efetoras, as quais incluem caspases-3, -6 e -7 (MURPHY e MARTIN, 2003).

A estratégia comumente adotada para ativação da caspase apical parece ser a formação de complexos contendo diversas caspases zimogênicos (proenzimas) (SALVESEN e DIXIT, 1999). Estes são formados através do recrutamento de caspases apicais para a formação de complexos ligados por proteínas adaptadoras específicas. Existem várias maneiras pelas quais a ativação das caspases pode ocorrer promovendo assim a morte celular (MURPHY e MARTIN, 2003).

Depois de ativadas, a maioria das caspases pode processar e ativar suas próprias procaspases ou outras que estejam inativas *in vitro* (FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 1996; SRINIVASULA *et al.*, 1996). Esta característica sugere que as caspases implicadas na apoptose podem executar o programa apoptótico através de uma sequência de ativações de procaspases iniciadoras e executoras. As iniciadoras são responsáveis pelo processamento e ativação das executoras. As executoras são responsáveis pela clivagem proteolítica de inúmeras proteínas celulares levando a mudanças nas características morfológicas e fragmentação do DNA, que está frequentemente associada à apoptose (SALVESEN e DIXIT, 1997).

A primeira evidência sobre a cascata de caspases durante a apoptose foi obtida através de estudos em sinalização dos receptores para morte celular (FRASER e EVAN, 1996; NAGATA, 1997) que indicaram que o sinal para a morte celular é transmitido em parte por uma ativação sequencial da procaspase-8 (iniciadora) e procaspase-3 (executora) (BOLDIN *et al.*, 1996; FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 1996). Após esta descoberta uma evidência mais marcante foi obtida quando pesquisadores demonstraram que o mecanismo de morte celular através do citocromo *c* é também transmitido por ativação da cascata envolvendo as caspases-9 e -3 (LI *et al.*, 1997).

### **2.3 Mecanismos de sinalização para indução da apoptose**

Dois mecanismos de sinalização para indução da apoptose já foram identificados, o mecanismo mitocondrial e o mecanismo induzido através dos receptores para a morte celular. O mecanismo que se realiza através da mitocôndria é ativado por diversos estímulos ou estresses celulares como estresse térmico, radiação gama ou ultravioleta e inibidores das proteínas quinase. Geralmente estes fatores causam ativação do domínio BH-3 da proteína BID, um membro da família de proteínas Bcl-2, as quais invariavelmente levam a liberação dos fatores pró-apoptose do espaço intermembranas da mitocôndria para o citoplasma. Um destes fatores, o citocromo *c*, ativa diretamente o Apaf-1 e, na presença de dATP/ATP, induz a formação do apoptosomo. O apoptosomo recruta e medeia a autoativação da caspase iniciadora, caspase-9, a qual ativa as caspases-3 e -7, dando início à cascata de ativação e clivagem das caspases. As caspases ativas são passíveis de inibição através das proteínas da família dos inibidores de apoptose (IAP). Outra proteína derivada da mitocôndria, o Smac/DIABLO, interage fisicamente com múltiplas IAP, removendo a inibição promovida pelas IAP durante a apoptose. Devido a estes e outros fatores pode-se

definir que a mitocôndria possui um papel indispensável no mecanismo interno de apoptose (LI *et al.*, 1998; ANTONSSON, 2003 ).

O mecanismo de receptores para a morte celular é ativado através da interação entre os ligantes e os receptores da membrana plasmática, como os receptores para TNF- $\alpha$  e TRAIL (SCHMITZ *et al.*, 2000). Os domínios associados à morte celular Fas ou FADD parecem ser componentes obrigatórios, os quais recrutam e medeiam a auto ativação da caspase iniciadora, procaspase-8. A forma ativa da caspase-8 cliva e ativa as caspases-3 e -7 (ANTONSSON, 2003)

Um dos alvos da forma ativa da caspase-8 é o BID, que quando clivado, seu fragmento c-terminal se desloca para a membrana mitocondrial e induz a liberação de fatores pró-apoptóticos. Sendo BID o mediador entre as formas extrínsecas e intrínsecas de sinalização (OZOREN e EL-DEIRY, 2002; ANTONSSON, 2003).

### **2.3.1 Mecanismo mitocondrial**

A mitocôndria atua como um importante sensor para os danos celulares. Várias formas de estresse celular tais como dano ao DNA, estresse térmico e estresse oxidativo podem resultar em um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial. Este evento permite que certas proteínas, como o citocromo *c*, sejam liberadas do espaço existente entre as membranas da mitocôndria para o citosol. Após liberado para o citosol, o citocromo *c* se liga ao Apaf-1, um homólogo da proteína CED-4 no *C. elegans* (KUIDA *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1996). A ligação do citocromo *c*, com utilização de ATP/dATP, resulta em mudanças na conformação do Apaf-1, promovendo assim oligomerização desta proteína e exposição do domínio CARD, permitindo sua ligação com o CARD da procaspase-9 (ADRAIN e

MARTIN, 2001; ACEHAN *et al.*, 2002). Neste momento a molécula procaspase-9 pode se ligar aos monômeros do Apaf-1 via interação dos domínios recrutadores de caspase (CARD-CARD) entre estas proteínas. O complexo de alto peso molecular formado é chamado apoptosomo e sua formação promove a ativação da caspase-9 que leva a um aumento na concentração local de seu zimogênio (ACEHAN *et al.*, 2002).

Após ativação junto com o apoptosomo, a caspase-9 propaga a cascata de caspases através da ativação das caspases-3 e -7. Caspase-3 então ativa as caspases-2 e -6 que promovem por fim a ativação das caspases-8 e -10. A caspase-3 também participa em *feed-back* da amplificação do processo de ativação da caspase-9 (SLEE *et al.*, 1999).

Acreditava-se que a liberação do citocromo *c* para o citoplasma e sua subsequente associação com a proteína Apaf-1 era absolutamente necessária para a ativação da caspase-9, caspase iniciadora no mecanismo mitocondrial da apoptose (ZOU *et al.*, 1999). Entretanto, o autoprocessamento da caspase-9 pode ocorrer rapidamente, e formas não processadas de caspase-9 são ativadas cataliticamente como parte do complexo caspase-9-Apaf-1 (STENNICKE *et al.*, 1999; BRATTON *et al.*, 2001).

### **2.3.2 Mecanismo de apoptose induzido pelos receptores para a morte celular**

Os receptores para a morte celular (de “death receptors”) são receptores para citocinas localizadas na superfície celular que pertencem a superfamília de receptores TNF que iniciam a apoptose após se ligarem a fatores estruturalmente relacionados ou anticorpos específicos (ASHKENAZI E DIXIT, 1998; LOCKSLEY *et al.*, 2001; CASCINO *et al.*, 1995). Os membros desta família são proteínas trans-membrana tipo-I com uma porção C-terminal intracelular e um domínio extracelular N-terminal. Estes são

caracterizados por uma significativa homologia na região que contém 5 cisteínas igualmente repetidas em seus domínios extracelulares e em uma sequência de 60 a 80 aminoácidos citoplasmáticos conhecida como domínio da morte (de “death domain”), o qual possibilita os receptores para a morte celular iniciarem os sinais para a morte da célula (GUICCIARDI e GREGORY, 2003).

Os receptores para a morte celular são ativados através de uma interação entre seus ligantes naturais, um grupo de citocinas complementares pertencentes à família dos TNF. Esses ligantes são proteínas trans-membrana tipo II (GUICCIARDI e GREGORY, 2003).

Os sinais de transdução pelos receptores para a morte celular são iniciados por oligomerização dos receptores que justapõem os domínios intracelulares seguidos por engajamento dos ligantes aos receptores dos domínios extracelulares. Este evento leva ao recrutamento de diferentes proteínas adaptadoras, as quais promovem um *link* entre o receptor e o efetor para a morte celular. As proteínas adaptadoras podem conter um domínio efetor para a morte celular (de “death-effector domain”) que medeia o recrutamento das caspases através da associação como um efetor correspondente ou com um CARD no pró-domínio das caspases iniciadoras inativas. O complexo resultante é o DISC, que ativa as caspases. A proximidade de diversas moléculas de caspase recrutadas pelos receptores para a morte celular resulta em auto-processamento e ativação das caspases. Quando ativadas as caspases iniciadoras disparam a cascata das caspases por processamento e ativação das chamadas caspases efetoras (caspases-3, -6 e -7), as quais são diretamente ou indiretamente responsáveis pela clivagem e degradação de diversas proteínas cruciais e pela execução da morte celular (GUICCIARDI e GREGORY, 2003).

Atualmente, seis receptores para a morte celular são conhecidos, Fas (também chamado CD 95 e APO-1) e TNF-R1 (também chamado p55 ou CD120a). TRAIL-R1 (também chamado DR4), TRAIL-R2 (também chamado DR5, APO-2 ou *Killer*), receptores para a morte celular 3 (DR3; também chamado APO3 ou TRAMP ou WSL-1 ou LARD) e receptores para a morte celular 6 (DR6) (GUICCIARDI e GREGORY, 2003). Ainda não foi confirmada a existência destes receptores no embrião bovino.

#### **2.4 Estresse térmico nos embriões**

As consequências celulares do estresse térmico têm sido descritas para embriões bovinos no estágio de 2 células. Neste estágio, exposições a 41°C causam rompimento dos microfilamentos e microtúbulos, resultando em redistribuição das organelas para o interior da célula (RIVERA *et al.*, 2003; RIVERA *et al.*, 2004-b). Além disso, ocorre ainda um aumento na proporção de mitocôndrias, as quais possuem a característica de aumentar seu volume, indicando despolarização (RIVERA *et al.*, 2003; RIVERA *et al.*, 2004-a) e, consistente com a idéia de fosfoliração oxidativa, há ainda uma redução no consumo de oxigênio (RIVERA *et al.*, 2004-b). Enquanto radicais livres têm sido responsabilizados pelos efeitos do estresse térmico em embriões de ratos (ARÉCHIGA *et al.*, 1995; OZAWA *et al.*, 2004), o mesmo parece não ocorrer em embriões bovinos porque, nestes, o estresse térmico não causa redução no antioxidante glutathiona cistólica (ARÉCHIGA *et al.*, 1995; RIVERA *et al.*, 2004-a) e seus efeitos não podem ser minimizados através da adição de antioxidantes ao meio de cultura (EALY *et al.*, 1995) ou ainda reduzindo a quantidade de oxigênio contida na incubadora (ARÉCHIGA *et al.*, 1995).

Temperaturas que bloqueiam o desenvolvimento dos embriões bovinos no estágio de 2 células têm efeito intermediário em embriões com 4-8 células e pouco ou nenhum efeito no desenvolvimento de mórulas (EALY *et al.*, 1995; EDWARDS *et al.*, 1997).

## **2.5 Bases bioquímicas na indução da apoptose pelo estresse térmico**

O primeiro sinal para início da apoptose causado pelo estresse térmico é a ativação da esfingomielinase (SMase) na membrana plasmática causando clivagem da esfingomielina (SM) em ceramida (cascata 1). A ceramida formada na membrana plasmática facilita a ativação de várias moléculas sinalizadoras que levam à ativação da SAPK (de “stress-activated protein kinase”) e outros sistemas de sinalização (cascata 2). O evento central que inicia a apoptose ocorre quando há permeabilização dos poros da mitocôndria, permitindo a liberação de citocromo *c* e da proteína conhecida como “Diablo” para o citoplasma. Essa abertura nos poros da mitocôndria depende do balanço pró-apoptótico (Bax, Bad) e anti-apoptótico (Bcl-2, Bcl-xL) dos membros da família de proteínas Bcl-2, presentes na mitocôndria (cascata 3). A SAPK leva à ativação de proteínas como Bad que facilitam a abertura dos poros e liberação do citocromo *c* e da proteína “Diablo”. O citocromo *c* junto com Apaf-1 e procaspase-9 se unem para formar o apoptosomo chamado complexo citocromo *c*-Apaf-1-procaspase-9 e subsequente clivagem da procaspase-9 em caspase-9 (cascata 4). A ativação da caspase-9 leva à clivagem das procaspases em suas respectivas caspases executoras -3, -6, -7 (cascata 5). A proteína “Diablo” participa do processo de apoptose bloqueando a ação inibidora de várias proteínas que previnem a ativação das caspases-3, -6 e -7 (cascata 6). Caspases executoras são responsáveis pela clivagem proteolítica de proteínas estruturais, proteínas inibidoras de DNAses, proteínas reparadoras de DNA, entre outras, causando assim a morte celular

(cascata 7) (COSTANTINI, 2000; VINCENT e FELDMAN, 2002; GULBINS, 2003; JOHNSON, 2003; KOLESNICK e FUKS, 2003; OGRETMEN e HANNUN, 2004; RADEFF-HUANG *et al.* 2004).

A proteína Quinase A (PKA) atua na cascata que ativa as Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAP) (cascata 8) e também a Bcl-xL, proteína anti-apoptótica, que reside na membrana mitocondrial, atuando como regulador dos poros condutores, bloqueando a penetração de substâncias que são ativadoras de caspases e evitando a formação do apoptosomo (cascata 9). A proteína Quinase B (PKB/AKT) é ativada por fosfatilinositol-3 Quinase (PI3K), sendo sua ativação necessária à ativação de moléculas como IGFR (de “insulin-like growth factor-1 receptor”) e S1PR (receptor para esfingosina 1-fosfato), além de inibir as proteínas Bad e a caspase-9 e induzir a transcrição de IAP e Bcl-2 (cascata 10). Por fim, a ceramida atua inibindo a PKB/Akt (cascata 11) (COSTANTINI, 2000; VINCENT e FELDMAN 2002; GULBINS, 2003; JOHNSON, 2003; KOLESNICK e FUKS, 2003; OGRETMEN e HANNUN, 2004; RADEFF-HUANG *et al.* 2004).

Com base neste esquema, existem várias possibilidades para explicar as mudanças que ocorrem nas respostas à apoptose em embriões bovinos. Uma das possibilidades é que os embriões no estágio de 2 células perdem um ou mais componentes da cascata das caspases, os quais não são necessários até a fase de 8-16 células, quando ocorre a ativação do genoma e síntese de proteínas (JOUSAN, informação verbal)<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Informação concedida por Frank Dean Jousan em julho 2005.



Outra possibilidade é que a maturação, ativação e fertilização do oócito é acompanhada pela ativação de um ou mais sistemas anti-apoptose e estes sistemas bloqueiam a cascata de ativação da apoptose até o estágio de 8-16 células.

## **2.6 Consequências do estresse térmico para o desenvolvimento embrionário**

Um estudo utilizando o inibidor de caspase z-DEVD-fmk indicou que a apoptose é o caminho através do qual o estresse térmico destrói a competência do oócito (ROTH e HANSEN, 2004-a). Em contraste, embriões no estágio de 2 células não têm capacidade de apresentar apoptose (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002-b). Recentes evidências têm sugerido, entretanto, que a apoptose pode ser a causa da inibição no desenvolvimento de embriões no estágio de 2 células submetidos ao estresse térmico. RIVERA *et al.* (2004-a) demonstraram que embriões no estágio de 2 células submetidos ao estresse térmico têm seu desenvolvimento bloqueado no estágio de 8 células, sendo que somente  $25 \pm 7\%$  dos embriões alcançam o estágio de 8 células contra  $67 \pm 7\%$  para o grupo controle. Uma das possibilidades para esse fenômeno é que o embrião submetido ao estresse térmico tenha seu desenvolvimento bloqueado quando este se torna capaz de sofrer apoptose.

Embriões com 4 dias de desenvolvimento têm um grande número de células e já possuem a capacidade de sofrer apoptose induzida por estresse térmico. Neste estágio a apoptose tem a função de proteger o embrião. Embriões que têm a apoptose inibida são mais sensíveis ao estresse térmico (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002-a). Ou seja, dependendo da intensidade e do estágio em que o embrião é submetido ao estresse térmico a indução da apoptose pode ter efeitos opostos negativos ou positivos. É possível que no início do desenvolvimento embrionário (2 células) o estresse térmico possa desencadear os

sinais iniciais necessários para a ativação da apoptose que só será observada tardiamente no estágio de 8 células levando à interrupção do desenvolvimento embrionário neste estágio. Por outro lado, se o embrião é exposto ao estresse térmico quando já possui 8 células ou mais, a apoptose pode representar um fenômeno benéfico que permite a eliminação de células danificadas (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002-a).

## **2.7 Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ e apoptose**

O TNF- $\alpha$  é uma citocina multifuncional que medeia a comunicação de célula para célula. Esta citocina foi inicialmente identificada como regulador imunológico, inflamatório e reparador em resposta a injúrias. A existência da forma bioativa desta citocina pró-inflamatória, bem como seus sítios de ligação nos vários tecidos reprodutivos já é conhecida (HANSEN, 1995).

