

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

**EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE
OÓCITOS CAPRINOS E OVINOS EM PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE
EMBRIÕES**

EDIVALDO ROSAS DOS SANTOS JUNIOR

**TESE DE DOUTORADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**Recife-PE
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

EDIVALDO ROSAS DOS SANTOS JUNIOR

**EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE
OÓCITOS CAPRINOS E OVINOS EM PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE
EMBRIÕES**

TESE DE DOUTORADO

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

**UFRPE
Recife-PE, Brasil
2010**

Ficha catalográfica

S237e Santos Júnior, Edivaldo Rosas dos
Efeito do estresse térmico na maturação in vitro de oócitos
caprinos e ovinos em protocolos de produção de embriões /
Edivaldo Rosas dos Santos Júnior. – 2010.
114 f. : il.

Orientador: Marcos Antônio Lemos de Oliveira
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2010.

Referências.

1. Folículo 2. Complexos *cumulus oophorus* 3. Apoptose
Teste de TUNEL I. Oliveira, Marcos Antônio Lemos de,
Orientador II. Título

CDD 636.08926

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

**EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS
CAPRINOS E OVINOS EM PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE EMBRIÕES**

Tese de Doutorado elaborada por

EDIVALDO ROSAS DOS SANTOS JUNIOR

Aprovada pela

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marcos Antonio Lemos de Oliveira
Prof. Dr. UFRPE - Orientador

Paulo Fernandes de Lima
Prof. Dr. UFRPE - Examinador

Adauto Chiamenti
Prof. Dr. - Examinador -

Marcelo Cavalcanti Rabelo
- Examinador -

Elielete Maria Pires de Azevedo
- Examinadora -

UFRPE
Recife, fevereiro de 2010

“Eu não posso mudar a direção do vento, mas eu posso ajustar as minhas velas para sempre alcançar o meu destino”

Jimmy Dean

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e coragem para seguir em frente e superar os obstáculos da vida.

À minha mãe, Leonair do Nascimento, por ser um exemplo de força e lisura, além de ser a mola propulsora da minha vida, ao meu pai, Edivaldo Rosas, pelo exemplo profissional e apoio dedicado ao meu futuro.

Aos meus irmãos Brenda Rosas, Eduardo Rosas e Fabrícia Rosas, minha avó materna, Olindina Maria, e demais membros da família pelo amor, amizade, apoio nos momentos difíceis e celebrações nas conquistas.

À minha filha Letícia Rosas que mesmo sem ter noção, fez toda a diferença na minha vida e é uma das grandes responsáveis por todo o meu esforço profissional.

À Renata da Cruz Primo pelo amor, carinho, dedicação, paciência e companheirismo tão importantes na execução da etapa final deste doutorado, sempre motivando e apoiando cada decisão.

Ao Prof. Marcos Antonio Lemos de Oliveira pela confiança, amizade, ensinamentos e paciência, elementos tão fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Paulo Fernandes Lima, pela amizade e apoio fundamentais para minha vida profissional.

À Maria Leni de Oliveira e sua irmã Dielú pelo apoio e amizade sempre imprescindíveis nas várias etapas da minha vida acadêmica e pessoal.

Aos grandes amigos, Arthur Nascimento, Cristiano Rocha, Filipe Gondim, Ricardo Chaves, Maico Henrique, Joubert Pimentel, Saulo Azevedo, Josenito e Felipe Medeiros, que fazem parte da minha vida pessoal e acadêmica, sempre compartilhando horas de alegria e de tristezas, tão importantes para a consolidação do caráter e perfil profissional adquirido.

Ao pessoal do laboratório de reprodução: Leopoldo Mayer, José Monteiro e Marcelo Rabelo pelos conhecimentos científicos trocados e pela amizade. Ao corpo técnico da reprodução: Joana, Alcir e Dona Sônia.

À UFRPE por proporcionar as condições necessárias à conclusão da graduação, mestrado e doutorado.

À FACEPE pela bolsa concedida e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTAS DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Foliculogênese e gametogênese.....	4
2.2. Maturação <i>in vitro</i> de oócitos.....	6
2.3. Fertilização <i>in vitro</i>	12
2.4. Cultivo embrionário <i>in vitro</i>	17
2.5. Estresse térmico.....	18
2.6. Apoptose celular.....	29
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
4. CAPÍTULO I.....	67
5. CAPÍTULO II.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

6-DMAP – 6-dimetilaminopurina

A I – Anafase I

AMP – Monofosfato de adenosina

AMPC – Monofosfato de adenosina cíclico

ATP – Trifosfato de adenosina

BCL-2 – *B cell leukemia/lymphoma 2*

bMM – Meio básico de maturação

BSA – Albumina sérica bovina

CAD – *caspase-activated DNase*

CC – Célula do *cumulus*

CCOs – Complexo de *cumulus oophorus*

CGP – Células germinativas primordiais

CG – Células granulosas

CIV – Cultivo de embriões *in vitro*

CL – Corpo lúteo

CR1 – Meio de cultivo suplementado com BSA

CT – Células da teca

cm – centímetro

DEPC – Dietil pirocarbonato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

E₂ – Estradiol

ETC – Estresse térmico calórico

FAS – Fator de necrose tumoral receptor

FD – Folículo dominante

FIV – Fecundação *in vitro*

FPM – Fator promotor de crescimento

FNT – Fator de necrose tumoral

FSH – Hormônio folículo estimulante

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GCs – Grânulos corticais

g - grama

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG – gonadotrofina coriônica humana

HECM – Meio de cultura de embriões de hamsters

HEPES – *N-2-Hydroxythypiperazine-N'-2-ethanesulfonic acide*

HPS – proteína do choque térmico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICAD – *Inhibitor of caspasis – activated DNase*

ICE – *Interleukin Ib-converting enzyme*

IGF-I - Fator de crescimento semelhante à insulina I

IL - Interleucina

JG – Junções comunicantes do tipo *Gap*

kg - quilograma

KSOM – Meio de cultivo simples otimizado com potássio

LH - Hormônio luteinizante

MBM – Meio básico modificado

MCI – Massa celular interna

MCO – Monocamadas de células do oviduto

MCP – Morte celular programada

mDM – Meio definido modificado

MEM – Meio mínimo essencial

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

MIV – Maturação *in vitro*

MPF – Fator intercelular promotor da fase-M

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

MPF – Fator promotor da maturação

ng – Nanograma

nM – Nanomolar

OR – Oxigênio reativo

OMI – Substância inibidora da maturação do oócito

P₄ – Progesterona

pc – Picograma

PBS – *Phosphate-Buffered Saline*

PIV – Produção *in vitro*

PV – Peso vivo

PVA – Álcool polivinílico

PVP – Polivinilpirrolidona

RNA – Ácido ribonucléico

RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro

rpm – Rotações por minuto

RVG – Rompimento da vesícula germinativa

SFB – Soro fetal bovino

SRD - Sem raça definida

SOF – Fluido sintético de oviduto

TALP – *Pyruvate lactate albumin tyrodes*

TCM – Meio para cultura de tecido

T I – Telófase I

T3 – Triiodotironina

T4 – Tiroxina

TUNEL – *Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End labeling*

UI – Unidade Internacional

µg – Micrograma

µm – Micromolar

µL – Microlitro

VG – Vesícula germinativa

LISTA DE TABELAS

		Página
Capítulo 1		67
Tabela 1	Média e desvio padrão de oócitos recuperados, maturados <i>in vitro</i> (MIV) e fecundados <i>in vitro</i> (FIV) da espécie caprina submetidos a diferentes tempos de estresse térmico na maturação.....	73
Tabela 2	Média e desvio padrão de embriões clivados (D-3), embriões (D-4) e mórulas (D-5) da espécie caprina submetidos a diferentes tempos de estresse térmico na maturação.....	74
Capítulo 2		84
Tabela 1	Média e desvio padrão de oócitos recuperados, maturados <i>in vitro</i> (MIV) e fecundados <i>in vitro</i> (FIV) da espécie ovina submetidos a diferentes tempos de estresse térmico na maturação.....	90
Tabela 2	Média e desvio padrão de embriões clivados (D-3), embriões (D-4) e mórulas (D-5) da espécie ovina submetidos a diferentes tempos de estresse térmico na maturação.....	91

LISTA DE FIGURAS

		Página
	Capítulo 1.....	67
Figura 1	Porcentagem e desvio padrão de embriões caprinos PIV ($P < 0,05$) pelo <i>teste F</i> , no D-8 (blastocisto) em diferentes tempos de estresse térmico calórico a 41°C.....	74
Figura 2	Porcentagem e desvio padrão da apoptose diagnosticada pelo TUNEL em embriões caprinos PIV ($P < 0,05$) pelo <i>teste F</i> , no D-8 (blastocisto) em diferentes tempos de estresse térmico calórico a 41°C.....	75
	Capítulo 2.....	84
Figura 1	Porcentagem e desvio padrão de embriões ovinos PIV ($P < 0,05$) pelo <i>teste F</i> , no D-8 (blastocistos) em diferentes tempos de estresse térmico calórico.....	91
Figura 2	Porcentagem e desvio padrão de apoptose diagnosticada pelo TUNEL em embriões ovinos PIV ($P < 0,05$) pelo <i>teste F</i> , no D-8 em vários tempos de estresse térmico calórico.....	92

Título: Efeito do estresse térmico na maturação *in vitro* de oócitos caprinos e ovinos em protocolo de produção de embriões

Autor: Edivaldo Rosas dos Santos Junior

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Lemos de Oliveira

RESUMO

Esse estudo teve como objetivo determinar o efeito do estresse térmico durante a maturação de oócitos e seu reflexo na produção *in vitro* de embriões nas espécies caprina e ovina. Os ovários foram coletados em abatedouro e transportados ao Laboratório de Biotécnicas da Reprodução da UFRPE. Os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) foram coletados pela técnica de “slicing” dos folículos entre 2 a 6 mm de diâmetro, selecionados com base na morfologia e colocados em meio básico de maturação. Nas 10 repetições, os CCOs foram submetidos aos tratamentos de estresse térmico calórico a 41°C por 0 (termoneutralidade a 39°C), 3, 6, 12, 18 e 24 horas de maturação *in vitro*. Os dados foram avaliados na maturação, fecundação, clivagem (D-3), estágio de 8-16 células (D-4), mórula (D-5), blastocisto (D-8) após fecundação e blastocistos positivos para apoptose através do ensaio de TUNEL. Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) em todos os tempos estudados de estresse térmico na maturação em ambas espécies. Em caprinos, houve diferença significativa ($P < 0,05$) também na fecundação, D-3, D-4, D-5. No D-8 não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tempos de 3 vs 6 e 18 vs 24 h e nos blastocistos TUNEL positivos nos tempos de 0 vs 3, 3 vs 6, 12 vs 18 e 18 vs 24 h de estresse térmico. Em ovinos, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) na fecundação, D-3, D-4, D-5 e D-8 entre os tempos de 18 vs 24h e nos blastocistos TUNEL positivos nos tempos de 0 vs 3, 3 vs 6, 12 vs 18 e 18 vs 24h de estresse térmico. Nas condições observadas neste estudo, os resultados permitem concluir que o tempo em que o oócito é exposto ao estresse térmico durante a maturação *in vitro* é fundamental para definir o desenvolvimento embrionário e o nível apoptótico de suas células.