A perda embrionária pode estar acompanhada de infecções como mastite em vacas. O envolvimento do TNF- $\alpha$  neste fenômeno é sugerido por observações de elevadas concentrações de TNF- $\alpha$  circulante após infecções intramamárias ou infusão de endotoxinas (SOTO *et al.*, 2003). Em ratos, perdas embrionárias associadas a diabetes têm sido relacionadas à excessiva produção de TNF- $\alpha$  no útero (PAMPFER, 2001).

As ações do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento embrionário ainda necessitam ser bastante estudadas. PAMPFER (1994 e 1997) demonstrou que a exposição de blastocistos de ratos ao TNF- $\alpha$  diminui a proliferação celular e aumenta a porcentagem de blastômeros apoptóticos. Havendo ainda a diminuição na média do número de células presentes na massa inter celular (MIC) e quando blastocistos tratados com TNF- $\alpha$  são transferidos para receptoras, estes apresentam uma alta taxa de reabsorção (WUU *et al.*, 1999).

Blastocistos de rato tratados com TNF- $\alpha$  apresentaram um aumento significativo no número de núcleos fragmentados na MIC, havendo ainda redução no número de células e diminuição na viabilidade do embrião, tanto *in vitro* como *in vivo* (WUU *et al.*, 1999).

SOTO *et al.* (2003) sugerem que TNF- $\alpha$  pode interferir negativamente na maturação do oócito, comprometendo a habilidade do embrião resultante em se desenvolver até o estágio de blastocisto. Em seu trabalho demonstraram que a exposição de embriões já fertilizados ao TNF- $\alpha$  não diminuiu a porcentagem destes que chegaram ao estágio de blastocisto, entretanto a citocina fez com que aumentasse a porcentagem de blastômeros apoptóticos quando a exposição ocorreu após o estágio de 9 células.

BOTTA *et al.* (2004) demonstraram que o tratamento com TNF- $\alpha$  resultou em translocação do citocromo *c* da porção mitocondrial para o citosol em hepatomas de fígado de rato. A liberação do citocromo *c* para o citosol resulta em formação do complexo apoptosomo, levando à ativação da caspase-9, fato comprovado por ensaios que estimam a atividade da caspase-9 por fluorescência, utilizando-se o substrato LEHD-AMC.

## **2.8 Bases bioquímicas na indução da apoptose pelo Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$**

As células têm sido classificadas como tipo I ou tipo II baseando-se em sua resposta à ativação dos receptores para morte celular da família do TNF (SCAFFIDI *et al.*, 1998). Ligação entre estes fatores causa trimerização de seus receptores na superfície celular e recrutamento de proteínas citoplasmáticas de adaptação. Havendo então o recrutamento de moléculas de procaspase-8 que se auto processam em sua forma ativa (MEDEMA *et al.*, 1997; MUZIO *et al.*, 1998). Quando ativada, a caspase-8 pode disparar dois mecanismos distintos de apoptose. Nas células tipo I, o DISC propicia direta ativação da caspase-8,

seguido por ativação da caspase-3, levando à morte celular, sendo este mecanismo independente da mitocôndria. Em contraste, nas células do tipo II a formação do DISC é extremamente reduzida, mas a pequena quantidade de moléculas de caspase-8 ativa que são geradas é suficiente para induzir a apoptose através da mitocôndria. A caspase-8 cliva a proteína BID que gera um fragmento C-terminal que então transloca-se para a mitocôndria causando despolarização e liberação do citocromo *c* (LI *et al.*, 1998; LUO *et al.*, 1998; WEI *et al.*, 2000). Um complexo citoplasmático de proteínas formado pelo Apaf-1, citocromo *c* e caspase-9 ativa então uma série de caspases efetoras, iniciando pela caspase-3 e culminando com a morte celular (ZOU *et al.*, 1997; ZOU *et al.*, 1999).

MCDONNELL *et al* (2003) demonstraram em células do tipo pró-B em linfoma de rato que apresentavam super expressão do Bcl-xL (fator que causa efetiva inibição do citocromo *c*) que quando tratadas com TNF- $\alpha$ , a caspase-9 era processada anteriormente à liberação do citocromo *c*. O mesmo foi comprovado quando células que super expressavam Bcl-xL ou células normais foram tratadas com o inibidor de caspase-9 z-LEHD-fmk e submetidas ao TNF- $\alpha$ , ambas tiveram a apoptose atrasada, sugerindo que a caspase-9 possui um importante papel neste mecanismo de morte celular, mesmo na ausência de citocromo *c* e que a caspase-8 ativa pode diretamente clivar e ativar a caspase-9 nestas células.

Um atraso na apoptose foi observado em células com baixo nível de caspase-9, podendo-se concluir que a caspase-9 está envolvida na aceleração da apoptose induzida por TNF- $\alpha$  em células nas quais o mecanismo de liberação do citocromo *c* pela mitocôndria está efetivamente bloqueado, sendo então considerada neste caso não como uma caspase iniciadora, mas sim como caspase efetora (MCDONNELL *et al.*, 2003).

SHAO *et al.* (2005) em ensaio utilizando células que possuíam o adenovírus tipo 5 E1A, que é associado a atividades anticancerígenas, incluindo sensibilização para a apoptose induzida pelos fatores de necrose tumoral, demonstraram que a caspase-8 e -9 e o Apaf-1 apresentaram maiores níveis nos grupos de células que possuíam o adenovírus E1A quando tratadas com TRAIL do que células parenterais de câncer ovariano resistentes ao TRAIL. Sugerindo que o mecanismo de indução da apoptose pelo TRAIL nestas células é dependente da mitocôndria. O mesmo resultado foi obtido quando avaliou-se os níveis de caspase-3 ativa para as mesmas células.

Estes resultados foram previamente mostrados por OZOREN *et al.* (2000) que bloquearam a indução de apoptose pelo TRAIL utilizando o inibidor da caspase-9 z-LEHD-fmk em hepatócitos e carcinoma de cólon humano, sugerindo que estas células apresentam comportamento de células tipo II. Por outro lado, células cancerígenas de cólon humano não responderam ao inibidor z-LEHD-fmk quando expostas ao TRAIL, sendo então consideradas células do tipo I.

Em um segundo estudo utilizando células cancerígenas de colon humano OZOREN e DEIRY (2002) revelaram que BID, componente da família das proteínas Bcl-2, é o possível fator determinante da escolha da célula em responder como tipo I ou tipo II ao receptores para a morte celular, sendo a quantidade de BID existente na célula o fator que irá determinar sua habilidade em ativar a liberação de citocromo *c* pela mitocôndria.

## **2.9 Apoptose em embriões em estágio de pré-implantação**

Apoptose é um processo fisiológico que ocorre espontaneamente na maioria das populações celulares, sendo também induzida em condições laboratoriais. Todos os tipos

celulares, com exceção das células vermelhas do sangue, respondem a tratamentos com promotores de apoptose por autodestruição (suicídio), demonstrando características típicas de morte celular programada (WEIL *et al.*, 1997).

As células embrionárias também são capazes de sofrer apoptose, tendo um papel muito importante na reprodução e desenvolvimento dos mamíferos. Os processos de apoptose envolvidos na formação das cavidades pré-amnióticas, vesículas e tubos são componentes indispensáveis para o desenvolvimento após a implantação. Uma função muito importante do processo apoptótico durante a pré e pós implantação é a eliminação de células anormais ou com baixo potencial e ainda o controle do número de células (JACOBSON *et al.*, 1997).

A sobrevivência de embriões mamíferos em estágio de pré-implantação não depende somente de condições apropriadas para um normal desenvolvimento, depende também da aquisição de mecanismos com os quais os embriões lutam contra as adversidades. A habilidade do conceito em resistir ao estresse de acordo com que o desenvolvimento prossegue é, provavelmente, regulada por diversos fatores que permitem o acontecimento da morte celular programada e mecanismos protetores envolvendo genes estresse-induzidos (BETTS *et al.*, 2001).

Embora as células apoptóticas se autodestruam, já é sabido que a cascata de eventos intra-celulares que leva à eliminação da célula raramente ocorre somente em um contexto endógeno específico (PAMPFER e DONNAY, 1999). As possíveis causas da apoptose em embriões em fase de pré-implantação são: anormalidades do cromossomo ou núcleo (HARDY, 1999); potencial de desenvolvimento inapropriado (HANDYSIDE e HUNTER,

1986); falta ou excesso de fatores de crescimento (IGF-I, IGF-II e hormônios) (HARDY e SPANOS, 2002) e a exposição a fatores que causam dano às células, como radiação UV e estresse térmico (HERRLER *et al.*, 1998; PAULA-LOPES e HANSEN, 2002-b). Em embriões produzidos *in vitro* a apoptose pode ser aumentada por subcondições de cultura, resultante por exemplo de inadequadas composições dos meios ou inapropriada densidade de embriões na cultura (O'NEIL, 1998).

A morte celular pode estar relacionada com qualidade embrionária. Acredita-se que blastocistos com um grande número de células são mais capazes de se implantarem e se desenvolverem até o nascimento (VAN SOOM *et al.*, 1997). Blastocistos com número de células reduzido têm uma alta e variável incidência de fragmentação do DNA (HARDY *et al.*, 1989; BYRNE *et al.*, 1999).

## **2.10 Ocorrência da apoptose nos diferentes estágios de desenvolvimento**

### **2.10.1 Estágio de clivagem e de compactação**

A morte celular programada parece ter sua regulação vinculada ao desenvolvimento no embrião bovino (BYRNE *et al.*, 1999; MATWEE *et al.*, 2000). Estágios iniciais de desenvolvimento podem ser bastante susceptíveis a condições sub-ótimas de cultura, visto que vários produtos do gene, incluindo telomerase, não são abundantes antes da ativação do genoma embrionário (TELFORD *et al.*, 1990).

Não há observação do processo de apoptose espontânea em embriões de desenvolvimento normal antes da ativação do genoma embrionário (AGE). O tempo de AGE varia entre as diferentes espécies mamíferas. No rato, o principal evento na ativação

ocorre durante o estágio de 2 células (FLACH *et al.*, 1982), enquanto em humanos e suínos a ativação ocorre entre o estágio de 4-8 células (BRAUDE *et al.*, 1988) e entre 8-16 células em bovinos (TELFORD *et al.*, 1990). Entretanto, o processo de apoptose pode ser iniciado por induções específicas nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário, mesmo antes da AGE. Tratamento com Stausporina pode induzir apoptose em embriões de rato com 1-4 células e em embriões bovinos com 1-16 células (MATWEE, 2000).

Embriões bovinos produzidos *in vivo* apresentam as primeiras mudanças morfológicas entre os estágios de 8-16 células e as primeiras células positivas ao TUNEL no estágio de 21 células, entretanto, embriões bovinos produzidos *in vitro* apresentam tanto mudanças morfológicas como células positivas ao TUNEL já no estágio inicial de 6 células (GJORRET *et al.*, 2003). Diferentes proporções de células apoptóticas foram observadas em embriões bovinos produzidos *in vitro* nos estágios de 8-16 células (5-30% dos embriões), em mórulas bovinas produzidos *in vivo* (aproximadamente 50%) e em mórulas bovinas produzidas *in vitro* (60-80%) (BYRNE *et al.*, 1999; MATWEE, 2000; GJORRET *et al.*, 2003).

### **2.10.2 Blastocisto**

Todas as espécies mamíferas apresentam seu mais alto grau de apoptose espontânea no estágio de blastocisto.

Em uma variedade de espécies, a morte celular é observada somente durante o estágio de blastocisto e ocorre predominantemente na massa inter celular (MIC) (HANDYSIDE e HUNTER, 1986; JURISICOVA *et al.*, 1996). A morte celular no embrião poderia ser um meio para eliminação de células anormais e células com



inapropriado potencial de desenvolvimento (HARDY, 1999). A extensão e regulação da morte celular durante o estágio de pré-implantação é aparentemente crítica para os estágios mais tardios do desenvolvimento do conceito (BRISON e SCHULTZ, 1997). Entretanto, as causas, importância e regulação genética da quiescência ou morte embrionária antes da implantação necessitam ser mais claramente elucidadas.

Mudanças morfológicas foram observadas em 70-80% dos blastocistos de ratos e de humanos produzidos *in vitro* e *in vivo* (HANDYSIDE e HUNTER, 1986, HARDY 1997) e em praticamente todos os blastocistos bovinos produzidos *in vitro* e *in vivo* (GJORRET *et al.*, 2003; BYRNE *et al.*, 1999). Condensação ou fragmentação do núcleo foram avaliadas por fluorescência ou microscopia eletrônica em várias proporções de blastômeros. Blastocistos bovinos produzidos *in vivo* mostraram um percentual de 2.4% de células mortas com morfologia apoptótica no trofotoderma e 6.1% na porção principal. A proporção destas células foi maior em blastocistos produzidos *in vitro* – 3.6% no trofotoderma e 11.2% na MIC (HANDYSIDE e HUNTER, 1986).

### **2.11 Fatores reguladores da apoptose**

A decisão da célula em sofrer apoptose depende do balanço entre as moléculas responsáveis pela sobrevivência e morte celular. A razão entre os membros anti-apoptose e pró-apoptose da família Bcl-2 é a forma mais precisa de expressão da sensibilidade da célula à apoptose, mais do que quando os mesmos membros são analisados individualmente. Após o sinal para a morte celular, membros pró-apoptose (Bax, Bak e BID) sofrem uma mudança em sua conformação que possibilita integrarem-se com outras membranas, como a membrana mitocondrial. Bax e Bak apresentaram recentemente uma

interação com o canal ânion-voltagem-dependente (VDAC) facilitando a abertura de seus canais e permitindo a liberação do citocromo *c*, o qual promove a morte celular (SHIMIZU *et al.*, 1999, HENGARTNER, 2000). Fatores de sobrevivência, Bcl-2 e Bcl-xL previnem a liberação do citocromo *c* da mitocôndria por ligarem-se ao Bax ou por fecharem os poros do VDAC (SHIMIZU *et al.*, 1999). Um balanço entre esses fatores irá manter a homeostasia celular, mas se algum evento aumenta a ligação do Bax com a membrana, a liberação do citocromo *c* irá iniciar a apoptose.

Recentemente foi demonstrado que diversas proteínas do estresse térmico são capazes de regular eventos apoptóticos de maneira positiva ou negativa. HSP27 liga-se ao citocromo *c* diminuindo assim os níveis desta molécula disponíveis para formação do apoptosomo (BRUEY *et al.*, 2000). HSP70 e HSP90 podem interagir diretamente com o Apaf-1 obstruindo a formação do apoptosomo (PANDEY *et al.*, 2000; SALEH *et al.*, 2000).

Existem reguladores de apoptose tanto positivos quanto negativos para os mecanismos por meio dos receptores para a morte celular intrínseco e extrínseco. A nível de caspases iniciadoras, o FLIP é capaz de se ligar ao FADD (molécula que promove a ligação entre os receptores para morte celular e a procaspase-8), impedindo o início da cascata das caspases (KATAOKA, 1998).

A família de genes dos inibidores de apoptose, os quais foram descobertos há menos de uma década, compõem um grupo de proteínas estruturalmente relacionadas, que além de sua habilidade em suprimir a apoptose, estão aparentemente envolvidas em um aumento no número de funções celulares (SALVESSEM e DUCKETT, 2002).

Membros da família de proteínas IAP podem suprimir ou retardar a apoptose por inibição da atividade enzimática das caspases iniciadoras e executoras (SALVESSEN e DUCKETT, 2002; SHI, 2002). Atualmente são conhecidas as seguintes IAP: IAP-1, IAP-2, BIRCY, NIAP, BRUCE e survivina (DEVERAUX e REED, 1999). As IAP podem ter sua atividade neutralizada por SMAC/DIABLO, uma pequena molécula liberada pela mitocôndria junto com o citocromo *c*, que se liga às IAP permitindo assim a liberação de caspases ativas (DU *et al.*, 2000).

Embora o primeiro nível de regulação das caspases seja controlado pela ativação do zimogênio, o segundo, que é igualmente importante, envolve a inibição direta das caspases pelas IAP, das quais provavelmente a BIRCY (também conhecida como hLP1 e MIHA) é a melhor caracterizada. Esta proteína de 57 kDa é um potente inibidor da morte celular que é iniciada por diferentes estímulos. Seus efeitos protetores têm sido largamente atribuídos à sua habilidade em suprimir específicas caspases. Este efeito é diferente dos efeitos dos supressores da Bcl-2, que funcionam antes da formação do apoptosomo, prevenindo os sinais para as caspases. O domínio BIR3 da BIRCY se liga diretamente à menor subunidade da caspase-9, sendo a clivagem necessária para sua inativação pela BIRCY. Esta interação BIRCY-caspase-9 tem gerado grande interesse como um potencial tratamento terapêutico (revisado em SALVESSEN e DUCKETT, 2002).

O fator de crescimento IGF-1 (de “insuline-like growth factor-1”) é considerado outra molécula capaz de bloquear a apoptose através da ativação da proteína quinase PKB/Akt, que por sua vez inativa as proteínas pró-apoptose como Bad e caspase-9 e ativa as proteínas anti-apoptose como Bcl-2 e Bcl-xL (VINCENT e FELDMAN, 2002). JOUSAN e HANSEN (2004) demonstraram que a adição de 100 ng/mL de IGF-1 ao meio

de cultura de embriões no dia 5 após a fertilização pode diminuir a quantidade de células positivas ao TUNEL quando estes são submetidos a um estresse térmico de 41°C por 9 h. Em um segundo experimento, a adição de IGF-1 aumentou a quantidade de embriões que alcançaram o estágio de blastocisto no dia 8 após a fertilização, quando no dia 5 estes eram expostos ao mesmo estresse térmico.

Existem duas possibilidades para interpretação dos resultados que indicam a função anti-apoptótica do IGF-1. A primeira seria que o IGF-1 interrompe os efeitos do estresse térmico no desenvolvimento através do bloqueio da apoptose, sendo que as implicações dessa interferência dependem do ponto na cascata apoptótica no qual a inibição ocorreu. Uma explicação alternativa seria que a função protetora do IGF-1 ocorra independente de sua ação na apoptose. Por exemplo, o IGF-1 pode promover um aumento na regulação de glicose em embriões de ratos em estágio de pré-implantação e este efeito pode tornar os embriões mais resistentes aos danos celulares causados pelo estresse térmico (PANTALEON e KAYE, 1996).

Estudos têm mostrado que a cultura *in vitro* e a composição do meio de cultura aumentam e alteram, respectivamente, a incidência da morte celular em embriões de ratas e vacas (BRISON e SCHULTZ, 1997; BYRNE *et al.*, 1999). Existem evidências que fatores de crescimento tanto da mãe como do feto possuem um importante papel no desenvolvimento inicial do embrião (KAYE, 1997; WATSON *et al.*, 2000). Já é sabido que o cultivo de embriões em pequenos volumes ou em grupos aumenta seu potencial de desenvolvimento (SCHULTZ e HEYNER, 1993). Meios suplementados com IGF-I aumentam a frequência de formação de blastocistos e o número de células em cada blastocisto, provavelmente devido a uma redução no número de blastômeros que sofrem

morte celular (BRISON e SCHULTZ, 1997; LIGHTEN, 1998). Entretanto, embriões de rata tratados com TNF- $\alpha$  apresentam um significativo aumento no número de núcleos fragmentados na MIC com uma concomitante redução no seu número de células e conseqüentemente redução da viabilidade embrionária, tanto *in vitro* como *in vivo* (XU *et al.*, 1992).

SHAH (2004) demonstrou que o tratamento de células humanas leucêmicas de linhagem-B (BLIN) com o inibidor de caspase-9 z-LEHD-fmk, surpreendentemente promoveu um aumento na apoptose quando comparadas com as células controle tratadas com o veículo DMSO, sugerindo que os eventos iniciais que levam à perda da função mitocondrial são minimamente dependentes desta caspase. Sendo este resultado dose dependente.

### 3. CONCLUSÃO

Como todas as outras células somáticas do mamífero, embriões bovinos em estágio de pré-implantação também são capazes de sofrer apoptose. Entretanto, mecanismos regulatórios estão presentes prevenindo a apoptose nos estágios iniciais de clivagem, fazendo-se presente nos estágios de desenvolvimento mais adiantado. Esta regulação na morte celular ocorre nas espécies domésticas, nas quais não se observa fragmentação do DNA antes do estágio de 9-16 células em embriões bovinos de normal desenvolvimento, mas esta pode ser induzida por agentes agressores como o estresse térmico e o TNF- $\alpha$ , podendo representar um mecanismo de escape a estes estresses quando em uma proporção limitada. Múltiplos tipos de morte celular devem estar envolvidos na detecção e remoção de anormalidades e danos que ocorrem tanto para o embrião como um todo como para

específicos blastômeros nos diferentes estágios de desenvolvimento, em ordem de otimizar o desenvolvimento embrionário sob sub-condições ambientais. O estresse térmico e o TNF- $\alpha$  induzem a apoptose por diferentes mecanismos. Enquanto o estresse térmico age na despolarização da mitocôndria e ativação da caspase-9, o TNF- $\alpha$  age através dos receptores para a morte celular e ativação da caspase-8. Entretanto, em algumas células, o TNF- $\alpha$  pode também causar despolarização da mitocôndria.

Análises quantitativas e qualitativas do material genético e detecção de moléculas pró e anti-apoptose ajudarão a decifrar os múltiplos mecanismos de morte celular programada nos embriões bovinos em estágio de pré-implantação, caracterizando os determinantes genéticos para qualidade embrionária e sensibilidade para as condições de cultura *in vitro*.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEHAN, D. *et al.* Three-dimensional structure of the apoptosome. Implications for assembly, procaspase-9 binding and activation. **Mol Cell**, v. 9, p. 423-432, 2002.

ADRAIN, C. e MARTIN, S.J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome *seas*. **Trends Biochem Sci**, v. 26, p. 390-397, 2001.

AL-KATANANI, Y.M. *et al.* Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 85; p. 390-96, 2002.

ANTONSSON, B. The mitochondrial apoptosis pathway. In: MING, X.; DONG, Z. **Essential of apoptosis: A guide for basic and clinical research**. Totowa: Human Press Inc., 2003. Cap.6, p. 85-100.

ARÉCHIGA, C.F *et al.* Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation mouse embryos. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 1296-1301, 1995.

ASHKENAZI, A. e DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, p. 1305-1308, 1998.

BETTS, D.H. e KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v. 55, p.171–91, 2001.

BOLDIN, M.P. *et al.* Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/Apo-1- and TNF receptor–induced cell death. **Cell**, v. 85, p. 803–815, 1996.

BOTTA, D. *et al.* Glutamate-cysteine ligase attenuates TNF-induced mitochondrial injury and apoptosis **Free Radical Biology e Medicine**, v. 37, No. 5, p. 632 – 642, 2004.

BRATTON, S.B. *et al.* Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated BIRCY complexes. **EMBO J.**, v. 20, p. 998–1009, 2001.

BRAUDE, P. *et al.* Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. **Nature** v.332, p.459–61, 1988.

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

BRUEY, J.M. *et al.* Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome *c*. **Nat Cell Biol**, v. 2, p. 645 – 52, 2000.

BYRNE, A.T. *et al.* Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **J Reprod Fertil**, v. 117, p.97–105, 1999.

BUZZARD, K.A. *et al.* Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. **J Biol Chem** v. 273, p. 17147-17153, 1998.

CASCINO, I. *et al.* Three functional soluble forms of the human apoptosis inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. **J Immunol**, v. 154, p. 2706-2713.

COSTANTINI, P. *et al.* Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, p. 1042-1053, 2000.



DEVERAUX, Q.L. e REED, J.C. IAP family proteins — suppressors of apoptosis. **Genes Dev** v. 13, p.239 – 52, 1999.

DU, C. *et al.*. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c* – dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, p. 33 – 42, 2000.

EALY, A.D. *et al.* Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. **J. Anim Sci**, v. 73, p. 1401-1407, 1995.

EALY, A.D. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Anim Reprod Sci**. v. 2, p. 535-47, 2000.

EDWARDS, J.L. e HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol Reprod Dev**, v.46, p.138-145, 1997.

ELLIS, R.E. *et al.* Mechanisms and function of cell death. **Annu Rev Cell Biol**, v. 7, p. 663-698, 1991.

FERNANDES-ALNEMRI, T. *et al.* In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains (granzyme B/Mch2/protease cascade/FAS/APO-I-receptor) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 93, p. 7464-7469, 1996.

FLACH. G. *et al.* The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. **EMBO J.**, v. 1, p.681–686, 1982.

FRASER, A. e EVAN, G. A License to Kill. **Cell**, v. 85, p.781–784, 1996.

GAVRIELI, Y. et al Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, v.119, p.493-501, 1992.

GJORRET, J.O. *et al.* Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Biol Reprod**, v. 69, p. 1193–1200, 2003.

GJORRET, J.O. *et al.* Chronological appearance of apoptosis in bovine embryos reconstructed by Somatic Cell Nuclear Transfer from Quiescent Granulosa Cells. **Reprod Dom Anim** v. 40, p.210-216, 2005.

GUICCIARDI, M.E. e GORES, G.J. The death receptor family and the extrinsic pathway. In: MING, X.; DONG, Z. **Essential of apoptosis: A guide for basic and clinical research**. Totowa: Human Press Inc., 2003. Cap.5, p. 67-84.

GULBINS, E. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. **Pharm Res**, v. 47, p.393-399, 2003.

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

HANSEN, P. J. Interactions between de immune system and the ruminant conceptus. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 49, p.69-82, 1995.

HARDY, K. et al The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. **Development**, v.107, p.597-604, 1989.

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

- HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Rev Reprod**, v. 4, p. 125-134, 1999.
- HARDY, K. e SPANOS, S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. **J Endocrinol**, v. 172, p. 221–236, 2002.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770 –776, 2000.
- HERRLER, A. et al Insulin and insulin-like growth factor I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biol Reprod**, v. 59, p.1302–1310, 1998.
- JACOBSON, M.D. et al Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, p. 347-354, 1997.
- JOHNSON, A.L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 78, p. 185-201, 2003.
- JOUSAN, F.D. e HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biol Reprod**, v. 71, p. 1665-1650, 2004.
- JURISICOVA, A. et al Involvement of programmed cell death in preimplantation embryo demise. **Hum Reprod Update**, v. 1, p.558-566, 1995.
- KATAOKA, T. *et al.* FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin /granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. **J Immunol**, v. 161, p.3936 –3942, 1998.

KAYE, P.L. Preimplantation growth factor physiology. **Rev Reprod**, v.2, p. 121-127, 1997.

KESKINTEPE, L. e BRACKETT, B.G. In vitro developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biol Reprod**, v. 55, p.333-339, 1996.

KUIDA, K. *et al.* Decrease apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32 deficient mice. **Nature**, v. 384, p. 368-372, 1996.

KOLESNICK, R.; FUKS, Z. Radiation and ceramide-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 22, p. 5897-5906, 2003.

KRAMMER, P.H. CD95 a deadly mission in the immune system. **Nature**. v. 407, p. 789-795, 2000.

KRININGER III C.E. *et al.* Developmental Changes in Inhibitory Effects of Arsenic and Heat Shock on Growth of Pre-Implantation Bovine Embryos. **Mol Reprod Dev** v. 63, p.335-340, 2002.

LI, H. *et al.* Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v. 94, p. 491–501, 1998.

LI, P. *et al.* Cytochrome *c* and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade **Cell**, v. 91, p. 479–489, 1997.

LIGHTEN, A.D. *et al.* Routine addition of IGF-I could benefit clinical IVF culture. **Hum Reprod**, v. 13, p.3144-3150, 1998.

LOCKSLEY, R.M. et al The TNF and TNF-receptor superfamily: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487-581.

LIU, X *et al.* Induction of apoptotic program in cell free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, p. 147-157, 1996).

LUO, X. *et al.* BID, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome *c* release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, v. 94, p. 481–490, 1998.

MARTIN, S.J. e GREEN, D.R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? **Cell**, v. 82, p. 349-352, 1995

MATWEE, C. et al Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, p. 57-68, 2000.

MCDONNELL, M.A. et al Caspase-9 is activated in a cytochrome *c*-independent manner early during TNF $\alpha$ -induced apoptosis in murine cells **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 1005–1015, 2003.

MEDEMA, J.P. et al FLICE is activated by association with the CD95 deathinducing signaling complex (DISC). **EMBO J.** v. 16, p. 2794–2804, 1997.

MIRKES, P.E. *et al.* Teratogen-induced cell death in postimplantation mouse embryos: Differential tissue sensitivity and hallmarks of apoptosis. **Cell Death Differ** v. 5, p. 592–600, 1998.

MIRKES, P.E. e LITTLE, S. Cytochrome *c* release from mitochondria of early postimplantation murine embryos exposed to 4-hydroperoxycyclophosphamide, heat shock, and sturosporine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 162, p. 197-206, 2000.

MIRKES, P.E. Teratogen-induced activation of caspase-9 and the mitochondrial apoptotic pathway in early postimplantation mouse embryos. **Toxicology and Applied Pharmacology** v. 181, p. 142–151, 2002.

MURPHY, B.M. e MARTIN, S.J. Caspases. In: MING, X.; DONG, Z. **Essential of apoptosis: A guide for basic and clinical research**. Totowa: Human Press Inc., 2003. Cap.1, p. 3-12.

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

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, v. 88, p. 355-365, 1997.

NICHOLSON, D. W. e THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases **Trends Biochem. Sci**, v. 8, p. 299-306, 1997.

O'NEIL, C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos *in vitro*. **Biol Reprod**, v. 58, p. 1303–9, 1998.

OGRETMEN, B. e HANNUN, Y. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. **Nature Rev Cancer**, v. 4, p. 604-616, 2004.

OZAWA, M. *et al.* status of the oviduct and CDC2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. **Biol Reprod**, v. 71, p. 291-296, 2004.

OZOREN, N. *et al* The Caspase 9 Inhibitor Z-LEHD-FMK Protects Human Liver Cells while Permitting Death of Cancer Cells Exposed to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand **Cancer Research**, v. 60, p. 6259–6265, 2000.

OZOREN, N. e EL-DEIRY, W.S. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. **Neoplasia**. v. 4(6), p.551-557, 2002.

PAMPFER, S. *et al.* Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and selective effect of TNF- $\alpha$  on the inter cell mass in mouse blastocysts. **Endocrinology**, v. 134, p. 206-112, 1994.

PAMPFER, S. *et al.* Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor- $\alpha$  in vitro. **Development**, v. 124, p. 4827-4836, 1997.

PAMPFER, S. e DONNAY, I. Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. **Cell Death Differ**, v. 6, p. 533–45, 1999.

PAMPFER, S. Dysregulation of the cytokine network in the uterus of the diabetic rat. **An J Reprod Immunol**, v. 45, p. 375-381, 2001.

PANDEY, P. *et al.* Negative regulation of cytochrome *c* – mediated oligomerization of Apaf - 1 and activation of procaspase - 9 by heat shock protein 90. **EMBO J**. v. 19(16), p. 4310-4322, 2000.

PANTALEON, M. e KAYE, P.L. IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts via IGF-I receptor. **Mol Reprod Dev**, v. 44, p. 71–76, 1996.

PAULA-LOPES, F.F. e HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 295, p. 37-42, 2002-a.

PAULA-LOPES, F.F. e HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biol Reprod**, v. 66, p. 1169–77, 2002.

RADEFF-HUANG, J. et al G protein mediated signaling pathways in lysoiphospholipid induced cell proliferation and survival. **J Cell Biochem**, v. 92, p. 949-966, 2004.

RIVERA, R.M. et al Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced *in vitro* and *in vivo* following a physiologically-relevant heat shock. **Biol Reprod**, v. 69, p. 2068-2077, 2003.

RIVERA, R.M. et al Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development. **Reproduction**, v. 128, p. 33-42 (a), 2004.

RIVERA, R.M. et al Reorganization of microtubules and microfilaments by thermal stress in two-cell bovine embryos. **Biol Reprod**, v. 70, p. 1852-1862 (b), 2004.

ROTH, Z. e HANSEN, P.J. Involvement of apoptosis in disruption of oocyte competence by heat shock in cattle. **Biol Reprod**, v. 71, p. 1898-1906 (a), 2004.



ROTH, Z. e HANSEN, P.J. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. **Biol Reprod**, v. 71, p. 2072-2078 (b), 2004.

SALEH, A. *et al.* Negative regulation of the Apaf - 1 apoptosome by Hsp70. **Nat Cell Biol**, v. 2, p. 476 – 83, 2000.

SALVESSEN, G.S. e DIXIT, V.M. Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis. **Cell**, v. 91, p. 443–446, 1997.

SALVESSEN, G.S. e DIXIT, V.M. Caspase activation: the induced-proximity model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 10964-10967, 1999.

SALVESEN, G.S. e DUCKETT, C.S. IAP proteins: bloccthe road to death's door. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, p. 401-410, 2002.

SCAFFIDI, C. et al Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **EMBO J**, v. 17, p. 1675–1687, 1998.

SCHMITZ, I. *et al.* Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. **Int. J. Biochem. Cell Biology**, v. 32, p. 1123-2236, 2000.

SCHULTZ, R.M. e HEYNER S. Growth factors in preimplantation mammalian embryos. **Oxf Rev Reprod Biol**, v. 15, p. 43-81, 1993.

SHAH, N. et al Enhancement of stress-induced apoptosis in B-lineage cells by caspase-9 inhibitor **Blood**, v. 104 (9), p. 2873-2878.

SHAO, R. et al E1A Sensitizes Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis through Enhancement of Caspase Activation. **Mol Cancer Res** v. 3(4), p. 219-226, 2005.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Mol Cell**, v. 9, p. 459-470, 2002.