Palavras-chave: Folículos, complexos *cumulus oophorus*, apoptose, Teste de TUNEL.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
Tese de Doutorado em Ciência Veterinária
Recife, 24 de fevereiro de 2010.

Title: Effect of heat stress during maturation of oocytes and *in vitro* production of embryos in goats and sheep.

Author: Edivaldo Rosas dos Santos Junior

Advisor: Prof. Dr. Marcos Antonio Lemos de Oliveira

Abstract

This study aimed to determine the Effect of heat stress during maturation of oocytes and *in vitro* production of embryos in goats and sheep. Ovaries were collected in a slaughterhouse and transported to the Laboratory of Biotechnical Reproduction of UFRPE. The *cumulus oophorus* complexes (COCs) were collected by the technique of "slicing" of the follicles from 2 to 6 mm in diameter and selected based on morphological classification and placed on the basic stages. In 10 replicates the COCs were submitted to the caloric heat stress at 41 ° C for 0 (the thermoneutral 39 ° C), 3, 6, 12, 18 and 24 hours of maturation *in vitro*. The percentage of oocytes was determined in the maturation, fertilization, cleaved (D-3), stage of 8-16 cells (D-4), morale (D-5), blastocyst (D-8) after fertilization and blastocyst positive for apoptosis by TUNEL assay. Significant difference ($P < 0.05$) in all time periods of heat stress in ripening. In sheeps the fertilization, D-3, D-4, D-5 and D-8 was not significantly different ($P > 0.05$) between the times of 18 vs 24 hours in blastocyst TUNEL positive at 0 vs 3, 3 vs 6, 12 vs 18 and 18 vs 24 h of heat stress. The results in goats showed on maturation, fertilization, D-3, D-4, D-5. The D-8 was not significantly different ($P > 0.05$) between the periods of 3 vs 6 to 18 vs 24 h and the blastocyst TUNEL positive at 0 vs 3, 3 vs 6, 12 vs 18 and 18 vs 24 h of heat stress. Under the conditions observed in this study, the results indicate that the time in which the oocyte is exposed to heat stress during maturation *in vitro* is essential to define the embryonic development and their level of apoptotic cells.

Keywords: Follicles, *Cumulus oophorus* complexes, apoptosis, TUNEL Test.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
Doctor's Thesis Veterinary Science
Recife, February 24, 2010.

1. INTRODUÇÃO

2

3 A caprinovinocultura representa um grande potencial para o desenvolvimento
4 socioeconômico do país. A organização do setor produtivo e a adoção de tecnologias
5 que possam contribuir para a melhoria da produtividade dos rebanhos são fatores
6 importantes para acelerar o crescimento desta atividade.

7 O Brasil, especialmente a região Nordeste tem realizado importações de
8 significativo número de embriões congelados, não só de caprinos, como também de
9 ovinos, de raças especializadas para corte, provenientes da África do Sul (GUSMÃO et
10 al., 2003). A baixa produtividade dos rebanhos locais tem sido contornada através da
11 importação de raças exóticas para o semi-árido nordestino, porém é preciso cautela
12 devido à susceptibilidade destas raças as temperaturas elevadas encontrada nesta região.

13 Na Região Nordeste do Brasil, as condições ambientais adversas comprometem
14 a eficiência reprodutiva dos animais de interesse zootécnico, resultando em perdas
15 econômicas para região (HANSEN et al., 1992). Medidas que minimizem os efeitos
16 negativos das temperaturas elevadas irão incrementar a produtividade nos rebanhos de
17 pequenos ruminantes.

18 O oócito e o embrião são os alvos principais dos efeitos negativos induzidos
19 pelo estresse calórico, provocando danos celulares que resultam em apoptose. O
20 conhecimento destes mecanismos possibilitará o desenvolvimento de estratégias
21 aplicadas à sobrevivência celular frente aos vários tipos de estresses, minimizando
22 efeitos deletérios. Dessa forma, este estudo teve como objetivo determinar o efeito do
23 estresse térmico calórico na indução de apoptose durante a maturação *in vitro* de oócitos
24 em protocolo produção de embriões *in vitro* das espécies caprina e ovina.

25

1 2. REVISÃO DE LITERATURA

2

3 A exploração comercial de pequenos ruminantes domésticos pode contribuir
4 para o desenvolvimento socioeconômico do País, desde que realizada de forma racional.
5 A população brasileira caprina no ano de 2005 era de 10.306.722 cabeças, sendo que
6 9.542.910 deste efetivo está localizado na região Nordeste com 1.601.522 no Estado de
7 Pernambuco. O rebanho ovino no Brasil possuía 15.588.041 sendo 9.109.668 na região
8 Nordeste, dos quais 1.067.103 em Pernambuco (IBGE, 2006).

9 Apesar das limitações existentes, tem havido uma crescente demanda por parte
10 da iniciativa privada, por biotécnicas da reprodução que visem à produtividade e a
11 rentabilidade dos rebanhos e das unidades produtivas, agregando valor ao seu produto.
12 Ressalte-se que a organização e gestão da atividade, em consonância com os princípios
13 do agronegócio e o uso de tecnologias, em regiões subdesenvolvidas ou em
14 desenvolvimento, são muitas vezes penalizadas pela limitada capacidade de
15 investimento do produtor, pelo baixo nível de aceitação e de adoção de tecnologias, bem
16 como pelo pouco grau de instrução do cliente a ser beneficiado (SALLES et al., 2002).

17 Uma das primeiras biotécnicas desenvolvidas e disponíveis aos produtores foi a
18 inseminação artificial (IA) que se constitui, sem dúvida, na ferramenta mais expressiva
19 para a melhoria do potencial reprodutivo do rebanho. Além da IA, a transferência de
20 embriões (TE), veio contribuir para melhorias do potencial produtivo (GONZALES e
21 OLIVEIRA, 1991), permitindo a multiplicação rápida de indivíduos geneticamente
22 superiores dentro de uma raça, favorecendo também, a redução do intervalo entre
23 gerações por possibilitar a obtenção de embriões de fêmeas doadoras jovens, até mesmo
24 púberes, como descrito por Majumbar et al. (1990) e Salles et al. (1998, 2000).

1 Com o desenvolvimento da TE, técnicas de criopreservação foram desenvolvidas
2 para conservação por tempo indeterminado, mantendo-se a viabilidade do embrião pós-
3 descongelamento, o que favorece a importação e exportação de germoplasmas,
4 dispensando o transporte de animais e o período de quarentena, o que significa redução
5 nos custos e riscos na aquisição de reprodutores. Além disso, destacam-se: a
6 possibilidade da transferência de embriões para fêmeas em estro natural, sem a
7 necessidade de sincronização artificial do estro e da ovulação da receptora; a
8 preservação de embriões coletados excedentes ao número de receptoras sincrônicas; a
9 adequação da época de partos, independentemente da data da colheita de embriões; a
10 formação de banco de germoplasma, objetivando a preservação de espécie e/ou raça em
11 perigo de extinção e a comercialização, o transporte e disseminação de material
12 genético entre produtores, regiões e países, com o mínimo de risco de introdução e/ou
13 disseminação de doenças (SIMPLÍCIO et al., 2002). A fecundação *in vitro* (FIV) tem
14 ocupado lugar de destaque nestas biotecnologias em função do potencial que oferece
15 para acelerar a melhoria genética dos rebanhos (HASLER, 1992).

16 A produção *in vitro* de embriões (PIV) é um procedimento que consiste das etapas
17 de maturação e fecundação de oócitos e da cultura ou da co-cultura desde a fase de
18 zigoto até a de blastocisto. Em bovinos, a adição de gonadotropinas, estradiol, vitaminas
19 e fatores de crescimento aos meios de cultura celular têm determinado um aumento das
20 porcentagens de blastocisto (MONTAGNER, 1999; BORTOLOTTI, 2000; ALVES et
21 al., 2001; LIMA, 2004).

22 Alguns experimentos demonstraram que o embrião no início do desenvolvimento é
23 afetado pelo estresse calórico e que o mesmo adquire resistência à temperatura elevada
24 à medida que progride no desenvolvimento (EALY et al., 1993). Um número
25 considerável de evidências demonstra que o oócito também pode ser danificado pelo

1 estresse térmico calórico, causando uma redução na capacidade de desenvolvimento
2 oocitário (PUTNEY et al., 1989a; ROTH e HANSEN, 2004a), antes da maturação
3 (estádio de vesícula germinativa) (PAYTON et al., 2004), durante a maturação (ROTH
4 e HANSEN, 2004a) e após a maturação (JU e TSENG, 2004). A diminuição drástica
5 nas taxas de gestação (BADINGA et al., 1985; AL-KATANANI et al., 1999) e a grande
6 incidência de morte embrionária no início da prenhez traduz a natureza do problema
7 (DUNLAP e VINCENT, 1971; EALY et al., 1993).

8 A despeito dos avanços nos estudos em bovinos, pouco se sabe sobre a
9 susceptibilidade dos oócitos caprinos e ovinos à temperatura elevada. Em bovinos, o
10 estresse térmico calórico *in vitro* reduz o potencial de maturação, fecundação e de
11 desenvolvimento do oócito bem como alterações celulares típicas de apoptose (ROTH e
12 HANSEN, 2004a; 2005).

13

14 **2.1 Foliculogênese e gametogênese**

15

16 A célula oocitária antes do seu surgimento é precedida por dois tipos celulares
17 sucessivos, as células germinativas primordiais (CGP) e as oogônias. As CGP têm
18 origem extragonadal com formação durante o período embrionário, a partir do saco
19 vitelino, sendo caracterizadas por alta mobilidade e de serem altamente invasivas. Nos
20 bovinos e ovinos, ainda durante a vida fetal, as células germinativas primordiais migram
21 para o mesênquima da crista genital, ocupando a gônada indiferenciada, perdendo a
22 capacidade de mobilidade e multiplicando-se por mitose, podendo na espécie bovina,
23 atingir dois milhões de células por indivíduo (ERICKSON, 1966). Para se diferenciar
24 em ovogônias, as CGP passam por processo de crescimento celular e redistribuição de
25 organelas citoplasmáticas, multiplicando-se de forma ativa, dando origem aos oócitos

1 primário, que iniciam um ciclo de divisões meióticas para enfim originar os gametas
2 haplóides. Nos núcleos dos oócitos que se encontram na fase de diplóteno da prófase I
3 da meiose I, também denominado de vesícula germinativa (VG), ocorrerá a primeira
4 estabilização da meiose que permanecerá pelo menos até a puberdade (WASSARMAN
5 1994).