SHIMIZU, S. et al Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. **Nature**, v. 399, p. 483-487, 1999.

SLEE, E.A. *et al.* Ordering the cytochrome *c* initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8 and -10 in a caspase-9 dependent manner. **J Cell Biol**, v. 144, p. 281-292, 1999.

SOTO, P. *et al.* Actions of Tumor necrosis Factor- $\alpha$  on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **AJRI**, v. 50, p. 380-388, 2003.

SOTO et al. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. [Am J Reprod Immunol](#).v. 51(4), p. 294-301, 2004.

SRINIVASULA, S.M. *et al.* The Ced-3/Interleukin 1 converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2 are substrates for the apoptotic mediator CPP32. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 27099–27106, 1996.

STENNICKE, H.R. et al Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 8359–8362, 1999.

TELFORD, N.A. et al Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol Reprod Dev**, v. 26, p. 90-100, 1990.

THORNBERRY, N.A. e LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, p. 1312-1316, 1998.

VAN SOOM, A. et al Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation of the inner cell mass and trophectoderm in *in vitro* produced embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 47, p. 47-56, 1997.

VINCENT, A.M. e FELDMAN, E.L. Control of cell survival by IGF signaling pathways. **Growth Horm IGF Res**, v. 12, p. 193-197, 2002.

WATSON, A.J. et al Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biol Reprod**, v. 62, p. 355-364, 2000.

WEI, M.C. et al tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome *c*. **Genes Dev**, v. 14, p. 2060–2071, 2000.

WEIL, M. et al Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. **J Cell Biol**, v. 1333, p. 1053–9, 1996.

WOLFESON, D. *et al.* Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim Reprod Sci** v. 60-61, p.535-547, 2000.

WUU, Y.D. *et al.* Tumor Necrosis factor  $\alpha$  decreases the viability of mouse blastocysts *in vitro* and *in vivo*. **Biol Reprod** v. 60, p. 479-483, 1999.

WYLLIE, A.H. et al Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol**, v. 68, p. 251-306, 1980.

XU, K.P. et al Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and cocultured with bovine oviductal epithelial cells. **J Reprod Fertil**, v. 94, p. 33-43, 1992.

ZERON, Y. *et al.* Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction** v. 121, p. 447-54, 2001.

ZOU, H. et al Apaf-1, a human protein homologous to *c. elegans* CED-4, participates in cytochrome c dependent activation of caspase-3. **Cell**, v. 90, p. 405–413, 1997.

ZOU, H. et al An APAF-1 cytochrome *c* multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 11549–11556, 1999.

## **PUBLICAÇÕES**

Heat Shock and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induce Apoptosis in Bovine  
Preimplantation Embryos through a Caspase-9 Dependent Mechanism

Bárbara Loureiro<sup>1,2</sup>, Amber Mary Brad<sup>1</sup> and Peter James Hansen<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Animal Sciences, University of Florida; Gainesville, Florida, USA

<sup>2</sup>Dept. de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE),  
Recife-PE, Brazil

---

\* Corresponding author: Peter J. Hansen, PO Box 110910, Gainesville, FL 32611-0910, USA. E-mail: hansen@animal.ufl.edu

### **Abstract**

Heat shock and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induce apoptosis through different mechanisms, with heat shock acting to cause mitochondrial depolarization and caspase-9 activation while TNF- $\alpha$  acts through a receptor-mediated process to activate caspase-8. In some cells, however, TNF- $\alpha$  can also cause mitochondrial depolarization. In the present study, we tested the hypothesis that heat shock at 41°C and TNF- $\alpha$  induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9 dependent mechanism. Experiments were performed to test whether the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk blocks the increase in TUNEL-positive cells and caspase-9 activity in bovine embryos at day 4, 5 and 6 after fertilization caused by heat shock at 41°C and TNF- $\alpha$  and whether heat shock and TNF- $\alpha$  induce formation of active caspase-9 and cause depolarization of mitochondria. Results showed that heat shock at 41°C and TNF- $\alpha$  increased the proportion of blastomeres that were TUNEL-positive and increased caspase-9 activity. All concentrations of z-LEHD-fmk tested (1-100  $\mu$ M) blocked these effects. However, mitochondrial depolarization was induced by heat shock but not TNF- $\alpha$ . Results indicate that induction of apoptosis by both heat shock and TNF- $\alpha$  involve activation of caspase-9 dependent pathways.

## INTRODUCTION

Programmed cell death or apoptosis is developmentally regulated during preimplantation development. In the bovine embryo, there are few morphological signs of apoptosis during early cleavage stages of development (Byrne *et al.*, 1999; Matwee *et al.*, 2000). While the maturing oocyte can undergo apoptosis, at least in response to heat shock (Roth and Hansen, 2004), the two-cell embryo is refractory to induction of apoptosis caused by heat shock, arsenic, and TNF- $\alpha$  (Paula-Lopes and Hansen, 2002; Krininger *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2003). Based on results using heat shock, capacity for induced apoptosis becomes acquired between the 8 and 16 cell stage (Paula-Lopes and Hansen, 2002).

The consequences of apoptosis may also depend upon stage of development. Induction of apoptosis is a major cause for the reduced oocyte competence for fertilization and development caused by heat shock (Roth and Hansen, 2004). In contrast, limited apoptosis in response to heat shock may be beneficial by Day 4 of development because addition of the caspase inhibitor, z-DEVD-fmk, exacerbated deleterious effects of heat shock on development to the blastocyst stage (Paula-Lopes and Hansen, 2002).

It is not clear whether the signaling pathway for induction of apoptosis in the preimplantation embryo is similar to that for other cells. In the typical cell, heat shock activates the mitochondrial pathway for induction of apoptosis (Antonsson, 2003; Bettaieb and Averil-Bates, 2005; Matsumori *et al.*, 2006). This pathway involves mitochondrial depolarization, release of cytochrome c, Apaf-1 activation (apoptosis activating factor 1), and, in the presence of dATP or ATP, formation of a large multimeric complex termed



apoptosome composed of cytochrome *c*, Apaf-1, that activates procaspase-9. As a result, procaspase-9 is converted to caspase-9, which in turn leads to activation of caspase-3, cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), activation of caspase-activated DNase, and fragmentation of DNA (Mirkes & Little, 2000, Mirkes & Little, 2002; Acehan *et al.*, 2002; Bettaieb & Averil-Bates, 2005). In the other hand, tumor necrosis factor- $\alpha$  can activate apoptosis through two different pathways (Scaffidi *et al.*, 1998). For the extrinsic pathway, TNF- $\alpha$  complexes with its receptor to stimulate formation of the death-inducing signaling complex (DISC) and caspase-8 activation, which in turn causes direct activation of downstream caspases such as caspase-3 (Li *et al.*, 1998). In some cases, however, DISC formation is greatly reduced but the small amounts of active caspase-8 is sufficient to induce mitochondrial apoptogenic activity. Caspase-8 cleaves the Bcl-2 family protein, Bid, to generate a C-terminal fragment that translocates to the mitochondria to cause depolarization and cytochrome *c* release. That is the intrinsic pathway (Luo *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2000; Imao *et al.*, 2006).

In the present experiment, we tested the hypothesis that heat shock and TNF- $\alpha$  induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9 dependent mechanism. Experiments were performed to test whether the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk blocks the increase in TUNEL-positive cells in bovine embryos at days 4, 5 and 6 after fertilization caused by heat shock of 41°C and TNF- $\alpha$  and whether both heat shock and TNF- $\alpha$  induce formation of active caspase-9.

## MATERIALS AND METHODS

### *Materials*

The media HEPES-Tyrodes Lactate (HEPES-TL), IVF-TL, and Sperm-TL were purchased from Caisson (Sugar City, ID) and used to prepare HEPES-Tyrodes albumin lactate pyruvate (TALP), IVF-TALP, and Sperm-TALP as previously described (Parrish *et al.*, 1986). Oocyte collection medium (OCM) was Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) with Hank's salts without phenol red (Atlanta Biologicals, Norcross, GA) supplemented with 2% (v/v) bovine steer serum (Pel-Freez, Rogers, AR) containing 2 U/ml heparin, 100 U/ml penicillin-G, 0.1 mg/ml streptomycin, and 1 mM glutamine. Oocyte maturation medium (OMM) was TCM-199 (Gibco, Grand Island, NY) with Earle's salts supplemented with 10% (v/v) bovine steer serum, 2 µg/ml estradiol 17-β, 20 µg/ml bovine FSH (Folltropin-V; Vetrepharm Canada, London, ON), 22 µg/ml sodium pyruvate, 50 µg/ml gentamicin sulfate, and 1 mM glutamine. Percoll was from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

Potassium simplex optimized medium (KSOM) that contained 1 mg/ml BSA was obtained from Caisson. Essentially fatty-acid free (EFAF) BSA was from Sigma (St. Louis, MO). On the day of use, KSOM was modified for bovine embryos to produce KSOM-BE2 as described elsewhere (Soto *et al.*, 2003).

Murine recombinant TNF-α was purchased from United States Biological (Swampscott, MA, USA). The TNF-α was dissolved in 5 mM Tris-HCl, pH 8.0 and then diluted 1:1000 in culture medium so that the final concentration of Tris-HCl was 5 µM. In

all experiments, control medium also contained 5  $\mu\text{M}$  Tris. The caspase-9 inhibitor, z-LEHD-fmk, was obtained from R & D Systems (Minneapolis, MN). For the addition of the caspase-9 inhibitor, a vial containing 1 mg of z-LEHD-fmk was rehydrated with 62  $\mu\text{l}$  dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in 5  $\mu\text{l}$  aliquots until use when a single aliquot was diluted in KSOM-BE2 to a concentration of 100  $\mu\text{M}$ . The final concentration of DMSO in all treatments was 0.5% (v/v). Control media contained an equivalent volume of DMSO.

The In Situ Cell Death Detection Kit (rhodamine) was obtained from Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN). Polyvinylpyrrolidone (PVP) was purchased from Eastman Kodak (Rochester, NY) and RQ1 RNase-free DNase was from Promega (Madison, WI). Prolong Antifade Kit was obtained from Molecular Probes (Eugene, Oregon). CaspaLux 9-M<sub>1</sub>D<sub>2</sub> was purchased from OncoImmunit (Gaithersburg, MD). Hoescht 33342 was purchased from Sigma and 3,3'-dihexiloxadycarbocyanine [DiOC<sub>6</sub>(3)] was purchased from Sigma-Aldrich (USA). The DiOC<sub>6</sub>(3) was prepared as 1 mg/mL stock solution in DMSO that was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . On the day of use, the stock solution was sequentially diluted in KSOM to a final concentration of 20 nM. All other reagents were purchased from Sigma or Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

### ***In Vitro Production of Embryos***

Embryo production was performed as previously described (Jousan and Hansen, 2004). Briefly, cumulus oocyte complexes (COCs) were obtained by slicing 2- to 10-mm follicles on the surface of ovaries (a mixture of beef and dairy cattle) obtained from Central Beef Packing Co. (Center Hill, FL). Those COCs with at least one complete layer of

compact cumulus cells were washed two times in OCM and used for subsequent steps. Groups of 10 COCs were placed in 50- $\mu$ l microdrops of OMM overlaid with mineral oil and matured for 20–22 h at 38.5°C in an atmosphere of 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in humidified air. Matured COCs were then washed once in HEPES-TALP and transferred in groups of 30 to 4-well plates containing 600  $\mu$ l of IVF-TALP and 25  $\mu$ l of PHE (0.5 mM penicillamine, 0.25 mM hypotaurine, and 25  $\mu$ M epinephrine in 0.9% [w/v] NaCl) per well and fertilized with  $\sim 1 \times 10^6$  Percoll-purified spermatozoa from a pool of frozen-thawed semen from three bulls. After 20–22 h at 38.5°C in an atmosphere of 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in humidified air, putative zygotes were removed from fertilization wells, denuded of cumulus cells by vortex in HEPES-TALP, and placed in groups of 30 in 50- $\mu$ l microdrops of KSOM-BE2.

Putative zygotes were cultured in KSOM-BE2, overlaid with mineral oil and cultured at 38.5°C in an atmosphere of 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in humidified air until selected for treatment at Day 4, 5 and 6 after insemination. At these times, embryos  $\geq 16$  cells (day 4), morulae (day 5), and compact morulae (solid spherical mass of blastomeres) or early blastocysts (day 6) were harvested from culture and utilized as required for the specific experimental design.

### ***TUNEL Assay***

Embryos were washed two times in 50- $\mu$ l microdrops of 10 mM KPO<sub>4</sub>, pH 7.4 containing 0.9% (w/v) NaCl (PBS) and 1 mg/ml PVP (PBS-PVP) by transferring the embryos from microdrop to microdrop. Zona pellucida-intact embryos were fixed in a 50- $\mu$ l microdrop of 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature,

washed twice in PBS-PVP, and stored in 600  $\mu$ l of PBS-PVP at 4°C until the time of assay. All steps of the TUNEL assay were conducted using microdrops in a humidified box.

On the day of the TUNEL assay, embryos were transferred to a 50- $\mu$ l microdrop of PBS-PVP and then permeabilized in 0.1% (v/v) Triton X-100 containing 0.1% (w/v) sodium citrate for 10 min at room temperature. Controls for the TUNEL assay were incubated in 50  $\mu$ l of RQ1 RNase-free DNase (50 U/ml) at 37°C in the dark for 1 h. Positive controls and treated embryos were washed in PBS-PVP and incubated with 25  $\mu$ l of TUNEL reaction mixture (containing TMR red-conjugated dUTP and the enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase as prepared by and following the guidelines of the manufacturer) for 1 h at 37°C in the dark. Negative controls were incubated in the absence of terminal deoxynucleotidyl transferase. Embryos were then washed three times in PBS-PVP and incubated in a 25- $\mu$ l microdrop of the Hoescht 33342 (1  $\mu$ g/ml) for 15 min in the dark. Embryos were washed three times in PBS-PVP to remove excess of Hoescht 33342, mounted on 10% (w/v) poly-L-lysine coated slides using 3- to 4- $\mu$ l microdrops of Antifade, and coverslips were placed on the slides. Labeling of TUNEL and Hoescht nuclei was observed using a Zeiss Axioplan 2 epifluorescence microscope (Zeiss, Göttingen, Germany). Each embryo was analyzed for total cell number (blue nuclei) and TUNEL-positive blastomeres (red nuclei) with DAPI and rhodamine filters, respectively, using a 20x objective. Digital images were acquired using AxioVision software (Zeiss) and a high-resolution black and white Zeiss AxioCam MRm digital camera.

### ***Caspase-9 activity***

CaspaLux 9-M<sub>1</sub>D<sub>2</sub> is a caspase-9 substrate that contains a dimer molecule labeled with a green fluorophore. When caspase-9 cleaves the dimer, the substrate fluoresces. To measure caspase activity, embryos were removed from culture medium and washed 3 times in 50 µl microdrops of prewarmed Hepes-TALP. Embryos were incubated in groups in 25 µl microdrops of 5 µM CaspaLux 9-M<sub>1</sub>D<sub>2</sub> at room temperature for 1 h in the dark. Following incubation, embryos were washed 4 times in 50 µl microdrops of prewarmed Hepes-TALP, placed in 2 well slides with 80 µl of Hepes-TALP. Caspase activity was measured using a Zeiss Axioplan 2 fluorescence microscope with a 10X objective and FITC filter. Digital images were acquired using AxioVision software (Zeiss) and a high-resolution black and white Zeiss AxioCam MRm digital camera. Embryos were classified based on the fluorescence intensity as low caspase activity (none or one fluorescent cell), medium caspase activity (less than half of the cells fluorescents) or high caspase activity (more than half of the cells fluorescent).

### **DiOC<sub>6</sub>(3)**

DiOC<sub>6</sub>(3) is a mitochondrial probe that emits fluorescence when taken up by polarized mitochondria. For the assay, embryos were washed 3 times in 50 µl microdrops of prewarmed Hepes-TALP and incubated in a 25 µl microdrop of 20 nM DiOC<sub>6</sub>(3) for 20 min at 38.5°C in the dark. Following incubation, embryos were washed 3 times in 50 µl microdrops of prewarmed Hepes-TALP and placed in 2 well slides with 80 µl of Hepes-TALP. Mitochondria membrane depolarization was measured using a Zeiss Axioplan 2 fluorescence microscope with a 10X objective and FITC filter. Digital images were acquired using AxioVision software (Zeiss) and a high-resolution black and white Zeiss AxioCam MRm digital camera. Fluorescence intensity was measured by drawing a circular

line around each embryo and determining average pixel intensity with Zeiss AxioVision software.

## **Experiments**

***Role of caspase-9 and stage of development in induction of apoptosis by heat shock and tumor necrosis factor- $\alpha$  in bovine preimplantation embryos.*** The experiment was designed with a 3 x 2 x 3 factorial arrangement of treatments to determine whether the caspase-9 inhibitor, z-LEHD-fmk, blocks the apoptotic effects of heat shock and TNF- $\alpha$ . Main effects were day of collection (days 4, 5 or 6), z-LEHD-fmk (+ or -) and treatment (38.5°C, 38.5°C + TNF- $\alpha$ , or 41°C). Embryos were collected on Day 4, 5 and 6 after insemination and randomly transferred in groups of 7-14 to a fresh 25  $\mu$ l microdrop of KSOM-BE2 containing 100  $\mu$ M z-LEHD-fmk or an equivalent amount of DMSO [0.5%, (v/v)]. Moreover, microdrops contained either 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or vehicle, 5  $\mu$ M Tris-HCl, pH 8.0. Embryos were then cultured at either 38.5°C for 24 h or, for heat-shocked embryos, at 41°C for 15 h followed by 38.5°C for 9 h. At 24 h after initiation of treatment, embryos were fixed and stored in PBS-PVP at 4°C until analysis by TUNEL assay. The experiment was replicated 4-5 times for each day (172-248 embryos per treatment).

***Effects of different concentrations of the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk on apoptotic responses of embryos to TNF- $\alpha$ .*** The experiment was designed as a 2 x 4 factorial with main effects of TNF- $\alpha$  (0 or 10 ng/mL) and z-LEHD-fmk (0, 1, 10, or 100  $\mu$ M). Bovine embryos  $\geq$ 16 cells were collected at Day 6 after insemination and were cultured in groups of 6-8 in 25  $\mu$ l microdrops of KSOM-BE2 for 24 h in the presence of different concentrations of the inhibitor z-LEHD-fmk (reconstituted in 0.5% (v/v) DMSO)  $\pm$  10

ng/mL TNF- $\alpha$ ; the final concentration of Tris-HCl, pH 8.0 was 5  $\mu$ M in all microdrops. After 24 h at 38.5°C, embryos were washed, fixed, and stored in PBS-PVP at 4°C until analysis by TUNEL. The experiment was replicated 4 times (20-28 embryos/treatment).

***Induction of caspase-9 activity by heat shock.*** The experiment was designed with a 2 x 2 factorial arrangement of treatments to determine whether heat shock increases caspase-9 activity and whether z-LEHD-fmk blocks this increase. Embryos at the morula or early blastocyst stage were collected at Day 6 after insemination and transferred in groups of 4-7 to a new 25  $\mu$ l microdrop of KSOM-BE2 containing 100  $\mu$ M z-LEHD-fmk or DMSO vehicle. Embryos were then cultured at either 38.5°C for 24 h or 41°C for 15 h followed by 38.5°C for 9 h. At the end of heat shock, embryos were washed 3 times in 50  $\mu$ l microdrops of prewarmed HEPES-TALP and then incubated in a 25  $\mu$ l microdrop of HEPES-TALP containing 5  $\mu$ M CaspaLux 9-M<sub>1</sub>D<sub>2</sub> at room temperature for 1 h in the dark. Embryos were classified as having low caspase activity (0-1 fluorescent cell), medium caspase activity (less than half of the cells fluorescent) or high caspase activity (more than half of the cells fluorescent). The experiment was replicated 5 times using 23-26 embryos per treatment.

***Time-course of caspase-9 activation by TNF- $\alpha$ .*** The experiment was designed with a 2 x 2 x 5 factorial arrangement of treatments to determine whether TNF- $\alpha$  increases caspase-9 activity at various times after exposure to TNF- $\alpha$ . Embryos at the morula or early blastocyst stage were collected at Day 6 after insemination and transferred in groups of 3-7 to a new microdrop of 25  $\mu$ l KSOM-BE2 containing 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or an equivalent amount of Tris-HCl vehicle. Embryos cultured at 38.5°C for 3, 6, 9, 12 or 15 h before harvesting and washing 3 times in 50  $\mu$ l microdrops of prewarmed HEPES-TALP. Embryos



were then subjected to caspase-9 assay as described earlier. The experiment was replicated 8 times using 37-39 embryos per treatment.

***Effects of heat shock and TNF- $\alpha$  on mitochondrial membrane integrity.*** Embryos at approximately 3.5 days after insemination and  $> 8$  cells were harvested and transferred in groups of 10-30 to a new 25  $\mu$ l microdrop of KSOM-BE2 containing  $\pm 10$  ng/mL TNF- $\alpha$  or Tris-HCl vehicle. Embryos were used at an earlier stage of development for this experiment as compared to others to simplify visualization of mitochondria (because of the reduced cell number). Embryos were incubated at 38.5°C for 24 h  $\pm$  TNF- $\alpha$  embryos or were incubated at 41°C for 15 h followed by 9 h at 38.5°C (heat shock). After treatment, embryos were washed 3 times in 50  $\mu$ l microdrops of prewarmed Hepes-TALP and then incubated in 25  $\mu$ l microdrops of 20 nM of DiOC<sub>6</sub> at 38.5°C for 20 min in the dark. Mitochondrial depolarization was measured by quantifying the fluorescence units/area of each embryo. The experiment was replicated five times (71-78 embryos/treatment).

### ***Statistical Analysis***

Data on percentage of cells that were TUNEL-positive and fluorescent intensity were analyzed by least-squares analysis of variance using the General Linear Models procedure of SAS (SAS for Windows, Version 9.0, Cary, NC). Percentage data were transformed by arcsin transformation before analysis. The mathematical model included main effects and all interactions. Replicate was considered as a random effect and other main effects were considered fixed. Tests of significance were made using error terms determined by calculation of expected mean squares. All values reported are least-squares means  $\pm$  SEM. Probability values for percentage data are based on analysis of arcsin-

transformed data while least-squares means are from analysis of untransformed data. Categorical data regarding the percent of embryos classified as having low, medium or high caspase-9 activity were analyzed by the CATMOD procedure of SAS using main effects and all interactions.

## **RESULTS**

### ***Role of caspase-9 in induction of apoptosis by heat shock and tumor necrosis factor- $\alpha$ in bovine preimplantation embryos at Days 4, 5, and 6 after insemination***

Representative images of TUNEL labeling are shown in Figure 1 and least-squares means  $\pm$  SEM for percentage of blastomeres labeled as TUNEL positive are shown in Figure 2. Heat shock at 41°C for 15 h and incubation with TNF- $\alpha$  for 24 h increased the percentage of TUNEL-positive cells in control embryos at all days examined (Days 4, 5 and 6) compared with embryos cultured at 38.5°C for 24 hours. However, induction of apoptosis by both stimuli was blocked by the presence of the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk (treatment  $P < 0.001$ ; inhibitor,  $P < 0.01$ ; treatment x inhibitor;  $P < 0.05$ ). There was no effect of day after insemination or interactions with day (Figure 2).

### ***Effects of different concentrations of z-LEHD-fmk on apoptotic responses to TNF- $\alpha$***

As shown in Figure 3, addition of 10 ng/mL TNF- $\alpha$  to culture medium increased the percentage of TUNEL-positive cells at Day 6 embryos. This increase was blocked by z-LEHD-fmk at all concentrations tested (1, 10 and 100  $\mu$ M) (TNF- $\alpha$  x inhibitor;  $P < 0.05$ ).

### ***Induction of caspase-9 activity by heat shock***

Representative images of caspase-9 activity in embryos as affected by heat shock and z-LEHD-fmk are shown in Figure 4 while the proportion of embryos classified as having low, medium or high caspase activity are shown in Figure 5. Exposure of embryos to 41°C increased the proportion of embryos classified as having medium and high caspase-9 activity and this increase was blocked by z-LEHD-fmk (treatment  $P < 0.05$ ; inhibitor  $P < 0.001$ ).

#### ***Time-course of caspase-9 activation by TNF- $\alpha$***

Representative images of caspase-9 activity in embryos as affected by TNF- $\alpha$  are shown in Figure 6 while the proportion of embryos classified as having low, medium or high caspase activity are shown in Figure 7. The proportion of embryos classified as having medium or high caspase activity was increased by the addition of 10 ng/mL TNF- $\alpha$  at all time points except at 3 h after addition (treatment,  $P < 0.05$ ; time,  $P < 0.01$ ).

#### ***Effects of heat shock and TNF- $\alpha$ on mitochondrial membrane integrity***

Heat shock at 41°C for 15 hours caused a significant loss in mitochondria membrane potential comparing to embryos cultured at 38.5°C ( $P < 0.01$ ). However, TNF- $\alpha$  did not show a significant decrease on mitochondrial membrane polarization.

### **Discussion**

Apoptosis has been shown to have an important role in the survival of the preimplantation embryo. While excessive activation of the apoptotic process is likely to lead to embryonic demise, limited apoptosis in response to stress can facilitate embryonic survival (Paula-Lopes and Hansen, 2002). In the current report, experimental evidence is

presented to demonstrate that activation of caspase-9 is a prerequisite for activation of apoptosis in preimplantation bovine embryos in response to heat shock and TNF- $\alpha$ . Such a result indicates, that for several other cells like pro-B lymphoma cells (McDonnell *et al.*, 2003); human hepatocytes (Ozoren *et al.*, 2000); human colon cancer cells (Ozoren and El-Deiry; 2002), the preimplantation bovine embryo activates pathways distinct from the prototypical extrinsic pathway of TNF- $\alpha$  induction of apoptosis.

That both heat shock and TNF- $\alpha$  require caspase-9 activation for induction of apoptosis is indicated by findings that 1) caspase-9 was activated by both stimuli, and 2) inhibition of caspase-9 activity with z-LEHD-fmk blocked induction of apoptosis in response to both heat shock and TNF- $\alpha$ . Activation of caspase-9 activity first occurred between 3 and 6 h of TNF- $\alpha$  treatment, a time frame similar to the 6-12 hours required for cytochrome c release in pro-B lymphoma cells following treatment with TNF- $\alpha$ /cycloheximide (MacDonnell *et al.*, 2003).

It is well documented that z-LEHD-fmk is a specific inhibitor for caspase-9 and does not inhibit other caspases, such as caspase-8 that would be involved in the extrinsic pathway for apoptosis (Ozoren *et al.*, 2000; Kondoh *et al.*, 2002). Moreover, z-LEHD-fmk was inhibitory to TNF- $\alpha$  induced apoptosis even when concentrations of z-LEHD-fmk were as low as 1  $\mu$ M to minimize non-specific inhibition.

The finding that heat shock activates the mitochondrial pathway for apoptosis was expected because this is the case for many cell types as L929 cells (Ko *et al.*, 2000), postimplantation mouse embryos (Mirkes & Little, 2002), and brain cells (Matsumori *et al.*, 2006). Also, heat shock causes mitochondrial swelling in two-cell stage embryos cultured

at 41 and 43°C (Rivera *et al.*, 2003; 2004). In contrast, TNF- $\alpha$  induction of apoptosis typically occurs through a death receptor-mediated process to activate caspase-8 and cleavage of caspase-3 (extrinsic pathway). In some cells, however, TNF- $\alpha$  can also cause mitochondrial depolarization and cytochrome *c* release (intrinsic pathway). Cells have been classified as type I or type II depending on their response to ligands such as Fas or TNF- $\alpha$  (Scaffidi *et al.*, 1998). In type I cells, death receptor ligation causes a strong formation of DISC (death-inducing signaling complex) and subsequent activation of large amounts of caspase-8 followed by immediate cleavage of procaspase-3 and activation caspase-3 and its effector mechanisms leading to cell death (Scaffidi *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). In type II cells, DISC formation is reduced and there is a corresponding decrease in activation of caspase-8. The small amounts of caspase-8 activated are sufficient, however, to induce Bid cleavage, Bax and Bak dimerization, and cytochrome *c* release (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1998).

TNF- $\alpha$  can induce apoptosis through different mechanisms using the intrinsic pathway. The mitochondrial membrane depolarization, release of cytochrome *c*, formation of apoptosome and caspase-9 activation was showed in innumeros cells such as L929 cells (Ko *et al.*, 2000), human hepatocytes, human colon carcinoma (Ozoren *et al.*, 2000), and cells with the adenovirus type 5 E1A (Shao *et al.*, 2005). Bid is consider the potential determinant factor for the cells to choose this pathway. The rate of Bid appears to characterize the capacity of the cells to trigger mitochondrial cytochrome *c* release as showed by Ozoren and El-Deiry (2002) when studied human colon cancer cells. However, pro-B lymphoma cells with high levels of Bcl-xL, a cytochrome *c* inhibitor, and Apaf-1 knockout murine cells showed that caspase-9 is processed prior to mytochondrial

cytochrome *c* release (McDonnell *et al.*, 2003), suggesting that caspase-9 has an important role in cell death mechanism, being considered in this case, not as an initial caspase, but as an effector caspase.

In addition, TNF- $\alpha$  can induce an elevated and prolonged activation of p38 MAPK which, in turn, mediates a translocation of Bax to the mitochondria, causing mitochondrial depolarization, release of cytochrome *c* and Apaf-1 to the cytosol, caspase-3 activation and cell death (Pastorino *et al.*, 2003).

Ours results suggest that TNF- $\alpha$  induces apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9 dependent mechanism. It is not clear yet if it involves mitochondria membrane depolarization and cytochrome *c* release or direct caspase-9 activation. Caspase-8 can also be involved since a small amount of caspase-8 is necessary for Bid cleavage, cytochrome *c* release and caspase-9 activation in some cells.

Apoptosis in bovine preimplantation embryos is a developmentally-regulated phenomenon. While the oocyte is capable of apoptosis in response to heat shock, at least during maturation (Roth & Hansen, 2004), the capacity for apoptosis is lost at the two-cell stage and does not become reacquired until sometime between the eight and sixteen cell stage (Byrne *et al.*, 1999; Matwee, 2000; Paula-Lopes and Hansen, 2002; Gjørret *et al.*, 2005). Here we showed, that among embryos capable of apoptosis, there is little change in the degree of apoptosis as embryos undergo further development through Day 6 after insemination. This is so because the percent of cells that were TUNEL positive in response to either heat shock or TNF- $\alpha$  was similar for embryos at Days 4, 5 and 6 after insemination.

Knowing the mechanism of heat shock and TNF- $\alpha$  induction of apoptosis would allow the design of better strategies for embryos *in vitro* embryo production and consequent greatly increase in pregnancy rates. It seems that heat shock and TNF- $\alpha$  are acting through a caspase-9 dependent mechanism on embryo cell death. This is an important finding for the knowledge of embryo development, allowing us to understand the chosen pathway in response to heat shock and TNF- $\alpha$  that are currently significant problems in bovine reproduction.

### **Acknowledgments**

Supported in part by Grant No. US-3551-04 from the Binational Agricultural Research and Development Fund and Grant No. 2004-34135-14715 from the USDA-Tropical Subtropical Agricultural Research Program. We thank William Rembert for collecting ovaries; Marshall, Adam, and Alex Chernin and employees of Central Beef Packing Co. (Center Hill, FL) for providing ovaries; and Scott A. Randell of Southeastern Semen Services (Wellborn, FL) for donating semen. Rodrigo Nunes de Assis for the assistance during the experiments.

## REFERENCES

Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome. Implications for assembly, procaspase-9 binding and activation. *Mol Cell*, 2002; 9: 423-432.

Antonsson B. The mitochondrial apoptosis pathway. In: Ming X, Dong Z. *Essential of apoptosis: A guide for basic and clinical research*. Totowa: Humana Press Inc.; 2003: 85-100.

Bettaieb A, Averill-Bates DA. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *J. Cell Physiol* 2005; 205:47-57.

Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil* 1999; 117:97–105.

Gjørret JO, Wengle J, Maddox-Hyttel P, King WA. Chronological appearance of apoptosis in bovine embryos reconstructed by somatic cell nuclear transfer from quiescent granulosa cells *Reprod Dom Anim* 2005; 40:210-216.

Imao M, Nagaki M, Imose M, Moriwaki H. Differential Caspase-9-dependent signaling pathway between tumor necrosis factor receptor- and Fas-mediated hepatocyte apoptosis in mice. *Liver International* 2006; 26:137–146.

Jousan FD, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol Reprod* 2004; 71:1665-1670.



Kawai H, Suzuki T, Kobayashi T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kawanishi T. Simultaneous imaging of initiator/effector caspase activity and mitochondrial membrane potential during cell death in living HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1693:101– 110.

Ko S, Yuen WF, Fung PD, Lee CY, Choy YM, Cheng HK, Kwok, TT, Kong SK. Reversal of TNF $\alpha$  resistance by hyperthermia: Role of mitochondria. *Life Sci* 2000; 67: 3113–3121.

Krinninger III CE, Stephens SH, Hansen PJ. Developmental Changes in Inhibitory Effects of Arsenic and Heat Shock on Growth of Pre-Implantation Bovine Embryos. *Mol Reprod Dev* 2002; 63:335-340.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94:491–501

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91:479-489.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94:481-490

Matsumori Y, Northington FJ, Hong SM, Kayama T, Sheldon RA, Vexler ZS, Ferriero DM, Weinstein PR, Liu J Reduction of Caspase-8 and -9 Cleavage Is Associated With Increased c-FLIP and Increased Binding of Apaf-1 and Hsp70 After Neonatal Hypoxic/Ischemic Injury in Mice Overexpressing Hsp70. *Stroke* 2006; 37:507-512;

Matwee C, Betts DH, King WA. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* 2000; 8:57-68.