6 Enquanto o núcleo oocitário permanecer nesta fase de prófase I, o oócito,
7 juntamente com as células somáticas inclusas no compartimento folicular sofrem uma
8 intensa fase de crescimento, caracterizada por um incremento na atividade
9 transcricional (síntese de RNA), acúmulo de lipídeos e absorção ativa e/ou passiva de
10 diferentes nutrientes. O hormônio luteinizante (LH) liberado algumas horas antes da
11 ovulação promoverá o retorno da meiose e o núcleo oocitário inicia a diacinese. A
12 cromatina sofre condensação, a vesícula germinativa (VG) se rompe e o primeiro
13 corpúsculo polar é expulso, formando o oócito secundário (DEKEL et al., 1988;
14 BETTERIDGE et al., 1989; HYTTEL et al., 1989; SUN e MOOR, 1991; SUM et al.,
15 2001; SILVA et al., 2002).

16 Na segunda divisão meiótica, a fase de prófase II, caracterizada por ocorrer de
17 forma rápida e, às vezes inexistente, avança até a fase de metáfase II, culminando com a
18 segunda parada da meiose, estando o oócito nuclear e citoplasmaticamente apto para
19 reiniciar o processo. Para a retomada da meiose, o oócito deverá ser fecundado pelo
20 espermatozóide, então, no núcleo oocitário ocorrerá, sucessivamente, os estádios de
21 anáfase II e telófase II, expulsão do segundo corpúsculo polar e formação do oócito
22 haplóide fecundado, determinando o encerramento do processo da oogênese
23 (MILOVANOV e SIRARD, 1994; RUMPF et al., 1995; GONÇALVES et al., 2008).

24

25

1 2.2 Maturação *in vitro* de oócitos

2

3 A maturação *in vitro* (MIV) é um processo, no qual oócitos oriundos de
4 pequenos e médios folículos, meioticamente interrompidos (prófase I ou fase de
5 vesícula germinativa), são cultivados em laboratório para se tornarem aptos à
6 fecundação e alcançar a metáfase II (MII) com expulsão do primeiro corpúsculo polar.
7 No decorrer do crescimento do oócito e no final de sua maturação ocorrem mudanças
8 estruturais e bioquímicas que podem ser percebidas quando o oócito atinge 65 a 70% do
9 seu volume final, ainda no estágio de vesícula germinativa (SCHULTZ, 1986).

10 A qualidade dos oócitos pode ser avaliada por características definidas das
11 células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma, sendo de bom potencial para maturação
12 àqueles com três ou mais camadas de células intactas e sem expansão, com citoplasma
13 homogêneo, sem granulação e de cor marrom (KING et al., 1986; YOUNIS et al., 1989;
14 YANG e LU, 1990). Todavia, em caprinos e ovinos, o emprego dos oócitos na
15 maturação *in vitro*, não obedece a um critério rígido, variando desde aqueles com
16 *cumulus* compacto até os que apresentam apenas uma camada de células do *cumulus*
17 (MARTINO et al., 1994; IZQUIERDO et al., 1999).

18 No interior dos folículos ovarianos estão os oócitos em vários estádios de
19 desenvolvimento e regressão, os quais, envoltos por células da granulosa, formando o
20 complexo *cumulus oophorus* (CCO). Circundando o oócito, através de junções
21 intercomunicantes próximo à zona pelúcida, localiza-se um conjunto de células
22 foliculares radiais, sob forma de massa sólida, denominada de *corona radiata*. Essas
23 células do *cumulus*, em consequência do contato íntimo com o oócito, apresentam
24 função diferenciada daquelas localizadas na mural do folículo (GONÇALVES et al.,
25 2008).

1 No oócito são produzidas substâncias reguladoras com função relacionada à
2 atividades das células do *cumulus*, bem como componentes dessas células somáticas
3 atuam ativamente no mecanismo de crescimento e maturação oocitária. Mesmo não
4 sendo essenciais para a maturação de oócitos, maior eficiência é observada, quando as
5 células do *cumulus* estão presentes nos processos de maturação, fecundação e
6 desenvolvimento de embriões, evidenciando a importância dessas células na maturação
7 de oócitos *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008).

8 As células do *cumulus oophorus* apresentam-se em policamadas compactas e,
9 por ocasião da maturação, sob o estímulo dos hormônios LH e FSH entram em processo
10 de expansão, interrompendo as comunicações com o oócito (HYTTTEL, 1987; 1988;
11 SZOLLOSI, 1991). Essas células, assim como às da granulosa, são essenciais na
12 nutrição, crescimento, divisão meiótica, maturação citoplasmática e na fecundação do
13 oócito (EPPIG, 1980; FUKUI e SAKUMA, 1980). Nas células somáticas que envolvem
14 o oócito, durante as maturações citoplasmáticas e nucleares, ocorrem modificações
15 morfológicas específicas. As células do *cumulus* iniciam um arranjo na matriz
16 extracelular, rica em ácido hialurônico, e tal fenômeno é denominado de expansão ou
17 mucificação das células do *cumulus* (EPPIG et al., 1982; BUCCIONE et al., 1990).

18 *In vitro*, a expansão das células do *cumulus* é visível a partir de 12 horas de
19 cultivo (SUTOVSKY et al., 1993). A presença considerável de glicosaminoglicanos nas
20 células do *cumulus* impede a ação do estresse oxidativo dos radicais livres sobre os
21 oócitos, evitando a redução na taxa de clivagem (LUVONI et al., 1996), e o choque
22 térmico que bloqueia a síntese de proteínas (EDWARDS e HANSEN, 1996).

23 As células íntegras do *cumulus* exercem maior influência no processo de
24 maturação *in vitro* do que no grau de granulação citoplasmática, na atividade ovariana
25 ou no tamanho do folículo (FUKUI e SAKUMA, 1980), em consequência, o

1 desenvolvimento do oócito não é afetado pelo ciclo estral da fêmea doadora
2 (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989). A remoção das células do *cumulus* de oócitos
3 oriundos de pequenos folículos antrais afeta sua habilidade para atingir a maturação
4 nuclear e citoplasmática (SUM et al., 2001).

5 As células da granulosa, sob ação das gonadotrofinas hipofisárias, secretam o
6 líquido folicular, que como consequência do acúmulo acentuado desse líquido, promove
7 a dissociação dessas células e a formação de uma grande cavidade repleta de fluido,
8 denominada de antro folicular (HAFEZ, 1994). Existe correlação entre o grau de
9 metabolismo do oócito e o tamanho do folículo, onde oócitos de folículos grandes
10 podem iniciar o fenômeno metabólico da maturação, enquanto que os de folículos
11 pequenos continuam com o metabolismo característico de oócitos imaturos
12 (RODRIGUEZ et al., 2003).

13 A aquisição da competência oocitária para retomar o processo meiótico tem
14 relação com o surgimento da cavidade antral no folículo e o tamanho do oócito, que se
15 expande progressivamente durante o período de crescimento folicular (GRUNERT,
16 1989), processo este que na cabra dura em média 27 horas (MARTINO et al., 1994;
17 RHO et al., 2001). Nos caprinos, de acordo com De Smedt et al. (1994) e Gall et al.
18 (1996), os oócitos competentes para a maturação estão dentro de folículos com diâmetro
19 superior a 3 mm. Assim, os oócitos necessitam alcançar um diâmetro mínimo para
20 reiniciar a meiose, que em bovinos é de 110 μm (HYTTEL et al., 1997) e caprinos 119
21 μm para Ariyaratna e Gunawardana (1997) e de 125 μm para Rodriguez-González et
22 al., (2002).

23 No procedimento *in vitro*, oócitos de mamíferos que atingem o estágio de
24 diplóteno da prófase I da meiose I, reiniciam espontaneamente a maturação meiótica
25 quando não estão sob a influência do ambiente folicular (PINCUS e ENZMANN, 1935;

1 EDWARDS, 1965; THIBAUT, 1973; SIRARD e COENEN, 1993). Desta forma, em
2 todos os mamíferos, a maturação nuclear pode ocorrer quando os oócitos são removidos
3 de folículos antrais e cultivados *in vitro* (THIBAUT et al., 1987). De modo semelhante
4 à maturação que ocorre no organismo da fêmea, o oócito alcança à fase de metáfase II e,
5 novamente interrompe a meiose, sendo o processo reiniciado mediante a fecundação ou
6 ativação partenogenética (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994).

7 Nos oócitos maturados, as mitocôndrias apresentam localização mais central,
8 enquanto os grânulos corticais (GCs), associados a um segmento do retículo
9 endoplasmático liso, se deslocam para a periferia do citoplasma (RUMPF et al., 1995).
10 Durante o desenvolvimento do oócito, o aparelho de Golgi aumenta gradativamente sua
11 função, aumentando o número de membranas envolvidas na secreção de glicoproteínas
12 para a formação da zona pelúcida e de substâncias para a estruturação dos grânulos
13 corticais (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Com localização logo abaixo da
14 membrana plasmática, esses grânulos causam modificações na zona pelúcida,
15 impedindo a penetração de gametas masculinos supranumerários (THIBAUT et al.,
16 1987).

17 A maturação oocitária é alcançada em decorrência de alterações nas
18 concentrações de proteínas e a outros fatores promotores da maturação, presentes no
19 citoplasma (THIBAUT, 1977). A importância dessas substâncias no processo de
20 maturação foi demonstrada por Milanov e Sirard (1994) que, através do bloqueio da
21 síntese de proteínas com cicloheximide em oócitos bovinos, impediu o rompimento da
22 vesícula germinativa e a configuração da metáfase, evidenciando a existência da relação
23 entre a ativação do fator promotor da maturação (MPF) e a síntese protéica.

24 *In vitro*, utilizando-se substâncias químicas que interferem na concentração do
25 monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) (SIRARD et al., 1998) ou através de um

1 inibidor do fator promotor de maturação (FPM), como o “roscovatine” (MERMILLOD
2 et al., 2000; MARCHAL et al., 2001; MITALIPOV et al., 2001), os oócitos bovinos
3 podem permanecer em meiose, no estágio de vesícula germinativa. A retomada da
4 meiose dessa forma, também denominada de pré-maturação, induz a maturação
5 citoplasmática para o desenvolvimento embrionário (FOULADI NASHTA et al., 1998).

6 A maturação *in vitro* quando feita de forma inadequada pode causar defeitos a
7 nível nuclear ou citoplasmático ou ainda, em ambas as estruturas (YANG et al., 1998).
8 Durante o processo, inúmeros fatores podem agir sobre a maturação de oócitos, dentre
9 eles, a substância inibidora da maturação do oócito (OMI) presente no fluido de
10 pequenos e médios folículos bovinos, suínos, hamsters e camundongo (TSAFRIRI et
11 al., 1982) atuando por meio das uniões intercelulares entre as células do *cumulus* e o
12 oócito (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994).

13 Fatores como as purinas, que também apresentam baixo peso molecular, são
14 encontrados no fluido folicular de várias espécies (DOWNS, 1990), juntos a
15 hypoxantinas e a adenosina atuam sinergicamente, mantendo o oócito em bloqueio pela
16 inibição da atividade da fosfodiesterase e por elevar o nível de AMPc (EPPIG et al.,
17 1985; DOWNS, 1993).

18 No decurso da maturação de oócitos, a enzima adenilciclase, quando ativada,
19 transforma o trifosfato de adenosina (ATP) em AMPc que mantém o oócito em inibição
20 meiótica, por ativar a proteína quinase. Para evitar a alta concentração intercelular de
21 AMPc que impede a retomada da meiose (DOWNS, 1993), a enzima fosfodiesterase
22 transforma o AMPc em 5'AMP que é ineficaz para acionar a proteína quinase
23 (MOCHLY-ROSEN, 1995). A redução da concentração do AMPc induz a
24 desfosforilação das proteínas inativas que se tornam ativas e provocam a dissolução
25 nuclear (DOWNS, 1993).

1 O reinício da meiose ocorre mediante a ação das gonadotrofinas, liberando
2 cálcio para atuar na dissolução do envelope nuclear, elevando a concentração de ATP,
3 provocando as reações de fosforilação (DOWNS, 1993), interrompendo a comunicação
4 entre o oócito e as células do *cumulus* e impedindo o fluxo de substâncias inibidoras da
5 meiose (DEKEL, 1988) com o OMI e o AMPc.

6 As células foliculares, mediante ação dos hormônios, podem liberar fatores que
7 induzem os oócitos a estimular a fosfodiesterase, em consequência ocorre à redução da
8 concentração de AMPc, a reação de proteínas quinases e a ativação do fator intercelular
9 promotor da fase-M (MPF), que coordena a retomada da meiose em oócitos caprinos
10 (DE SMEDT et al., 1994) e bovinos (TATEMOTO e TERADA, 1998).

11 Para a maturação *in vitro* de oócitos é necessário encontrar um meio de cultivo
12 que proporcione alta qualidade aos embriões para que os mesmos continuem o
13 desenvolvimento, realizem a implantação e resulte em nascimento de conceptos viáveis
14 (MENEZO et al., 1998), podendo ser acrescido de sais, aminoácidos, hormônios,
15 substratos energéticos, fatores de crescimento, vitaminas, soro, albumina sérica bovina
16 (BSA), outros fluidos biológicos, bem como, com uma mistura definida de hormônios e
17 fatores de crescimento (SIRARD et al., 1988; BERG e BREM, 1989; MARQUANT-LE
18 GUIENNE et al., 1989, 1990; GARDNER e LANE, 1993; PARK e LIN, 1993;
19 GANDOLFI, 1994; GARDNER et al., 1994; BORMANN et al., 2003).

20 Diversos meios simples têm fornecido bons resultados na maturação de oócitos,
21 tais como o meio-6 de cultura de embriões de hamsters (ROSE-HELLEKANT et al.,
22 1998), meio básico modificado (MBM) (KRISHER et al., 1999) e fluido sintético de
23 oviduto (SOF) (GANDHI et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2000). Os meios sintéticos
24 permitem melhor compreensão dos fatores envolvidos no processo de maturação *in*
25 *vitro* de oócitos (SIRISATHIEN, 2002).

1 Na maioria dos estudos sobre a maturação *in vitro* de oócitos de mamíferos, o
2 meio mais utilizado é o TCM-199 suplementado com sais de EARLE (LEIBFRIED-
3 RUTLEDGE et al., 1986), modificado de acordo com o protocolo de cada laboratório.
4 A adição de substâncias neste meio tem demonstrado contribuir para melhorias no
5 processo de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos.

6 A decisão sobre o meio de maturação a ser utilizado, assim como a seleção de
7 hormônios e proteínas que participam como suplementos no processo de MIV, é de
8 grande importância no condicionamento e na viabilidade do oócito para a fecundação e
9 o desenvolvimento dos embriões (PAWSHE et al., 1996; TEOTIA et al., 2001). O grau
10 de sucesso na produção *in vitro* (PIV) de embriões é proporcional ao grau na habilidade
11 de se criar condições semelhantes ao ambiente materno (VANROOSE et al., 2001).

12

13 **2.3 Fertilização *in vitro***

14

15 O sucesso na obtenção de resultados consistentes da fertilização *in vitro* (FIV)
16 iniciou com a maturação de oócitos bovinos (BRACKETT et al., 1978; 1980) e
17 melhorias na etapa da capacitação espermática, culminando com o nascimento do
18 primeiro concepto bovino através da FIV (BRACKETT et al., 1982). Com avanços da
19 técnica de maturação de oócitos, seguiram-se diversos relatos de prenhez por FIV na
20 espécie (BRACKETT et al., 1984; SIRARD e LAMBERT, 1985; LAMBERT et al.,
21 1986; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987; SIRARD et al., 1988).

22 A baixa repetibilidade dos resultados iniciais da FIV em oócitos de bovinos
23 maturados *in vitro*, acontecia em função da não compreensão dos mecanismos que
24 geravam o bloqueio do desenvolvimento embrionário no estágio pró-nuclear. Relatos de
25 Iritani e Niwa (1977) mostraram taxas de 6 a 7% de formação pró-nuclear após a FIV

1 de oócitos maturados *in vitro*. Com aprimoramento nos meios de maturação de oócitos,
2 Fulka et al. (1982), perseguindo os mesmos objetivos, obtiveram taxas de 45% de
3 formação pró-nuclear.

4 A fecundação é um evento seqüencial que se inicia com a passagem do
5 espermatozóide pela membrana pelúcida, penetração na membrana plasmática e seu
6 alojamento no interior do citoplasma do gameta feminino. Os espermatozóides dispõem
7 de dois mecanismos para efetuar a penetração na zona pelúcida. Um deles é enzimático
8 e se caracteriza pela ação proteolítica do conteúdo do acrossomo e o outro é mecânico,
9 decorrente da motilidade espermática (YANAGIMACHI, 1994). Na espécie caprina, tal
10 penetração do espermatozóide no citoplasma do oócito ocorre próximo de quatro horas
11 após a inseminação, seguindo-se da descondensação das cromatinas (de seis para oito
12 horas pós-inseminação), e da formação dos pró-núcleos, masculino e feminino, de dez
13 para dezesseis horas após a inseminação (MOGAS et al., 1997).

14 A compreensão da capacitação espermática foi iniciada por Chang (1951) e
15 Austin (1951). Estes autores observaram que os espermatozóides deveriam ser expostos
16 ao trato reprodutivo feminino para adquirir a capacidade de penetrar nos oócitos. O
17 termo capacitação espermática foi criado para descrever o processo, através do qual, as
18 células espermáticas atingem a capacidade para fecundar (AUSTIN, 1952). Este
19 conhecimento tornou possível fecundar oócitos de mamíferos, levando a primeira FIV
20 por Chang (1959), em oócitos de coelho.

21 Lavados de ovidutos bovinos revelaram alta concentração de
22 glicosaminoglicanos (LEE e AX, 1984). A Heparina tem mostrado ser o mais potente
23 glicosaminoglicano com capacidade para induzir a reação acrossomática de
24 espermatozóide epididimário de touro (HANDROW et al., 1982). Com base neste fato,
25 Parrish et al. (1986) empregaram o meio de piruvato lactato albumina tyrode (TALP) e

1 observaram que o espermatozóide de touro criopreservado, pré-tratado com heparina
2 (10 µg/mL) por 15 minutos antes da FIV, aumentou a taxa de fecundação de 40% para
3 79%, entretanto, mais de 70% da taxa de fecundação foi atingida com sêmen de 4
4 diferentes touros.

5 Swim-up (KEEFER et al., 1985; PARRISH et al., 1985) e o gradiente de
6 densidade de Percoll são os dois tratamentos mais usados, associados à heparina, na
7 capacitação espermática. Espermatozóides tratados através do método de swim-up
8 apresentam maior capacidade de penetração no oócito do que àqueles tratados com
9 Percoll, apresentando também maior taxa de clivagem, embora as porcentagens de
10 blastocistos tenham sido similares. O uso do Percoll resultou numa maior taxa de
11 recuperação da motilidade espermática, quase seis vezes mais, do que o método swim-
12 up. (PARRISH et al., 1995)

13 Várias substâncias químicas têm sido incluídas para aumentar a taxa de
14 fecundação. Inibidores da fosfodiesterase são usualmente empregados para aumentar os
15 níveis de AMPc espermático (CRITSER et al., 1986). A cafeína tem mostrado aumentar
16 a motilidade espermática nos ejaculados pobres. Altas concentrações de cafeína (5 mM)
17 exercem uma ação sinérgica com a heparina na taxa de penetração espermática (NIWA
18 et al., 1991). Contudo, concentrações mais baixas de cafeína (2,5-7,5 µM) têm mostrado
19 ser ineficazes (COSCONI et al., 2001). Numabe et al. (2001) obtiveram resultados
20 semelhantes ao utilizar pentoxilina (5 mM) associada à heparina, ou associação de
21 cafeína com heparina.

22 Usando glutathione (5 mM) durante a FIV, Slaweta (1987) obteve bons
23 resultados. Apesar disso, Kim et al. (1999) obtiveram efeitos tanto positivos quanto
24 negativos, suplementando o meio da FIV com glutathione (1 mM), dependendo do sêmen
25 do touro. A associação de penicilamina (2 mM), hipotaurina (10 mM), epinefrina (1

1 mM) ou seja a mistura PHE no meio de FIV, mostrou-se efetiva nos experimentos com
2 hamster e tem sido utilizada com freqüência na FIV em bovinos. Trabalhos utilizando
3 PHE também mostraram resultados positivos (MILLER et al., 1992) ou negativos na
4 FIV do bovino (LONG et al., 1994; PALMA et al., 1997). Apenas penicilamina tem
5 mostrado melhorar os resultados da FIV (KESKINTEPE et al, 1995).

6 A proporção de células espermáticas/oócitos na FIV é bem maior que àquela
7 ocorrida *in vivo*. É comum nos sistemas de FIV para bovino a proporção de 5000 a
8 10000 espermatozóides por oócitos. A razão de espermatozóide para oócito abaixo de
9 500 para 1 reduz significativamente a taxa de clivagem (LONG et al., 1994; WARD et
10 al., 2002).

11 O cultivo embrionário é a fase final da PIV e compreende os estágios desde
12 zigoto até blastocisto eclodido, a depender da finalidade do processo. Apesar de seu
13 êxito encontrar-se subordinado aos processos de maturação e de fecundação eficiente, o
14 cultivo é de grande importância, pois é nele que se decide o futuro do embrião, a partir
15 da avaliação qualitativa. É nesta fase que se tem o início do processo de clivagem, a
16 ativação do genoma embrionário, a agregação e a compactação dos blastômeros,
17 diferenciação do trofoblasto e do botão embrionário, formação e expansão da blastocele
18 e, finalmente, o rompimento da zona pelúcida (PRATHER e FIRST, 1988).

19 Na maioria das espécies mamíferas, a necessidade quantitativa e qualitativa dos
20 componentes que viabilizam o desenvolvimento embrionário ainda não está bem
21 definida (IZQUIERDO et al., 1999). Os meios produzidos na PIV de embriões caprinos
22 (maturação, fecundação e cultivo) ainda são deficientes (ONGERI et al., 2001), pois
23 além de prejudicarem as etapas anteriores, promovem o bloqueio do desenvolvimento,
24 inviabilizando o embrião.