McDonnell MA, Wang D, Khan, SM, Vander Heiden MG, Kelekar A. Caspase-9 is activated in a cytochrome c-independent manner early during TNF $\alpha$ -induced apoptosis in murine cells. *Cell Death Differ.* 2003; 10:1005–1015.

Mirkes PE, Little SA. Teratogen-induced cell death in postimplantation mouse embryos: Differential tissue sensitivity and hallmarks of apoptosis. *Cell Death Differ.* 1998; 5:592–600.

Mirkes PE, Little SA. Cytochrome c release from mitochondria of early postimplantation murine embryos exposed to 4-hydroperoxycyclophosphamide, heat shock, and sturosporine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000; 162:197-206.

Mirkes PE, Little SA. Teratogen-induced activation of caspase-9 and the mitochondrial apoptotic pathway in early postimplantation mouse embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002; 181:142–151.

Muzio M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem* 1998; 273: 2926-2930.

Ozoren N, Kim K, Burns TF, Dicker DT, Moscioni AD, El-Deiry WS. The caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 2000; 60:6259-6265.

Ozoren N, El-Deiry WS. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* 2002; 4(6):551-557.

Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. TNF- $\alpha$  induced cell death in ethanol-exposed cells depends on

p38 MAPK signaling but is independent of Bid and caspase-8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285:503-516.

Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 295:37-42.

Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Heat shock-induced in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol. Reprod.* 2002; 66:1169-1177.

Roth Z, Hansen PJ. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.* 2004; 71:1898-1906.

Rivera RM, Kelley KL, Erdos GW, Hansen PJ. Alterations in Ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically relevant heat shock. *Biol. Reprod.* 2003; 69:2068-2077.

Rivera RM, Kelley KL, Erdos GW, Hansen PJ. Reorganization of Microfilaments and Microtubules by Thermal Stress in Two-Cell Bovine Embryos. *Biol.Reprod.* 2004; 70:1852-1862.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998; 17:1675-1687.

Shao R, Lee DF, Wen Y, Ding Y, Xia W, Ping B, Yagita H, Spohn B, Hung MC E1A Sensitizes Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis through Enhancement of Caspase Activation. *Mol Cancer Res.* 2005; 3:219-226.

Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. Actions of Tumor necrosis Factor- $\alpha$  on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2003; 50:380-388.

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 2000; 14:2060-2071.

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Masse B, Kroemer G. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Letter* 1996; 384 (1):53–7.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405–413.

## FIGURES

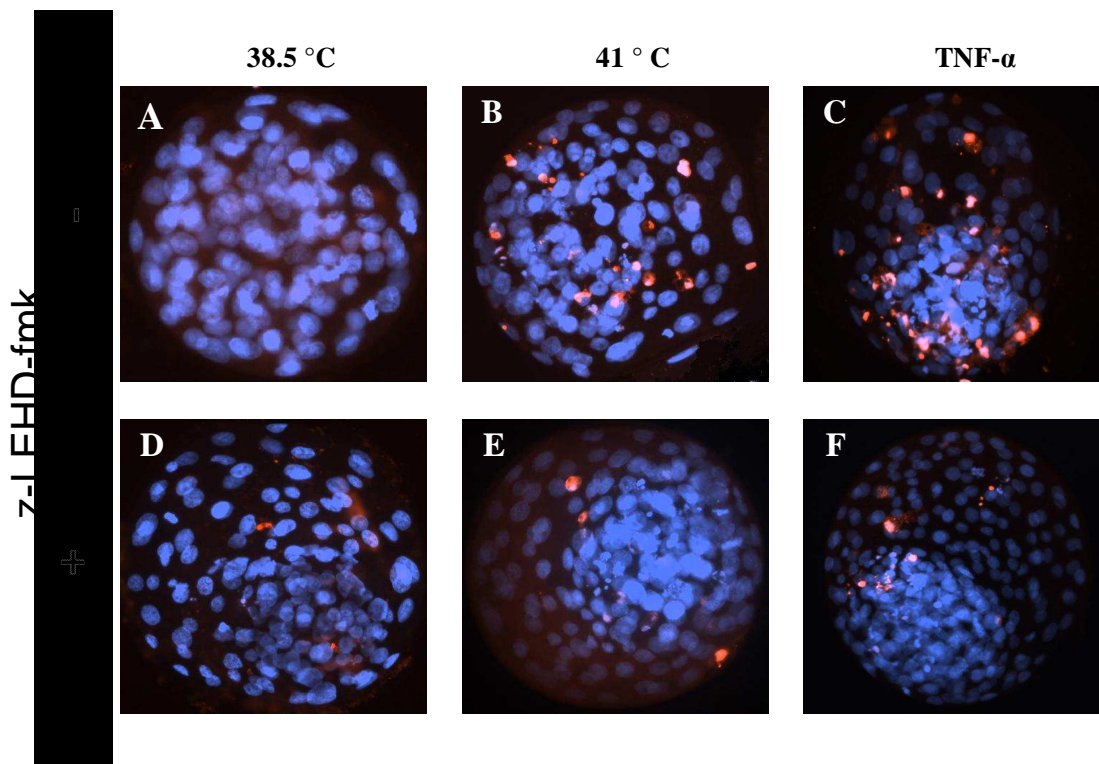


FIG. 1. Representative photomicrographs illustrating the frequency of apoptotic nuclei in embryos as affected by heat shock and treatment with tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). All embryos were collected at day 6 after insemination. Detection of apoptosis was by TUNEL analysis using TMR red-conjugated dUTP to identify apoptotic nuclei (red) and Hoescht 33342 to identify all nuclei (blue). Note that exposure of embryos to 41°C for 15 h (B) and to TNF- $\alpha$  (C) increased the frequency of TUNEL-positive cells compared to embryos cultured at 38.5°C (A). In the presence of z-LEHD-fmk, however, there was no difference in TUNEL labeling between embryos cultured at 38.5°C (D), 41°C (E) or with TNF- $\alpha$  (F).

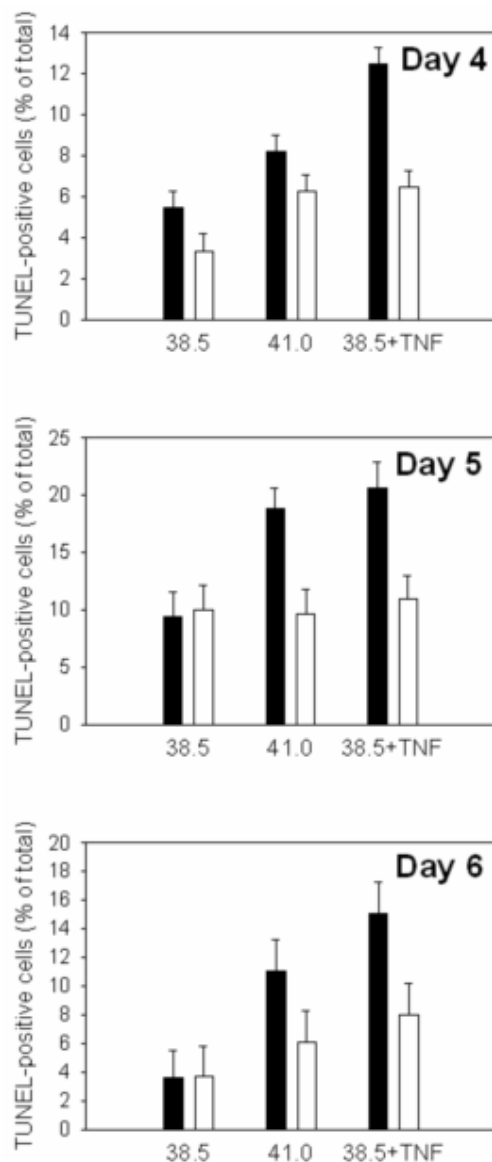


FIG. 2. Induction of apoptosis by heat shock and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in bovine embryos at day 4, 5 and 6 after insemination. Data are least-squares means  $\pm$  SEM. The experiment was replicated 4-5 times/day using 172-248 embryos/day. In embryos without caspase inhibitor (solid bars), heat shock of 41°C for 15 h and TNF- $\alpha$  for 24 h increased the proportion of cells that were TUNEL-positive compared with embryos cultured at 38.5°C for 24 h. In embryos incubated with the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk (open bars), however, there was no increase in the proportion of cells that were TUNEL positive (treatment,  $P < 0.001$ ; inhibitor,  $P < 0.01$ ; treatment  $\times$  inhibitor;  $P < 0.05$ ). There was no effect of day or interactions with day.

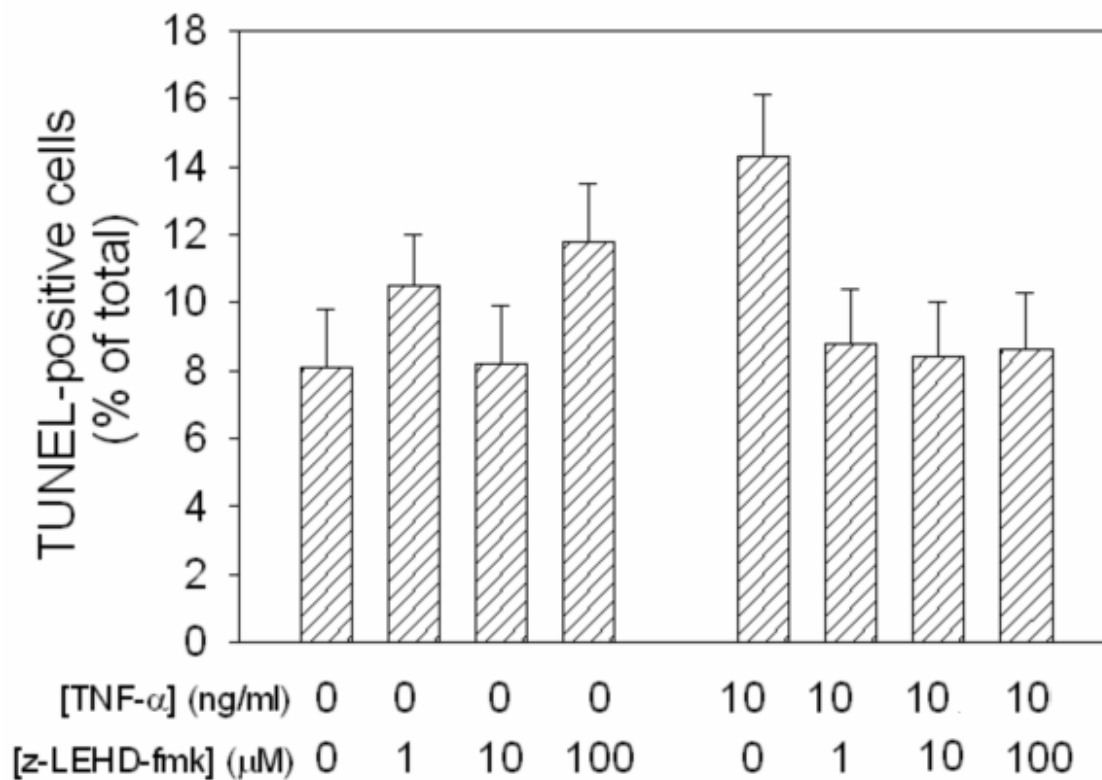


FIG. 3. Effects of different concentrations of the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk on apoptotic responses of embryos to tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Shown are the percentage of cells that were TUNEL-positive in bovine embryos treated at Day 6 after insemination treated  $\pm$  TNF- $\alpha$  in the presence of varying concentrations of z-LEHD-fmk. The experiment was replicated 4 times, using 20-28 embryos/treatment. The proportion of cells labeling positive for TUNEL was affected by the TNF- $\alpha$  x inhibitor interaction ( $P < 0.05$ ).

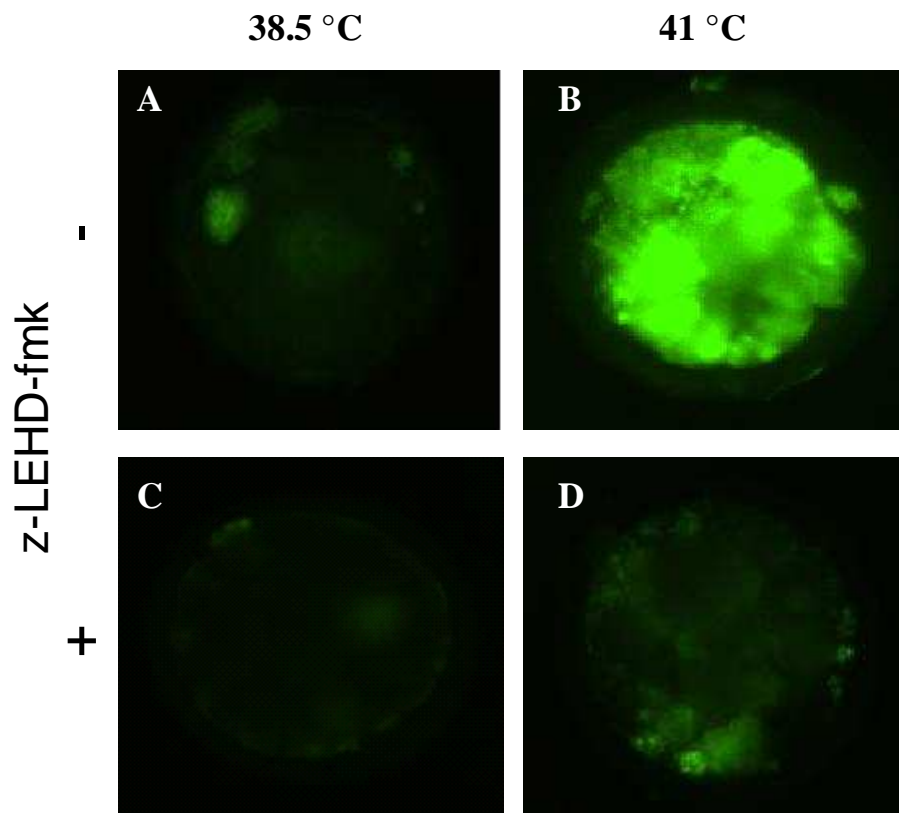


FIG. 4. Representative photomicrographs illustrating induction of caspase-9 activity by heat shock in embryos at Day 6 after insemination. Caspase-9 activity was determined using the fluorogenic substrate CaspaLux 9-M<sub>1</sub>D<sub>2</sub>. Note that exposure of embryos to 41°C for 15 h (B) increased fluorescent intensity compared to embryos cultured at 38.5°C (A). When embryos were cultured in z-LEHD-fmk, however, there was no increase in intensity after exposure to 41°C for 15 h (D) as compared to culture at 38.5°C (C).



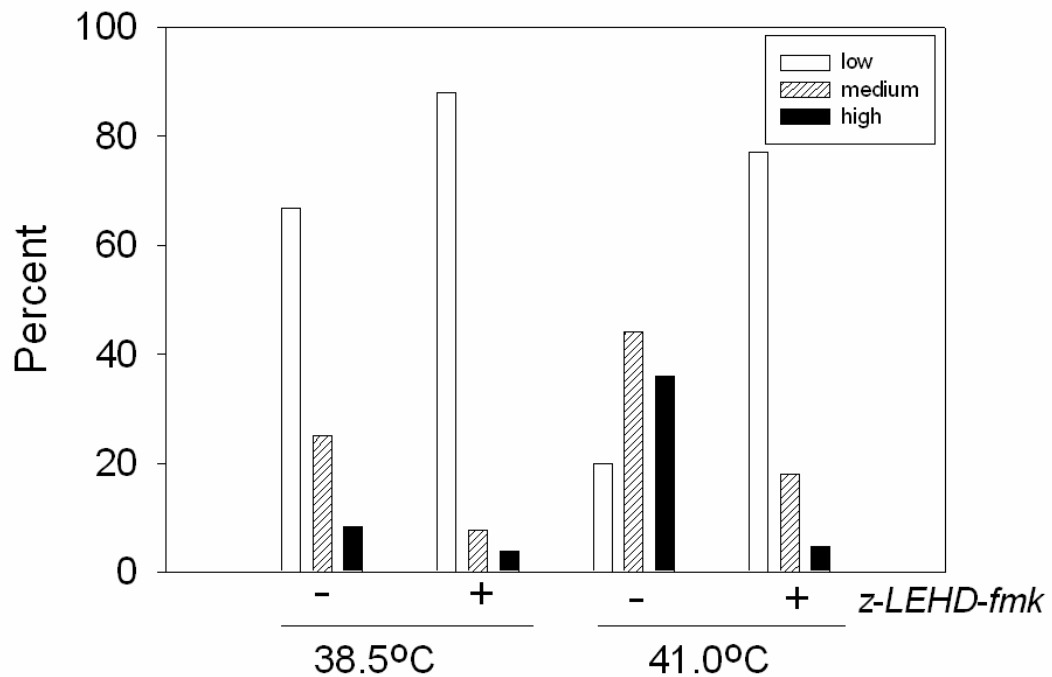


FIG. 5. Induction of caspase-9 activity by heat shock. Data are expressed as the percentage of embryos displaying low, medium or high fluorescent intensity. Embryos were cultured at 38.5°C or 41°C for 15 h in the presence or absence of 100  $\mu$ M z-LEHD-fmk. The experiment was replicated 5 times using 23-26 embryos per group. The distribution of embryos into fluorescence classes was affected by treatment ( $P < 0.05$ ) and inhibitor ( $P < 0.001$ ).

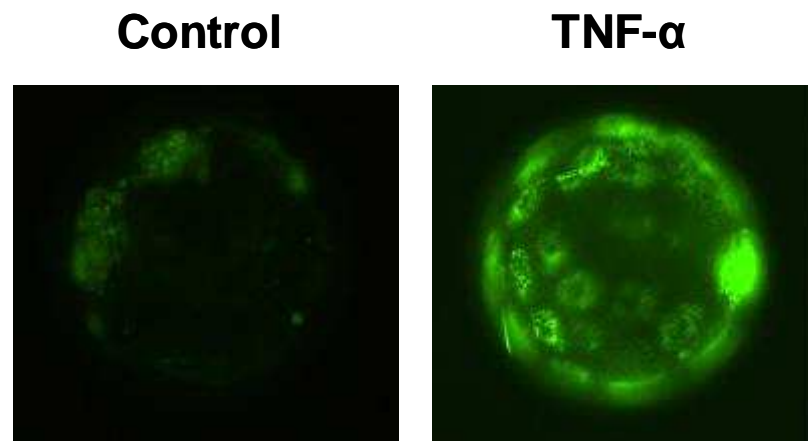


FIG. 6. Representative photomicrographs illustrating activation of caspase-9 activity in response to tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Shown are Day 6 embryos cultured with or without 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 12 h. Caspase-9 activity was determined using the fluorogenic substrate CaspaLux 9-M<sub>1</sub>D<sub>2</sub>.

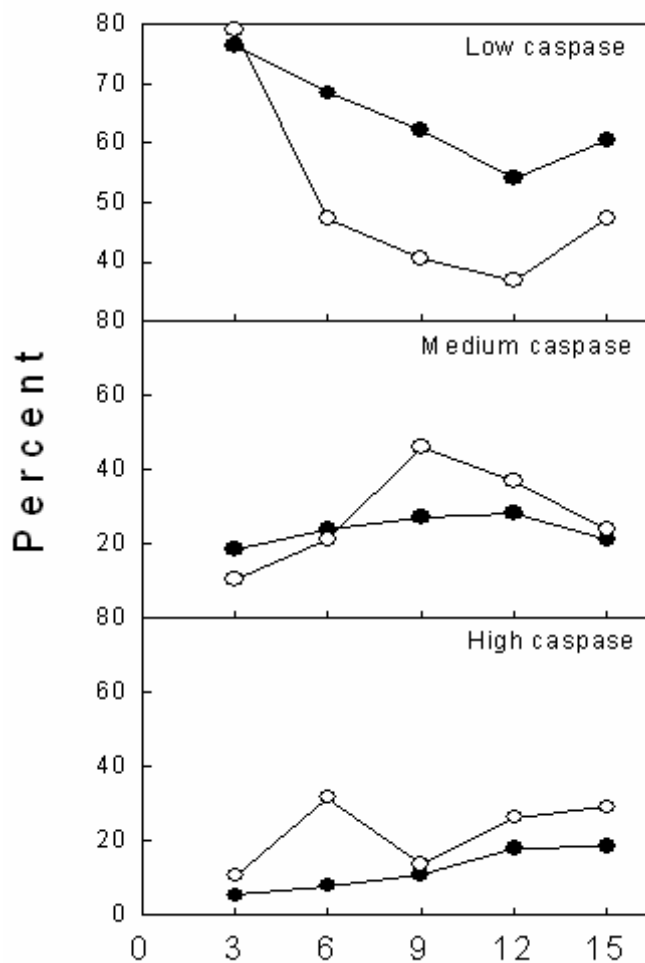


Fig. 7. Time course for activation of caspase-9 in embryos at Day 6 after insemination in response to tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Embryos were cultured with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (open circles) or vehicle (closed circles) for various times. Caspase-9 activity was then determined using the fluorogenic substrate CaspaLux 9-M<sub>1</sub>D<sub>2</sub>. Data represent the proportion of embryos classified as having low, medium, or high caspase activity. The experiment was replicated 9 times using 37-39 embryos per group. The distribution of embryos into caspase activity classes was affected by treatment ( $P < 0.05$ ) and time ( $P < 0.01$ ).

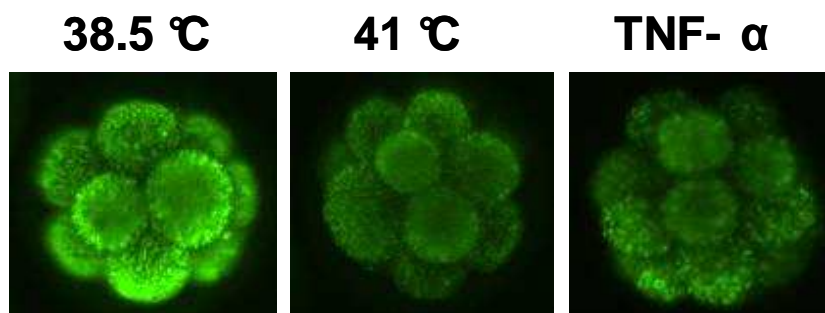


Fig. 8. Representative photomicrographs illustrating effects of heat shock and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on mitochondria membrane integrity using the fluorescent probe DiOC<sub>6</sub> (3). Intensity of fluorescence is related to mitochondrial membrane potential.

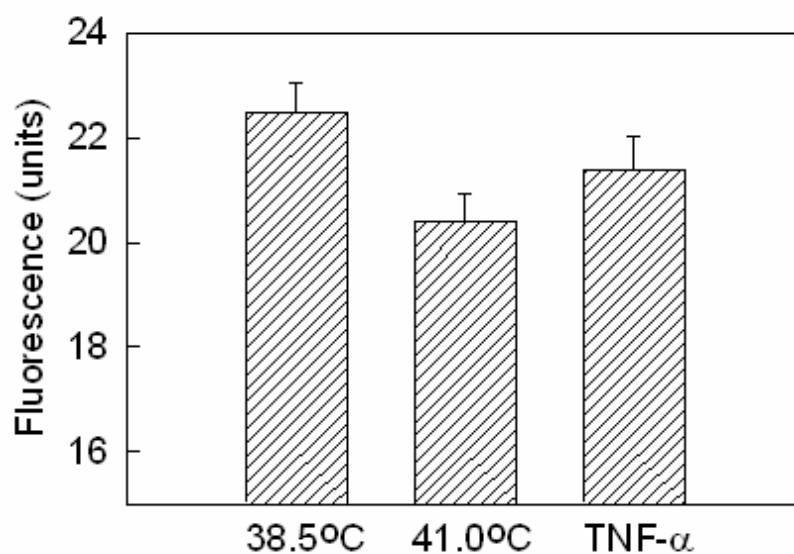


Fig.9 Effects of heat shock and TNF- $\alpha$  on mitochondrial membrane integrity on embryos at day 3 ½ after insemination. Data show that heat shock caused a significant loss in mitochondria membrane potential ( $P < 0.01$ ). However, TNF- $\alpha$  did not have a significant effect on mitochondria depolarization.

## **EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS**

### **EFFECTS OF HEAT STRESS IN BOVINE REPRODUCTION**

B. Loureiro<sup>1,2\*</sup>; M. A.L. Oliveira<sup>2</sup>, Paulo Fernandes de Lima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária/ Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171 900 Recife-PE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária/, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171 900 Recife-Pe, Brasil

\*(loureiro@animal.ufl.edu)

#### **Resumo**

O estresse térmico representa um problema na reprodução da maioria dos animais, em especial nas vacas em lactação. No Brasil, onde as temperaturas médias permanecem altas durante todo o ano na maioria do território, esse é um problema que afeta massivamente os animais. Praticamente todos os sistemas do animal sob estresse térmico são afetados, porém, este estresse está intimamente ligado a produção de leite, podendo-se observar um aumento na frequência respiratória, diminuição na ingestão de matéria seca, diminuição na eficiência reprodutiva por consequência de alteração na foliculogênese, comprometimento da função do oócito e interrupção no desenvolvimento embrionário. Tendo ainda como consequência diminuição na detecção do estro, redução na taxa de concepção e aumento da perda embrionária, mesmo em locais onde a temperatura se mantém uniforme.

**Palavras-chave:** Estresse térmico, reprodução, bovino

## **Abstract**

Heat stress is a major problem for reproduction in most of the animals, specially in lactating dairy cows. Brazil, a country where the average temperatures are high during the whole year and in most of the territory, heat stress is a problem that affects the entire the herd. Almost all the systems in the heat stressed animal are damaged; however, this stress is closely related to a high milk production. Frequently we can observe increase in respiratory frequency, decrease in dry matter ingestion, and decrease in reproductive functions as a consequence of folliculogenesis alterations, oocyte disfunction, and early embryo losses. Furthermore, decrease in heat detection, and reduction in conception rates can be notice.

**Key-words:** Heat stress, reproduction, bovino.

## **Introdução**

O crescimento da população em países em desenvolvimento têm como consequência o aumento pela demanda de produtos alimentícios. Com a intenção de aumentar a produção leiteira, governo e produtores passaram a utilizar melhores programas genéticos. Por essa razão, vacas de alto valor genético são transportadas de diferentes condições climáticas e introduzidas em um ambiente adverso, como as regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde em alguns estados as temperaturas ultrapassaram 40 °C durante o mês de fevereiro de 2006 (INMET, 2006)

Os processos de maturação do oócito, fertilização e desenvolvimento do embrião podem ser interrompidos por alterações no microambiente do trato reprodutivo. Este fenômeno vem sendo caracterizado especialmente durante o estresse térmico. Devido ao

intenso metabolismo associado com a lactação e dietas ricas em calorias as vacas leiteiras são particularmente sensíveis a temperaturas elevadas que podem (BERMAN *et al.*, 1985) alterar a foliculogênese (WOLFENSON *et al.*, 2000), comprometer a função do oócito (ZERON *et al.*, 2001; AL-KATANANI *et al.*, 2002) e interromper o desenvolvimento embrionário (PUTNEY *et al.*, 1988; EALY *et al.*, 2000). Tendo ainda como consequência diminuição na detecção do estro, redução na taxa de concepção e aumento da perda embrionária, mesmo em locais onde a temperatura se mantém uniforme.

O Brasil é um país predominantemente de clima tropical, com altas temperaturas médias durante todo o ano, na maior parte do território, fazendo com que os animais sofram com o estresse térmico. Apesar de ser um problema generalizado e bastante conhecido na criação do gado leiteiro o interesse por este assunto só se deu a partir da última década.

### **Influências do estresse térmico na reprodução**

A redução da fertilidade tem sido documentada em um grande número de espécies de mamíferos, dos quais as fêmeas são expostas seguidamente a elevadas temperaturas ambientais e umidade. Em vacas leiteiras, as taxas de concepção na inseminação artificial podem variar de 55% durante os meses de baixa temperatura e umidade para menor que 10% durante os meses de alta temperatura e umidade. Tem sido sugerido que altas temperaturas podem exercer efeitos depressivos na fertilidade por ação no ambiente uterino, no sistema endócrino ou no embrião. É sabido que altas temperaturas causam redução na duração e intensidade do estro, além de ampliar a incidência de anestro e ovulação silenciosa. (BADINGA *et al.*, 1993).

BALAZS (2004) em um estudo realizado em Petrolina, região semiárida do estado de Pernambuco demonstrou que vacas da raça Holandesa-Friesian após o parto apresentaram problemas reprodutivos após o parto, tais como disordem no ciclo estral, infertilidade e baixos resultados na produção de embriões. No ano seguinte do mesmo estudo, o autor observou que os mesmos animais quando superovulados não demonstraram nenhuma diferença em relação ao grupo controle quando analisados em termos de número de embriões e qualidade dos embriões produzidos. Entretanto, durante um atípico período, em que as temperaturas alcançaram 6 °C a mais do que a média observada no verão dos prévios 30 anos, a sobrevivência embrionária apresentou um decréscimo de  $59.2 \pm 37.4\%$  versus  $38.2 \pm 38.5\%$ , demonstrando que elevadas temperaturas diminuem a sobrevivência embrionária. A partir deste estudo pode-se concluir que vacas doadoras apresentam uma mudança na produção de embrião durante o período de aclimatização à região semi-árida e que os animais necessitam de aproximadamente 1.5 ano para uma completa adaptação.

### **Efeitos do estresse térmico no eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal**

Visto que a atividade do ovário é regulada pelo hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), liberado pelo hipotálamo, e pelas gonadotropinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), liberadas pela glândula pituitária anterior, muitos autores têm estudado os efeitos do estresse térmico na secreção destes hormônios.

Altas temperaturas ambientais podem diminuir a concentração de LH no plasma, que é necessário para o completo desenvolvimento do folículo dominante. Os folículos dominantes desenvolvidos em um ambiente com baixo nível de LH possivelmente terão seu



desenvolvimento final e sua diferenciação afetados negativamente (GUZELOGLU *et al.* (2001). Existem discrepâncias na literatura a respeito da secreção hormonal durante um estresse térmico agudo. Concentrações de estradiol no plasma podem ser diminuídas, aumentadas ou não serem afetadas pelo estresse térmico. Paradoxos similares ocorrem para a concentração de progesterona e do hormônio luteinizante (LH). O crescimento e o desenvolvimento dos folículos ovarianos, que podem ser precisamente monitorados pela ultrassonografia, podem ser ou não ser afetados pelo calor (BADINGA *et al.*, 1993).

Realmente, o estresse térmico parece ter um efeito de retardar as funções ovarianas, caracterizado por alterações na genesi e na dinâmica folicular, alterando as concentrações de FSH (BADINGA *et al.*, 1993). Havendo um efeito aditivo do estresse térmico e da maior produção de leite na diminuição das taxas de concepção.

GUZELOGLU *et al.* (2001) demonstraram que os folículos ovarianos são suscetíveis ao estresse térmico. O folículo pré-ovulatório é um importante componente do sistema reprodutivo e a deterioração desta função durante o estresse térmico pode afetar outros eventos reprodutivos, tal como a secreção de gonadotropina e subsequente desenvolvimento do corpo lúteo e do embrião.

O folículo dominante da primeira onda folicular é menor em diâmetro em vacas lactantes sob estresse térmico e costuma ter menos líquido folicular que os de vacas que não sofreram estresse térmico no dia 8 do ciclo estral (BADINGA *et al.*, 1993). O estresse térmico também diminui o número de células viáveis na granulosa (GUZELOGLU *et al.*, 2001).

O estresse térmico inibe o desenvolvimento folicular através da diminuição no número de receptores para o FSH nas células da granulosa, resultando na diminuição da atividade do estrogênio nos folículos (SHIMIZU *et al.*, 2005). O estresse térmico é responsável ainda pela supressão na atividade da aromatase nestas células, resultando em uma baixa capacidade de produção de estradiol pelos folículos (WOLFESON *et al.*, 1997; SHIMIZU *et al.*, 2005).

Essa redução na aromatase tem como consequências um aumento nos níveis de prolactina e glucocorticóides (BADINGA *et al.*, 1993; SHIMIZU *et al.*, 2005). Através deste estudo o autor sugere como potencial terapia para suprimir os efeitos do estresse térmico intervenções na expressão dos receptores para o FSH, como um substituto às terapias que utilizam estrogênio (SHIMIZU *et al.*, 2005).

Os folículos que estão se desenvolvendo nos ovários das vacas com estresse térmico mesmo quando danificados continuam crescendo. Aparentemente, esses folículos danificados ovulam oócitos subférteis durante vários meses após a diminuição do estresse térmico (ROTH *et al.*, 2001). Folículos subordinados apresentaram uma diminuição de tamanho em vacas submetidas ao estresse térmico durante a primeira onda folicular (BADINGA *et al.*, 1993; WILSON *et al.*, 1998; ROTH *et al.*, 2000).

Além de afetar os folículos ovarianos, o estresse térmico também é capaz de afetar o corpo lúteo. Observou-se que vacas submetidas a estresse térmico apresentaram fases luteínicas mais longas. O estradiol do folículo dá início à luteólise em bovinos, e a redução deste causada pelo estresse térmico influencia este processo. Após a interrupção do estresse térmico as vacas apresentam luteólise e os folículos reiniciam seu desenvolvimento

normalmente (VASCONCELOS, 2003), porém a recuperação dos oócitos se dá bem mais tarde (ROTH *et al.*, 2002).