1 A tensão de oxigênio no trato reprodutivo feminino nos mamíferos, é mais baixa
2 que no ar atmosférico (MASTROIANNI e JONES, 1965; MITCHELL e YOCHIM,
3 1968; MAAS et al., 1976; GARRIS e MITCHELL, 1979; FISCHER e BAVISTER,
4 1993). Está estabelecido que uma atmosfera com oxigênio reduzido de 20% para 5%
5 influencia positivamente o desenvolvimento do número de zigotos para o estágio de
6 blastocisto em ruminantes (BATT et al., 1991; VOELKEL e HU, 1992; LONERGAN et
7 al., 1999), assim como em outras espécies de mamíferos, incluindo coelho (LI e
8 FOOTE, 1993), caprinos (BERTHELOT e TERQUI, 1996) e humanos (DUMOULIN et
9 al.; 1999). Cultura sob baixa tensão de oxigênio elimina a necessidade de co-cultura
10 (XU et al., 1992; WATSON et al., 1994; CAROLAN et al.; 1995).

11 Tentativas para melhorar os resultados da cultura de embriões levaram a uma
12 variedade de sistemas de co-cultura, incluindo células do cumulus (GOTO et al., 1988),
13 vesículas trofoblásticas (CAMOUS et al., 1984; HEYMAN et al., 1987) e co-cultura de
14 células do oviduto ou meio condicionado (GANDOLFI e MOOR, 1987; REXROAD
15 JR. e POWELL, 1988, EYESTONE e FIRST, 1989). Vários fatores, tais como o estágio
16 do ciclo estral em que o tecido do oviduto foi obtido, assim como o período de
17 condicionamento do meio devem ser melhores definidos para a repetibilidade dos
18 resultados (EYESTONE et al., 1991). Permanece desconhecida a maneira exata como a
19 co-cultura ou os meios condicionados beneficiam o desenvolvimento embrionário, no
20 entanto, alguns pesquisadores têm sugerido que fatores de crescimento, tais como
21 peptídeos ou citocinas são secretados dentro do meio (GANDOLFI, 1995), enquanto
22 outros argumentam que a co-cultura e o meio simplesmente condicionado reduzem
23 alguns componentes inibitórios, como as altas taxas de oxigênio (BAVISTER, 1992,
24 Watson et al., 1994) ou de glicose (RIEGER et al., 1995; EDWARD et al, 1997). A

1 natureza complexa desses resultados torna impossível identificar fatores específicos
2 críticos para o desenvolvimento embrionário.

3

4 **2.4 Cultivo embrionário *in vitro***

5

6 A fecundação *in vitro* sofre influencia de fatores intrínsecos e extrínsecos, tais
7 como composição da atmosfera gasosa, pH, luminosidade, aminoácidos, fatores de
8 crescimento e vitaminas (GONÇALVES et al., 2008). Na tentativa de aperfeiçoar o
9 processo de cultivo embrionário, vários estudos foram desenvolvidos para evitar o
10 bloqueio no desenvolvimento embrionário (IZQUIERDO et al., 1999).

11 A solução para o problema do bloqueio no desenvolvimento do embrião
12 (THOMPSON, 2000), veio na década de 80 com a introdução da co-cultura com células
13 da tuba uterina e da granulosa. Zigotos bovinos fecundados *in vitro* e transferidos para
14 ovidutos de coelhas (FUKUI, 1989) ou de ovelhas (LU et al., 1987) superaram o
15 bloqueio do desenvolvimento, atingindo o estágio de blastocisto. Segundo Van Inzen et
16 al. (1995), este fato demonstra que a contribuição do oviduto ao desenvolvimento
17 embrionário *in vitro* não é espécie-específica, entretanto, esse procedimento apresenta
18 desvantagens, como o uso de animais para hospedeiros intermediários. Porém, as
19 substâncias secretadas pelas células do co-cultivo podem alterar o meio e impossibilitar
20 uma real avaliação das exigências do embrião em desenvolvimento (BRACKETT et al.,
21 1989; YOUNIS et al., 1989; OLIVEIRA et al., 1991,1997).

22 Na década de 90 as primeiras pesquisas sobre meios de cultura quimicamente
23 definidos demonstraram a possibilidade da utilização de meio simples como o *Hamsters*
24 *Embryo Culture Medium* (HECM) ou de um complexo como o TCM-199, ambos sem
25 adição de soro, e com potencial para produzirem mórulas e blastocistos

1 (PINYPUMMINTER e BAVISTER, 1991). Porém, existem controvérsias sobre a
2 utilização de meios quimicamente definidos para produção de embriões. Krisher et al.
3 (1999) e Lonergan et al. (1999) não obtiveram bons resultados ao produzir embriões em
4 meios suplementados com álcool polivinílico. Considerando que a albumina é a
5 proteína existente em maior quantidade nos órgãos genitais das fêmeas, talvez a adição
6 da mesma ao meio quimicamente definido possa contribuir na obtenção de resultados
7 satisfatórios no desenvolvimento embrionário. Nesse sentido, a forma recombinante
8 dessa proteína alcançou resultados animadores (ECKERT et al., 1998).

9 Pinypuminter e Bavister (1996) desenvolveram um sistema de cultivo em duas
10 fases. A primeira utiliza um meio quimicamente definido e a na segunda fase ocorre a
11 adição de soro. Através desse meio, porcentuais superiores a 50% de blastocistos
12 puderam ser alcançados (KRISHER et al., 1999), pois o meio de cultura é
13 potencializado pelo soro que tem uma ação bifásica sobre os embriões (VANROOSE et
14 al., 2001). Os riscos da utilização de meios quimicamente definidos são reduzidos por
15 não possuírem componentes de origem animal, evitando assim uma possível
16 contaminação (YOSHIOKA et al., 1997). A substituição de parte do meio de cultivo
17 durante o desenvolvimento embrionário e a adição de componentes a esse meio devem
18 ser cuidadosamente avaliados por exercerem forte influência no processo
19 (WHITTINGHAM, 1971).

20

21 **2.5 Estresse térmico**

22

23 Fatores ambientais externos e o microclima dentro das instalações exercem
24 efeitos diretos e indiretos sobre todas as fases de produção, acarretando prejuízos
25 econômicos. O conhecimento destas respostas fisiológicas e comportamentais dos

1 animais relacionados ao ambiente térmico estressante permite a modificação do manejo,
2 objetivando a maximização da atividade (SILVA, 2000).

3 O Brasil possui extensa área territorial e por isso apresenta clima diversificado
4 entre as regiões. No entanto, em grande parte do país verifica-se temperatura e umidade
5 relativa do ar elevada durante todo o ano. Curtis (1983) e Nâãs (1989) observaram que
6 os animais homeotérmicos mantêm a temperatura corporal dentro de certos limites
7 relativamente estreitos, mesmo que a temperatura ambiente flutue e que sua atividade
8 produtiva varie intensamente, através de alterações comportamentais e metabólicas,
9 produzindo calor em baixas temperaturas ou perdendo calor para o meio em situações
10 de estresse térmico calórico (CURTIS, 1983).

11 Os animais homeotérmicos possuem uma zona de termoneutralidade, entre
12 temperatura mínima e máxima, ou seja, uma faixa de temperatura ambiente em que o
13 animal não precisa produzir ou perder temperatura corporal. Essa é a zona de conforto
14 térmico, na qual podem expressar seu máximo potencial genético (NÂÃS, 1989).

15 Nâãs (1989) observou que essa zona de conforto térmico é dependente de
16 diversos fatores, sendo alguns ligados ao animal, como peso, idade, estado fisiológico,
17 tamanho do grupo, nível de alimentação e genética e outros ligados ao ambiente como a
18 temperatura, velocidade do vento, umidade relativa do ar, tipo de piso. Quando expostos
19 a temperaturas fora da zona de conforto, os animais irão utilizar a energia de manutenção
20 para gerar ou dissipar calor, diminuindo a energia que seria utilizada para a produção
21 e/ou reprodução. Os mecanismos utilizados nessa mobilização energética podem ser
22 divididos em duas categorias: os não-evaporativos ou sensíveis e os evaporativos ou
23 latentes (CURTIS, 1983).

24 Os meios não-evaporativos incluem condução, convecção e radiação e requerem
25 um diferencial de temperatura entre o animal e o meio ambiente. Os evaporativos ou

1 latentes incluem a perda de calor por evaporação de água na respiração e sudação
2 (SILVA, 2000).

3 A condução térmica é o mecanismo de transferência de energia térmica entre
4 dois corpos ou entre partes de um mesmo corpo, através da energia cinética das
5 moléculas, esse fluxo passa das moléculas de alta energia para as de baixa, ou seja, de
6 zonas de alta temperatura para outra inferior. É necessário um contato direto entre as
7 moléculas dos corpos envolvidos (SILVA, 2000). A convecção ocorre quando uma
8 corrente de fluido líquido ou gasoso, que absorve energia térmica em um dado local e
9 que então se desloca para outro local, onde se mistura com porções mais frias desse
10 fluido e para elas transfere a energia térmica. Quando o animal é envolto pela atmosfera,
11 cuja temperatura é inferior à da sua superfície, a energia térmica é transferida por
12 condução do animal para a camada limite (adjacente à sua superfície) (NÂÃS, 1989).

13 A radiação pode ser definida como a transferência de energia de um corpo a
14 outro através de ondas eletromagnéticas. Uma superfície pode refletir, absorver e
15 transmitir a energia incidente (NÂÃS, 1989).

16 Em climas tropicais, a temperatura do ar encontra-se frequentemente próxima da
17 corporal ou a excede; além disso, a temperatura radiante média do ambiente tende a ser
18 muito mais elevada que a atmosférica. Consequentemente, a termólise por convecção e
19 radiação é dificultada ou inibida. Em adição, se a região for também úmida, a perda de
20 calor por evaporação será prejudicada, proporcionando um elevado estresse calórico
21 (SILVA, 2000).

22 Quando a temperatura ambiente sobe acima de 29°C, a via de perda de calor
23 mais eficiente será por meios evaporativos (transpiração e respiração), sendo
24 responsável, por exemplo, em bovinos por 85% das perdas de calor. Esse tipo de perda
25 é dependente da umidade relativa do ar (SILVA, 2000).

1 A mais extensa linha de contato entre o organismo e o ambiente é a superfície
2 cutânea, constituída pela epiderme e seus anexos. O tipo de pelame interfere na
3 termólise por perda de calor sensível (condução, convecção e radiação), na eficiência da
4 termólise evaporativa, na transferência de calor latente de evaporação da epiderme para
5 a atmosfera e em atributos termorreguladores correlacionados, como dimensões e nível
6 de atividade das glândulas sudoríparas (SILVA, 2000).

7 Segundo CURTIS (1983), em relação aos pêlos dos animais, as propriedades que
8 irão influenciar as trocas térmicas são: o comprimento, espessura da capa, ângulo de
9 inclinação, diâmetro, densidade de massa, densidade numérica e pigmentação. O calor
10 conduzido através das fibras é maior do que o conduzido pelo ar, assim, quanto maior o
11 número de fibras por unidade de área e quanto mais grossas forem essas fibras, maior
12 será a quantidade de energia conduzida através da capa. Por outro lado, fibras mais
13 finas, compridas e menos numerosas, resultam em passagem mais limitada de calor
14 devido à maior resistência térmica das fibras. A posição inclinada das fibras resulta em
15 contato mais frequente entre elas, reduzindo o volume de ar no interior da capa e sua
16 espessura, aumentando a condução térmica. Finalmente, a resistência térmica pode ser
17 aumentada pela presença de fibras finas e lanosas entremeadas com as mais grossas e
18 compridas.

19 A pigmentação da epiderme é determinada pela melanina, formada nos
20 melanócitos pela oxidação do aminoácido tirosina, cuja função é a proteção contra a
21 radiação ultravioleta, fundamental para os animais que vivem nos trópicos. (CURTIS,
22 1983). As raças bovinas tropicais apresentam sempre epiderme mais pigmentada que as
23 de origem européia. Mas a diferença não está no número de melanócitos por unidade de
24 área, mas na atividade destes. Os animais com pigmentação da epiderme branca são
25 mais sujeitos a sofrer os efeitos da radiação ultravioleta. Embora uma capa de coloração

1 clara seja mais reflectante, para que essa vantagem seja efetiva, os elementos da capa
2 devem ser densamente distribuídos e posicionados em ângulo baixo sobre a epiderme,
3 de modo a minimizar a transmissão de ondas curtas através da capa. E a epiderme deve
4 ser pigmentada, o que não é imperativo se a capa for de cor escura (NÂÃS, 1989).

5 Em ambientes muito úmidos, a evaporação pode tornar-se muito lenta ou nula. A
6 perda de calor latente evaporativo, através das glândulas sudoríparas, é um dos
7 mecanismos de adaptação ao estresse calórico em bovinos, ovinos, eqüinos, caprinos e
8 bubalinos (CURTIS, 1983).

9 Quando um animal é submetido a altas temperaturas, ocorre um aumento da
10 circulação sangüínea para epiderme, proporcionando uma quantidade adicional de
11 matéria-prima para as glândulas sudoríparas e estimulando a sua ação. A quantidade de
12 suor produzido depende também do número de glândulas sudoríparas ativas e número
13 de glândulas por unidade de área epidérmica. Animais que vivem em locais sujeitos a
14 altas temperaturas tendem a apresentar uma maior densidade numérica de glândulas
15 sudoríparas. Os ovinos, pela existência de um velo espesso que dificulta a evaporação
16 da umidade cutânea, a evaporação respiratória tem sido apontada como o principal
17 mecanismo de termólise (SILVA, 2000).

18 Para perder calor por evaporação respiratória, o animal aumenta a sua frequência
19 respiratória. Outra forma de adaptação, em situações de estresse calórico, é diminuir o
20 consumo de oxigênio, para diminuir o metabolismo e, conseqüentemente a produção de
21 calor metabólico (NÂÃS, 1989).

22 Para avaliar a adaptação dos animais a um determinado ambiente, uma gama de
23 fatores devem ser seriamente considerados, como: temperatura do ar, temperatura
24 radiante, radiação solar, umidade relativa do ar, pressão atmosférica, capa externa como
25 espessura, estrutura, isolamento térmico, penetração do vento, permeabilidade do vapor,

1 transmissividade, emissividade, absorvidade e refletividade. As características corporais
2 também devem ser levadas em conta, como : forma corporal, tamanho, movimentação,
3 área de superfície radiante, área exposta à radiação solar direta, emissividade da
4 epiderme, absorvidade da epiderme, temperatura corporal, taxa de sudação, trocas
5 respiratórias, produção, taxa de crescimento e desenvolvimento e níveis hormonais (T3,
6 T4, cortisol) (SILVA, 2000).

7 O estresse térmico calórico (ETC) compromete a função reprodutiva em várias
8 espécies tais como ovinos (DUTT, 1963), caprinos (OZAWA et al., 2005), suínos
9 (TOMPKINS et al., 1967), coelhos (WOLFENSON e BLUM, 1988) e bovinos (EALY
10 et al., 1993), afetando as funções fisiológicas em vários tecidos do sistema reprodutivo,
11 como a dinâmica folicular (WOLFENSON et al., 1995), reduz a viabilidade de oócitos
12 (ROCHA et al., 1998) e compromete o desenvolvimento embrionário (DUNLAP e
13 VICENT, 1971; EALY et al., 1993). A infertilidade associada ao ETC é um problema
14 de ordem multifatorial, pois afeta as funções fisiológicas e celulares em vários tecidos.
15 Além disso, já foi observado que em animais expostos ao estresse calórico ocorre a
16 emergência precoce do folículo dominante da segunda onda folicular (WOLFENSON et
17 al., 1995), o que pode levar a ovulação de um oócito já envelhecido. Existe um grande
18 número de estudos demonstrando que embriões no período de pré-implantação são
19 particularmente susceptíveis a hipertermia. (DUTT, 1963; WOLFENSON e BLUM,
20 1988), inclusive em ovinos e caprinos (DUTT, 1963; EALY et al., 1993). Da mesma
21 forma, o choque térmico calórico induzido durante a cultura de embriões produzidos *in*
22 *vitro* diminui o desenvolvimento ao estágio de blastocisto, aumenta a mortalidade
23 embrionária e reduz a taxa de prenhez em animais submetidos à transferência de
24 embriões (ALLISTON et al., 1965; EALY et al., 1995).

1 Tem sido sugerido que altas temperaturas podem exercer efeitos depressivos na
2 fertilidade por ação no ambiente uterino, no sistema endócrino ou no embrião. É sabido
3 que altas temperaturas causam redução na duração e intensidade do estro, além de ampliar
4 a incidência de anestro e ovulação silenciosa (BADINGA et al., 1993). Visto que a atividade
5 do ovário é regulada pelo hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), liberado pelo
6 hipotálamo, e pelas gonadotropinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio
7 luteinizante (LH), liberadas pela glândula pituitária anterior, muitos autores têm estudado
8 os efeitos do estresse térmico na secreção destes hormônios (HAFEZ, 1994).

9 Altas temperaturas ambientais podem diminuir a concentração de LH no plasma,
10 afetando negativamente o desenvolvimento final e a diferenciação do folículo dominante
11 (GUZELOGLU et al., (2001). Existem discrepâncias na literatura a respeito da secreção
12 hormonal durante um estresse térmico calórico agudo. Concentrações de estradiol (E₂) no
13 plasma podem ser diminuídas, aumentadas ou não serem afetadas pelo estresse térmico.
14 Paradoxos similares ocorrem para a concentração de progesterona (P₄). O crescimento e o
15 desenvolvimento dos folículos ovarianos podem ser ou não ser afetados pelo calor (BADINGA
16 et al., 1993).

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

21 Este estresse também inibe o desenvolvimento folicular através da diminuição
22 no número de receptores para o FSH nas células da granulosa (CG), resultando na
23 diminuição da atividade do estrogênio nos folículos (SHIMIZU et al., 2005). O ETC
24 é responsável ainda pela supressão na atividade da aromatase nestas células, resultando em

1 uma baixa capacidade de produção de E₂ pelos folículos (WOLFESON et al., 1997;
2 SIMIZU et al., 2005).

3 Essa redução na aromatase tem como consequência um aumento nos níveis de
4 prolactina e glicocorticóides (BADINGA et al., 1993; SHIMIZU et al., 2005). Através
5 deste estudo os autores sugerem como potencial terapia para suprimir os efeitos do
6 estresse térmico-calórico, intervenções na expressão dos receptores para o FSH, como
7 um substituto às terapias que utilizam estrogênio (SHIMIZU et al., 2005).

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

14 A influência ou não do ETC no CL durante a fase luteínica intermediária é menos
15 clara. Foi demonstrado que o estresse térmico aumenta, diminui ou não afeta as concentrações
16 de progesterona no sangue. As células do CL são diferentes daquelas do folículo. Por
17 conseguinte, se o estresse térmico diminui os níveis de progesterona no sangue, então essa
18 redução seria causada pelos efeitos do estresse térmico no folículo, que por fim afeta o corpo
19 lúteo. De outro modo, alterações na taxa do metabolismo associadas ao ETC podem afetar
20 o metabolismo da progesterona (VASCONCELOS, 2003). Já Balazs (2004) não observou
21 mudanças significativas nos níveis de P₄ em vacas superovuladas da raça Holandesas-Friesian
22 criadas na região semi-árida de Pernambuco.

23 A exposição de vacas leiteiras ao estresse térmico durante o verão reduz os
24 índices de concepção desde o verão até o início do outono. Uma das consequências do
25 estresse térmico materno é a redução na competência oocitária, a qual só é recuperada

1 dois a três ciclos estrais após o final do verão (ROTH et al., 2001), indicando que o
2 estresse térmico pode danificar o estoque de folículos e oócitos que iniciaram seu
3 crescimento ainda no período quente.

4 A susceptibilidade de oócitos bovinos à temperatura elevada pode ser constatada
5 tanto durante a fase de vesícula germinativa (VG) como durante o período de maturação
6 oocitária. Quando oócitos na fase de VG foram coletados de vacas Holandesas expostas
7 ao estresse térmico e submetidos à fecundação *in vitro* (FIV), houve redução no
8 desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (ROCHA et al., 1998; AL-
9 KATANANI et al., 2002). O estresse térmico entre o estro e a inseminação artificial
10 (IA) de novilhas (período de maturação oocitária) aumentou a proporção de embriões
11 com desenvolvimento retardado (PUTNEY et al., 1989a).

12 Um número considerável de evidências demonstra que o oócito pode ser
13 danificado pelo ETC causando uma redução na sua capacidade de desenvolvimento
14 (PUTNEY et al., 1989a; ROTH e HANSEN, 2004b). Um fator peculiar ao oócito
15 bovino no estágio de VG é que o mesmo permanece no folículo antral por um período
16 longo de 42 dias e durante este tempo o animal exposto ao ETC pode sofrer oscilações
17 de temperatura corporal acima de 41°C (TURNER, 1982; PUTNEY et al., 1988;
18 PUTNEY et al., 1989b; EALY et al., 1993; WOLFENSON et al., 1995; RIVERA e
19 HANSEN, 2001).

20 Os mecanismos pelo qual o ETC afeta a capacidade de desenvolvimento
21 oocitário ainda não foram completamente esclarecidos. No entanto, tendo em vista que
22 a apoptose é o principal processo responsável pela redução do número de oócitos
23 durante a vida reprodutiva de fêmeas mamíferas (MORITA e TILLY, 1999; TILLY,
24 2001) é possível que esta forma de morte celular seja induzida em oócitos expostos às
25 condições de estresse.

1 O estresse térmico durante a maturação *in vitro* (MIV) reduz a maturação
2 nuclear, a fecundação (ROTH e HANSEN, 2005) e o desenvolvimento embrionário até
3 o estágio de blastocisto (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004a; JU
4 et al., 2005). A exposição de oócitos bovinos à temperatura severa de 42-43°C
5 (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004b) ou à temperatura
6 moderada de 40-41°C (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004a)
7 durante as primeiras 12 horas (h) de MIV (0-12h MIV) bloqueou ou reduziu o
8 desenvolvimento embrionário.