A influência ou não do estresse térmico no corpo lúteo durante a fase luteínica intermediária é menos clara. Foi demonstrado que o estresse térmico aumenta, diminui ou não afeta as concentrações de progesterona no sangue. As células do corpo lúteo são diferentes daquelas do folículo. Por conseguinte, se o estresse térmico diminui os níveis de progesterona no sangue, então essa redução seria causada pelos efeitos do estresse térmico no folículo, que por fim afeta o corpo lúteo. De outro modo, alterações na taxa do metabolismo associadas ao estresse térmico podem afetar o metabolismo da progesterona (VASCONCELOS, 2003).

BALAZS (2004) não observou mudanças significativas nos níveis de progesterona P4 em vacas superovuladas da raça Holandesas-Friesian criadas na região semi-árida de Pernambuco, comparando-se o momento em que o embrião era recuperado, o primeiro e segundo ciclos.

### **Efeitos do estresse térmico na manifestação do estro**

TROUT *et al.* (1998) em um estudo realizado na Flórida, quando os animais apresentaram temperaturas retais entre 40 a 40.9 °C, não observaram diferenças na duração do ciclo estral ou intervalo entre estros nos grupos controle ou sob estresse térmico. Um aumento nos níveis de progesterona foi observado entre os dias 11 a 14 e 16 a 17 nas vacas sob estresse térmico. Contudo, uma diminuição nestes valores foi observada entre os dias 19 a 21.

Corpos lúteos de vacas sob estresse térmico foram analisados por ultrassonografia e comparados com os das vacas do grupo controle por WILSON *et al.* (1998). O tamanho das estruturas foram similares até o dia 16, quando observou-se luteólise nos animais do grupo controle, mas não nos animais sob estresse térmico. A quantidade de progesterona também foi semelhante para os dois grupos até o dia 16, quando as vacas do grupo controle apresentaram uma significativa redução, coincidindo com o dia da luteólise.

### **Estresse térmico e sobrevivência embrionária**

A mortalidade embrionária nas espécies aumenta quando ocorre exposição da mãe a elevadas temperaturas ambiente, especialmente em áreas tropicais (JAINUDEEN E HAFEZ, 2000). Vacas submetidas ao estresse térmico após a inseminação apresentam uma menor taxa de prenhez (PUTNEY *et al.*, 1988; EALY *et al.*, 2000). Os efeitos do estresse térmico sobre os embriões não são aparentes até os estágios tardios de desenvolvimento. Oócitos fertilizados de ovelhas e vacas, quando colocados em altas temperaturas, tanto *in vitro* como *in vivo* são prejudicados porém, continuam a se desenvolver, somente morrendo durante os estágios críticos da implantação (JAINUDEEN E HAFEZ, 2000). O estresse térmico é mais prejudicial à sobrevivência embrionária quando ocorre logo após o estro. Em particular, o estresse térmico reduz a viabilidade do embrião no dia 8 após o estro se vacas superovuladas são expostas a ao estresse térmico no dia 1, porém não no dia 3, 5 e 7 (EALY *et al.*, 1993) . Uma das razões para esse fenômeno é que os embriões se tornam mais resistentes a aumentos de temperatura ao passo que se desenvolvem. Temperaturas que bloqueiam o desenvolvimento dos embriões bovinos no estágio de 2 células têm efeito intermediário em embriões com 4-8 células e pouco ou nenhum efeito no desenvolvimento

de mórulas (ROMAN-PONCE *et al.*, 1978; ROSENBERG *et al.*, 1982; EALY *et al.*, 1995; EDWARDS e HANSEN, 1997).

O estresse térmico entre oito e dezessete dias de gestação pode alterar o meio uterino assim como o crescimento e a atividade secretória do embrião. Aparentemente o estresse térmico antagoniza os efeitos inibitórios do embrião sobre a secreção uterina de PGF<sub>2α</sub> (JAINUDEEN E HAFEZ, 2000).

Comparados à maioria das células, os embriões são particularmente sensíveis a mudanças de temperatura e um leve estresse térmico de 41° C por 4.5 h é suficiente para reduzir a proporção de embriões que se desenvolvem em meio de cultura (KRININGER *et al.*, 2002; HERNÁNDEZ-CERÓN, 2004). Existem muitos outros efeitos do estresse térmico que não afetam diretamente o embrião, entretanto comprometem sua sobrevivência. Por exemplo, o estresse térmico reduz o fluxo sanguíneo no útero (ROMAN-PONCE, 1978) e, como resultado, o envio de nutrientes e hormônios a este órgão também é comprometido (ROSENBERG *et al.*, 1982; HOWELL *et al.*, 1994).

As consequências celulares do estresse térmico têm sido descritas para embriões bovinos no estágio de 2 células. Neste estágio, exposições a 41° C causam rompimento dos microfilamentos e microtubulos, resultando em redistribuição das organelas para o interior da célula (RIVERA *et al.*, 2003; RIVERA *et al.*, 2004-a). Além disso, ocorre ainda um aumento na proporção de mitocôndrias, as quais possuem a característica de aumentar seu volume, indicando despolarização (RIVERA *et al.*, 2003; RIVERA *et al.*, 2004-a) e, consistente com a idéia de fosfoliração oxidativa, há ainda uma redução no consumo de oxigênio (RIVERA *et al.*, 2004-b). Enquanto radicais livres têm sido responsabilizados

pelos efeitos do estresse térmico em embriões de ratos (ARECHIGA *et al.*, 1995; OZAWA *et al.*, 2004), o mesmo parece não ocorrer em embriões bovinos porque, nestes, o estresse térmico não causa redução no antioxidante glutatona cistólica (RIVERA *et al.*, 2004-b) e seus efeitos não podem ser minimizados através da adição de antioxidantes ao meio de cultura (EALY *et al.*, 1995) ou ainda reduzindo a quantidade de oxigênio contida na incubadora ((RIVERA *et al.*, 2004-b).

Os efeitos do estresse térmico podem também afetar a qualidade dos oócitos levando a variações sazonais no sucesso dos sistemas de produção de embriões *in vitro*. Um queda nas taxas de desenvolvimento embrionário durante o verão foram reportadas em Louisiana (ROCHA *et al.*, 1998) e Wisconsin (RUTLEDGE *et al.*, 1999). RON *et al.* (1984) e ROTH *et al.* (2002) demonstraram que as taxas de concepção em vacas leiteiras permaneciam baixas, mesmo quando os animais não estavam mais sendo expostos ao estresse térmico.

### **Interação entre estresse térmico e lactação**

Os efeitos deletérios do estresse térmico no oócito e embrião estão relacionados também a uma inabilidade do animal em manter uma temperatura corporal normal, possivelmente devido a demandas metabólicas associadas a lactação (WILSON *et al.*, 1998; BALAZS, 2004). Durante o período de estresse térmico a ingestão de matéria seca e a atividade termoregulatória do animal estão diminuídos. Segundo BALAZS (2004) que avaliou o efeito do estresse térmico na superovulação de vacas secas, em primeira, segunda e terceira lactação, uma melhor resposta foi obtida em vacas que se encontravam no

período seco. Sugerindo que a lactação afeta a resposta superovulatória em vacas submetidas ao estresse térmico.

Comparando-se novilhas da raça Holandesa-Friesian com vacas em lactação da mesma raça não observou-se diferença no número de animais que apresentaram uma ou mais de uma ovulação. Entretanto, a porcentagem de embriões produzidos foi maior nas novilhas do que nas vacas. Baseando-se em número de corpos lúteos, a eficiência na coleta de oócito/embrião foi de 66% nas novilhas contra 89% nas vacas. Não houve diferença significativa em relação ao número de ovulações detectadas por palpação ou número de embriões recuperados. Muito embora, observou-se uma diferença bastante significativa em relação a quantidade de oócitos não fertilizados e embriões degenerados nas vacas lactantes quando comparadas as novilhas, tendo estas apresentado uma maior porcentagem de embriões congeláveis (BALAZS, 2004).

### **Estratégias utilizadas para amenizar os efeitos do estresse térmico**

Muitas estratégias para diminuir o calor nos sistemas de criação de vacas leiteiras têm sido utilizadas. Produtores investem em sistemas de resfriamento como ventiladores, nebulizadores e telas de sombreamento, mas sem muito sucesso no que concerne à uma melhora na reprodução.

Tratamentos hormonais também estão sendo implementados como tentativa de amenizar os efeitos do estresse térmico em vacas em lactação. Aplicações de bST e FSH apresentam-se como potenciais alternativas para a melhoria da fertilidade. Uma simples injeção de bST em um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo aumenta as taxas de prenhez em vacas que foram submetidas ao estresse térmico (THATCHER *et al.*, 2001).

Uma melhoria na qualidade dos oócitos foi reportada por KUEHNER *et al.* (1993) e GONG *et al.* (1996) em vacas tratadas com bST. Semelhantes resultados foram obtidos quando FSH era aplicado a vacas submetidas a protocolos de punção folicular, apresentando ainda uma melhora na qualidade dos embriões transferíveis (GOODHAND *et al.*, 2000).

É possível que o FSH e o bST estejam melhorando a qualidade dos oócitos por influenciarem, direta ou indiretamente, o ambiente folicular através do sistema envolvido na síntese e liberação de IGF-I (GONG *et al.*, 1997; LUCY, 2000). Aspirações foliculares, as quais induzem um crescimento de mais ondas foliculares e de mais folículos por ciclo, também mostrou uma melhora na qualidade do oócito e dos embriões produzidos (ROTH *et al.*, 2001)

ROTH *et al.* (2002) em um experimento conduzido durante o outono (outubro e novembro) na região de Israel, utilizando vacas da raça Holandesa em lactação, que foram submetidas a estresse térmico durante o verão (junho a outubro), com temperaturas variando entre 22 a 32 °C concluiu que a aplicação de duas doses de bST aumenta o número de folículos de menor tamanho e, este aumento pode estar associado à melhora observada na morfologia do oócito no ciclo subsequente. Entretanto, duas doses de FSH não induzem um aumento no número de folículos, havendo, pelo contrário, um aumento nas taxas de clivagem partenogênicas.

Transferência de embrião e produção de embrião *in vitro* também são técnicas que podem ser utilizadas para eliminar os efeitos deletérios do estresse térmico no oócito. Visto que estresse térmico reduz a viabilidade do embrião quando este é exposto no dia 1, porém



não no dia 3, 5 e 7 (EALY *et al.*, 1993). Embriões de melhor qualidade podem estar sendo transferidos para receptoras adaptadas as condições climáticas da região.

### **Considerações Finais**

Não há dúvidas de que estresse demais compromete o desempenho sexual e as funções reprodutivas, caracterizando um quadro de redução da libido, alterações hormonais e dificuldade de ovular.

A maioria dos componentes do sistema reprodutivo são susceptíveis ao estresse térmico. Entre os quais incluem-se oócitos, células da teca e da granulosa, embrião durante o período de préimplantação, corpo lúteo, endométrio uterino e pituitária anterior. Estudos nos efeitos do estresse térmico têm mostrados que as vacas necessitam ser resfriadas durante todo o verão, da forma mais eficiente possível, na esperança de se alcançarem melhores taxas de fertilidade. Atualmente, essas taxas se mantêm baixas durante o verão e os tratamentos hormonais são limitados. O uso da técnica de inseminação artificial, que já é bem praticada no país, pode ajudar a melhorar as taxas de concepção através do uso de sêmen de animais mais adaptados as condições climáticas. A transferência, congelamento e a produção *in vitro* de embriões também têm sido consideradas melhores alternativas para um aumento das taxas de prenhez durante os períodos de estresse térmico. Entretanto, no Brasil esta realidade não se aplica a todos os produtores, estando disponível apenas nas grandes fazendas comerciais, ficando restrita aos médios e pequenos produtores.

## Referências

AL-KATANANI, Y.M. *et al.* Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 85, p. 390-396, 2002.

ARÉCHIGA, C.F. *et al.* Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation mouse embryos. **Biol Reprod**, v. 52, p. 1296-1301, 1995.

BADINGA, L. *et al.* Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**. v. 39, p.797-810, 1993.

BALAZS, B. **Acclimatization to heat stressed environment and embryo production of donor cows transported from Hungary to semiarid region of Brazil**. 2004. 32 f. Dissertation/Thesis (PhD Program in Veterinary Science). Course of Veterinary Medicine, Szent István University.

BERMAN, A. *ET AL.* Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in subtropical climate. **J Dairy Sci**, V. 68, P. 1488-1495, 1985.

EALY, A.D. *et al.* Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. **J Anim Sci**, v. 73, p. 1401-1407, 1995.

EALY, A.D. *et al.* Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **J Dairy Sci**, v. 76, p.2899-2905, 1993. **Anim Reprod Sci**. v. 60-61, p.535-47, 2000.

EDWARDS, J.L. e HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol Reprod Dev**, V.46, P.138-145, 1997.

GONG, J.G. *et al.* Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v. 45, p. 611–622, 1996.

GONG, G.J. *et al.* Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotropin: A dose response study. **J. Reprod.Fertil.** v. 110, p.91–97, 1997.

GOODHAND, K.L. *et al.* In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine treated with progesterone, oestradiol and FSH. **Anim.Reprod. Sci.** v. 63, p. 145–158, 2000.

GUZELOGLU, A. *et al.* Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Animal Reproduction Science.** v. 66, p. 15–34, 2001.

HERNÁNDEZ-CERÓN, J. *et al.* Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. **J Dairy Sci**, v.87, p. 53-58, 2004.

HOWELL, J.L. *et al.* Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. **J Dairy Sci**, v. 77, p.735-739, 1994.

INMET Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em:< [www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br) > Acesso em: 16 março 2006.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Reproductive failure in females. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap. 17. p. 261-278.

KRINIGER, C.E. III *et al.* Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of preimplantation bovine embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 63, p. 335-340, 2002.

KUEHNER, L.F. *et al.* The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 1003–1013, 1993.

LUCY, M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **J. Dairy Sci.** v. 83, p.1635–1647, 2000.

OZAWA, M. *et al.* Redox status of the oviduct and CDC2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. **Biol Reprod**, v. 71, p. 291-296, 2004.

PUTNEY, D.J. *et al.* Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. **Theriogenology**, v. 30, p. 195-209, 1988.

RIVERA, R.M. *et al.* Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically-relevant heat shock. **Biol Reprod**, v. 69, p. 2068-2077, 2003.

RIVERA, R.M. *et al.* Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development. **Reproduction**, v. 128, p. 33-42, 2004 (a).

RIVERA *et al.* Reorganization of microtubules and microfilaments by thermal stress in two-cell bovine embryos. **Biol Reprod**, v. 70, p.1852-1862, 2004 (b).

ROCHA, A. *et al.* High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 657–665, 1998.

ROMAN-PONCE, H. *et al.* Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **J Anim Sci**, v. 46, p.175-180, 1978.

RON, M. *et al.* Factors affecting conception rate of Israeli Holstein cows. **J. Dairy Sci.** v. 67, p. 854–860, 1984.

ROSENBERG, M. *et al.* Effect of climatic conditions on peripheral concentrations of LH, progesterone and oestradiol-17 $\beta$  in high milk-yielding cows. **J Reprod Fertil**, v. 66, p.139-146, 1982.

ROTH, Z. *et al.* Delayed effects of HS on steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. **Reproduction**, v. 121, p.745–751, 2001.

ROTH, Z. *et al.* Effect of Treatment with Follicle-Stimulating Hormone or Bovine Somatotropin on the Quality of Oocytes Aspirated in the Autumn from Previously Heat-Stressed Cows. **J. Dairy Sci.** v. 85, p.1398–1405, 2002.

RUTLEDGE, J. J. *et al.* Seasonality of cattle embryo production in a temperate region.

**Theriogenology** v. 51, p. 330, 1999.

SHIMIZU, T, *et al.* Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells.

**Reproduction**, v. 129(4), p. 463-72, 2005.

THATCHER, W.W. *et al.* Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v. 55, p.75–89, 2001.

TROUT, J.P. *et al.* Characteristics of the Estrous Cycle and Antioxidant Status of Lactating Holstein Cows Exposed to Heat Stress. **J Dairy Sci.**, v. 81(5), p.1244-1250, 1998.

VASCONCELOS, J.L.M. Manejo de vacas leiteiras para melhoria do desempenho reprodutivo durante períodos de estresse calórico. Disponível em: <[www.milkpoint.com.br](http://www.milkpoint.com.br)> Acesso em: 22 maio 2004.

WILSON, S.J. *et al.* Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle: 1. Lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 2124–2131, 1988.

WOLFESON, D. *et al.* Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 47, p. 9–19, 1997.

WOLFESON, D. *et al.* Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p.535-547, 2000.

ZERONS, Y. *et al.* Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, p.447-54, 2001.