9 A mortalidade embrionária nas espécies aumenta quando ocorre exposição da mãe a
10 elevadas temperaturas ambiente, especialmente em áreas tropicais (JAINUDEEN e
11 HAFEZ, 2000). Vacas submetidas ao estresse térmico após a inseminação apresentam uma
12 menor taxa de prenhez (PUTNEY et al., 1988; EALY et al., 2000). Os efeitos do estresse
13 térmico sobre os embriões não são aparentes até os estádios tardios de desenvolvimento.
14 Oócitos fecundados de ovelhas e vacas, quando colocados em altas temperaturas, tanto *in*
15 *vitro* como *in vivo* são prejudicados porém, continuam a se desenvolver, somente morrendo
16 durante os estádios críticos da implantação (JAINUDEEN e HAFEZ, 2000). O ETC é
17 mais prejudicial à sobrevivência embrionária quando ocorre logo após o estro. Em
18 particular, o ETC reduz a viabilidade do embrião no dia 8 (D-8) após o estro se vacas
19 superovuladas são expostas a ao estresse térmico-calórico no dia 1 (D-1), porém não no dia
20 3, 5 e 7 (EALY et al., 1993). Uma das razões para esse fenômeno é que os embriões se
21 tomam mais resistentes a aumentos de temperatura ao passo que se desenvolvem.
22 Temperaturas que bloqueiam o desenvolvimento dos embriões bovinos no estágio de 2
23 células têm efeito intermediário em embriões com 4-8 células e pouco ou nenhum efeito no
24 desenvolvimento de mórulas (ROMAN-PONCE et al., 1978; ROSENBERG et al., 1982;
25 EALY et al., 1995; EDWARDS e HANSEN, 1997).

1 O ETC entre oito e dezessete dias de gestação pode alterar o meio uterino assim
2 como o crescimento e a atividade secretória do embrião. Aparentemente o estresse
3 térmico antagoniza os efeitos inibitórios do embrião sobre a secreção uterina de PGF2 α
4 (JAINUDEEN e HAFEZ, 2000).

5 Comparados à maioria das células, os embriões são particularmente sensíveis a
6 mudanças de temperatura e um leve estresse térmico de 41°C por 4h é suficiente para
7 reduzir a proporção de embriões que se desenvolvem em meio de cultura (KRININGER et
8 al., 2002; HERNÁNDEZ-CERÓN et al., 2004). Existem muitos outros efeitos do
9 estresse térmico que não afetam diretamente o embrião, entretanto comprometem sua
10 sobrevivência. Por exemplo, o estresse térmico-calórico reduz o fluxo sanguíneo no útero
11 (ROMAN-PONCE, 1978) e, como resultado, o envio de nutrientes e hormônios a este
12 órgão também é comprometido (ROSENBERG et al., 1982; HOWELL et al., 1994).

13 Os efeitos do ETC podem também afetar a qualidade dos oócitos levando a
14 variações estacionais no sucesso dos sistemas de produção de embriões *in vitro*. Um queda
15 nas taxas de desenvolvimento embrionário durante o verão foram reportadas em
16 Louisiana (ROCHA et al., 1998) e Wisconsin (RUTLEDGE et al., 1999). Ron et al.
17 (1984) e Roth et al. (2002) demonstraram que as taxas de concepção em vacas leiteiras
18 permaneciam baixas, mesmo quando os animais não estavam mais sendo expostos ao
19 estresse térmico-calórico.

20 Estudos têm mostrados que as vacas necessitam ser resfriadas durante todo o verão, da
21 forma mais eficiente possível, na esperança de se alcançarem melhores taxas de fertilidade.
22 Atualmente, essas taxas se mantêm baixas durante o verão e os tratamentos hormonais são limitados
23 (ROTH e HANSEN, 2005; JU et al., 2005).

24

25

1 **2.6 Apoptose celular**

2 A morte celular é definida como a perda irreversível da estrutura e das funções
3 vitais. Ela pode ocorrer por dois processos morfológicos distintos: necrose ou ancose e
4 apoptose. Sabe-se atualmente que os dois fenômenos podem contribuir para a morte
5 celular em CCOs e embriões, no entanto a morte celular por apoptose aparece com
6 maior frequência, principalmente nos blastômeros embrionários (PAULA-LOPES e
7 HANSEN, 2002a). A opção da célula por uma dessas formas de morte pode ser
8 influenciada pelo seu estado energético como reserva de ATP (WYLLIE et al., 1980).

9 A palavra apoptose (do grego *apo* = separação, *ptôsis* = queda) foi designada em
10 analogia ao fenômeno natural das folhas caírem das árvores ou das pétalas caírem das
11 flores e foi adotada pela primeira vez na década de 70 (KERR et al., 1972 apud TILLY,
12 1996). A apoptose, conhecida também como a morte celular programada (MCP), é um
13 processo ativo caracterizado pela autodigestão controlada dos constituintes celulares,
14 devido à ativação de proteases intracelulares. A ativação dessas proteases compromete a
15 integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular sem
16 que haja extravasamento do conteúdo celular interno para o meio externo (MATWEE et
17 al., 2000; BETTS e KING, 2001; PAROLIN e REASON, 2001). Há controvérsias na
18 utilização de apoptose e de MCP como sinônimos ou termos permutáveis (MAJNO e
19 JORIS, 1995). O termo apoptose define os mecanismos e processos envolvidos antes,
20 durante e depois da morte celular, como estímulos externos, morte celular propriamente
21 dita e absorção dos corpos apoptóticos por células vizinhas. Já o uso da terminologia
22 MCP surgiu em 1964 e envolve apenas os mecanismos morfológicos e bioquímicos
23 específicos que a célula desencadeia para induzir a sua morte (LOCKSHIN e
24 WILLIAMS, 1964; SAUNDERS, 1966; TILLY, 1996).

1 Muitos estudos indicam que a apoptose tem um papel importante durante os
2 processos fisiológicos dos organismos multicelulares, principalmente na embriogênese e
3 nas metamorfoses (LOCKSHIN e ZACHERI, 2001; GEWIES, 2003) com intuito de
4 remover células lesadas, infectadas, senescentes ou que simplesmente perderam a
5 função para o organismo, sem alteração do microambiente celular e livre de inflamação
6 (TILLY, 1996). As células que iniciam esse processo diminuem o volume
7 citoplasmático mantendo suas organelas intactas. Em resposta à contração do volume
8 citoplasmático, a membrana celular forma vesículas, denominadas corpúsculos
9 apoptóticos, que contem fragmentos do núcleo e algumas organelas. Esses corpúsculos
10 apoptóticos são rapidamente reconhecidos e englobados por fagócitos e/ou células
11 adjacentes, onde são degradados e reciclados (KERR et al., 1994; MATWEE et al.,
12 2000; BETTS e KING, 2001;).

13 Na porção interna da bicamada lipídica da membrana celular existe um
14 fosfolipídio da membrana, a fosfatidilserina (PS). Durante o processo da apoptose, esse
15 lipídio se expõe na porção externa da membrana, servindo como sinalizador para que as
16 células fagocitárias das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o
17 processo de apoptose (FADOK et al., 1992; REUTELINGSPERGER e VAN
18 HEERDE, 1997). Martin et al. (1995), constataram que a exteriorização da PS em
19 algumas variedades de células murinas e humanas é um evento adiantado e difuso no
20 processo de apoptose e que outros eventos do processo de MCP antecedem a
21 translocação da PS.

22 No início do processo apoptótico o núcleo torna-se picnótico e entra em colapso
23 e a cromatina vai se condensando nas porções adjacentes à membrana nuclear até
24 fragmentar-se. O DNA cromossômico sofre degeneração catalisada por endoenzimas
25 Ca^+/Mg^+ dependentes, as DNAses (WYLLIE et al., 1980; KERR et al., 1994). Essas

1 enzimas proteolíticas ativam as mediadoras da fragmentação internucleossomal do
2 DNA, bem como a lise de substratos específicos de proteínas que determinam a
3 integridade e a forma do citoplasma (SARASTE e PULKKI, 2000). Estas DNAses
4 endógenas cortam as regiões internucleossomais em fragmentos de 180 à 200 pares de
5 bases (pb) expondo a extremidade 3' da fita de DNA (WYLLIE et al., 1980; ALNEMRI
6 e LITWACK, 1990; DIDENKO e HORNSBY, 1996).

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

14 A indução da apoptose ocorre de maneira diferente dependendo do tipo de célula
15 e o estágio que esta se encontra. Entretanto, depois de desencadeado esse mecanismo,
16 os caminhos percorridos por todas as células são comuns, sendo um processo
17 irreversível após o início da ativação das caspases efetoras (caspases 3 e 8) (CRYNS e
18 YUAN, 1998).

19 Existem várias famílias de genes envolvidas nesse processo, uma dessas famílias
20 é a do gene BCL-2 (*B cell leukemia/lymphoma 2*), que pode estar presente no citosol bem
21 como em organelas como as mitocôndrias. O primeiro integrante desta família, o BCL-2
22 proto-oncogênico, foi descoberto pela transformação cromossômica t (14/18) de células
23 linfocitárias B de humanos (WYLLIE et al., 1980; HOCKENBERY et al., 1990;
24 OHMORI et al., 1993). Esta família de proteínas é composta por antagonistas da morte
25 (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MVL-1) e agonistas da morte (BAX, BKA, BAD, BID,

1 BIK, BCL-X_S) e outros (GROSS et al., 1999). Estas proteínas compartilham estruturas
2 homologas dos domínios BH1, 2, 3 e 4, embora nem todos os membros possuam todos
3 os domínios. Os domínios BH1 e BH2 dos antagonistas são necessários para
4 heterodimerizar com os agonistas da morte e, inversamente, o domínio BH3 dos
5 agonistas da morte é requerido para que ocorra a heterodimerização com os antagonistas
6 da morte para promover a morte celular (YIN et al., 1994; GROSS et al., 1999).

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

13 As proteínas da família BCL-2 podem estar inseridas na membrana mitocondrial
14 na forma de dímeros ou polímeros e sua estrutura quaternária está diretamente
15 relacionada com seu poder de inibir ou ativar a apoptose (KROEMER, 1997). A
16 proteína BAX é um membro pró-apoptótico da família da BCL-2 que, na ausência de
17 estímulos apoptóticos, encontra-se predominantemente solúvel no citosol. Por outro
18 lado, na presença de estímulos apoptóticos, ocorre a transformação dessa proteína do
19 citosol para as mitocôndrias e sua inserção nas membranas mitocondriais (WOLTER et
20 al., 1997; ZHANG et al., 1998). Os mecanismos pelos quais a BAX é inserida nessas
21 membranas ainda não estão elucidados, mas tal evento pode estar associado à formação
22 do poro transitório de permeabilidade. Por este poro, ocorre a liberação do Ca²⁺
23 citosólico (SMAILI et al., 2003). Não se sabe se uma elevação de Ca²⁺ citosólico serve
24 de sinal para a transformação da BAX e para a amplificação do sinal apoptótico na
25 presença de um determinado estímulo. Além disso, a propagação do sinal do Ca²⁺ entre

1 células pode indicar que os aumentos de Ca^{2+} citosólico são importantes para
2 transmissão dos sinais apoptóticos entre diferentes células (BAYSAL et al., 1994;
3 CASTILHO et al., 1998; GUNTER et al., 1998).

4 As caspases, cisteíno proteases homólogas ao ced-3 do *C. elegans*, exercem
5 importante papel na rede sinalizadora da apoptose, as quais são ativadas em cascatas
6 (BRATTON et al., 2000). O nome caspase originou-se de duas características
7 estruturais das proteases: o “c” é uma referência a cisteíno-protease e o “aspase” refere-
8 se à habilidade da molécula clivar logo após o ácido aspártico. Foram identificados 14
9 tipos de caspases nos mamíferos. A primeira enzima dessa família descrita em
10 mamíferos foi a ICE (*interleukin-1 β converting enzyme*), hoje caspase-1 (DENAULT e
11 SALVESEN, 2002).

12 A subdivisão das caspases foi baseada na análise filogenética, na especificidade
13 de seu substrato e no tamanho de seu pró-domínio. As caspases iniciadoras (8 e 9)
14 contêm pró-domínios longos que permitem interagir com as proteínas adaptadoras
15 específicas tendo a função de ativar diretamente as caspases efetoras (MUZIO et al.,
16 1998; BRATTON et al., 2000). Já as caspases efetoras (3, 6 e 7) possuem pró-domínios
17 curtos e sua ação ocorre pela clivagem de proteínas estruturais e regulatórias como a
18 DFF45/ICAD, as citoqueratinas, as gelsolinas, as lamininas e as actinas
19 (KOTHAKOTA et al., 1997; KWIATKOWSKI, 1999).

20 Ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outra, em sequência, até gerar uma
21 caspase efetora, que destrói proteínas essenciais da célula ou proteínas que protegem a
22 célula da apoptose e ativa proteínas tóxicas (THORNBERRY et al., 1997;
23 NICHOLSON, 1999). As caspases estão presentes no citoplasma sob forma de pró-
24 enzimas inativas, tornando-se ativas, após clivagem proteolítica à altura do ácido
25 aspártico (THOMPSON, 1999).

1 Várias proteínas são apontadas como “alvos” das caspases, mas ainda não foi
2 estabelecida uma relação direta entre o corte dessas proteínas e a morte celular. A
3 caspase 3 cliva uma proteína denominada ICAD (*Inhibitor of caspase-activated DNase*)
4 normalmente ligada a uma endonuclease (CAD) no citoplasma, ativando essa enzima,
5 que entra no núcleo e inicia a fragmentação do DNA (BRATTON et al., 2000). Outra
6 relação direta já identificada é a fragmentação, também pela caspase 3, da gelsolina,
7 proteína ligada aos filamentos de actina. Essa fragmentação danifica os filamentos e a
8 célula perde sua forma, o que leva a apoptose (KOYA et al., 2000).

9 Alguns membros, tais como a caspase 8, ocupam posição proximal na cascata
10 proteolítica e agem como reguladores e iniciadores, enquanto outros como a caspases 3,
11 são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular (PATEL e GORES,
12 1998).

13 As caspases têm substratos bem restritos, o que lhes assegura um processo de
14 seletividade e especificidade no processo de proteólise. Tais substratos incluem
15 proteínas envolvidas no reparo do DNA, no ciclo celular, na sinalização de transdução e
16 na manutenção da integridade da estrutura celular, impedindo o reparo do citoesqueleto
17 e do núcleo, levando à desestruturação da célula (TILLY, 1996; THOMPSON, 1999).

18 A apoptose pode ser deflagrada por meio de receptores da morte presentes na
19 superfície celular, que são ativados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos.
20 Entre esses receptores, um dos mais estudados e melhor caracterizado é o fator de
21 necrose tumoral receptor (FAZ) (CD95 ou APO-1) (HENGARTNER, 2000; GREEN e
22 EVAN, 2002). Além dos receptores da morte, a apoptose também pode ser deflagrada
23 por sinais de estresse intracelular, alterações nas vias metabólicas, drogas, toxinas ou
24 privação dos fatores de crescimento. Na presença de sinais de estresse intracelular
25 ocorre a transformação de proteínas pró-apoptóticas (BAX, BID, etc) do citosol para a

1 mitocôndria. A translocação das proteínas pró-apoptóticas para a mitocôndria resulta na
2 liberação para o citosol do citocromo-c, presente no espaço existente entre a membrana
3 mitocondrial externa e interna (GROSS et al., 1999; HENGARTNER, 2000; SMAILI et
4 al., 2003).

5 No citosol, o citocromo-c forma um complexo com o fator ativador da apoptose
6 1, o apoptossoma (do inglês *apoptosis-activating factor 1, apaf-1*), levando à ativação
7 da caspase 9, que ativa caspases efetoras. Portanto, a ativação das caspases pode ser
8 desencadeada via receptores da morte ou via disfunção mitocondrial, com liberação do
9 citocromo-c (HENGARTNER, 2000; GREEN e EVAN, 2002).

10 Durante a vida reprodutiva da fêmea, a maioria dos folículos ovarianos torna-se
11 atrésico e seu respectivo oócito se degenera (TAKASE et al., 1995; HAFEZ e HAFEZ,
12 2000; YANG e RAJAMAHENDRAN, 2002). Embora os mecanismos envolvidos neste
13 processo de degeneração ainda não estejam muito bem elucidados, é provável que no
14 oócito este processo ocorra por MCP (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2002).

15 Um estudo realizado por Yang e Rajamahendran (2002) constatou que CCOs de
16 qualidade morfológica inferior têm a maioria de seus oócitos com anomalias
17 morfológicas incluindo a fragmentação do *ooplasma* e das CC, características estas
18 típicas de células submetidas ao processo de morte celular por apoptose (TILLY, 1996).
19 A fragmentação do DNA dos oócitos associadas a apoptose pode ser uma das razões
20 para a baixa qualidade dos oócitos (FUJINO et al. 1996).

21 Nas espécies mamíferas, as perdas embrionárias podem ocorrer em todas as
22 fases da gestação (DISKIN e SREENAN, 1980; DUNNE et al., 2000). Há fortes
23 evidências que células embrionárias de mamíferos na fase de pré-implantação
24 submetem-se ao processo de apoptose (HARDY, 1997; BETTS e KING, 2001). As
25 características apoptóticas, incluindo fragmentação do DNA nuclear, são raramente

1 observadas antes da fase de compactação celular, já na fase de blastocisto, a presença de
2 apoptose é frequente em mamíferos como humanos (HARDY et al., 2001) e bovinos
3 (MATWEE et al., 2000).

4 Durante o desenvolvimento do embrião, muitas das células embrionárias que se
5 encontram em processo de apoptose já cumpriram a sua função e precisam ser excluídas
6 ou substituídas por células da mesma linhagem ou diferentes (SANDERS et al., 1997).
7 Os mecanismos utilizados pelo embrião para eliminar determinadas células ou
8 linhagens de células não estão bem definidos (HARDY, 1997).

9 Uma das alterações mais frequentes encontradas durante o desenvolvimento
10 inicial do embrião está relacionada com a fragmentação nuclear atribuída ao processo de
11 MCP, que ocorre principalmente nas células que formam o botão embrionário ou massa
12 celular interna (MCI). Acredita-se que o objetivo deste mecanismo seja eliminar
13 algumas dessas células que impedem o potencial de desenvolvimento do trofotoderma
14 e que possam ser letais para o embrião. Contudo, um número considerado mínimo de
15 células saudáveis da MCI é necessário para que o desenvolvimento prossiga (HARDY,
16 1997).

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

1 A maioria dos embriões possui blastômeros de diferentes tamanhos e muitas
2 células fragmentadas. Em embriões fragmentados, a alta incidência de cromatina
3 condensada com a degradação do DNA celular e o aparecimento de um grande número
4 de corpos apoptóticos leva, à inviabilidade no desenvolvimento do embrião quando em
5 processos iniciais do desenvolvimento, inclusive antes da formação do blastocele
6 (JURISICOVA et al., 1998).

7 Estudos recentes indicaram que a morte celular por apoptose é um mecanismo
8 importante responsável pela redução na competência oocitária induzida pelo estresse
9 térmico calórico (ETC). Nesses estudos, o bloqueio da apoptose resgatou a capacidade
10 de desenvolvimento de oócitos expostos a temperatura elevada (ROTH e HANSEN,
11 2004a). Recentemente, Roth e Hansen (2004a; 2005) demonstraram o papel da apoptose
12 oocitária induzida pelo ETC. A exposição de oócitos a este estresse térmico durante as
13 primeiras 12 horas de MIV aumentou a proporção de oócitos positivos para apoptose.
14 Nesses estudos, o bloqueio da apoptose oocitária com inibidor de caspases (z-DEVD-
15 fmk) (ROTH e HANSEN, 2004a) ou com esfingolípido (esfingosina-1-fosfato) (ROTH
16 e HANSEN, 2004b) resgatou os índices de clivagem e de desenvolvimento até o estágio
17 de blastocisto de oócitos expostos ao estresse térmico.

18 A determinação e caracterização do ETC em oócitos caprinos e ovinos são
19 fundamentais para a adoção de medidas que reduzam seus efeitos negativos na
20 competência oocitária em animais expostos a temperatura elevada.

21

22

23

24

25

26

27

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISTON, C.W.; HOWARTH, JR. B.; ULBERT, L. C. Embryonic mortality following culture in vitro of one-and two-cell rabbit egg at elevated temperature. **Journal Reproduction and Fertility**, v.9, p.337-341, 1965.

AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal Dairy Science**. v.85, p.390-396, 2002.

AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN; P. J. Factors affecting seasonal variation in 90 day non-return rate to first service in lactating Holstein cows in a hotclimate. **Journal Dairy Science**, v.82, p. 2611-2615, 1999.

ALNEMRI, E. S.; LITWACH, G. Activation of internucleosomal DNA cleavage in human CEM lymphocytes by glucocorticoid and novobiocin. Evidence for a non Ca²⁺ requiring mechanism(s). **Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.17323-17333, 1990.

ALVES, J.D.R. et al. High concentrations of FSH-p on the *in vitro* maturation of Bos indicus oocytes. **Ciência Rural** **31**, p. 645-649, 2001.

ARIYRATNA, H. B. S.; GUNAWARDANA, V. K. Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. **Small Ruminant Research**, v.26, p.123-139, 1997.

AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian eggs. **Australian Journal Science Research**, v.4, p.581-596, 1951.

AUSTIN, C.R. The 'capacitation' of mammalian sperm. **Nature**, v.170, p.326, 1952.

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.

- 1 BADINGA, L. et al. Effects of climatic and management factors on conception rate of
2 dairy cattle in subtropical environment. **Journal Dairy Science**. v.68, p.78-85, 1985.
3
- 4 BALAZS, B. Acclimatization to heat stressed environment and embryo production of donor
5 cows transported from Hungary to semiarid region of Brazil, 2004. 32p.
6 **Dissertation/Thesis** (PhD Program in Veterinary Science). Course of Veterinary Medicine,
7 Szent István University.
8
- 9 BAVISTER, B.D. Co-culture for embryo development: is it really necessary?
10 **Reproduction**, v.7, n.10, p.1339-1341, 1992.
11
- 12 BATT, P. A.; GARDNER, D. K.; CAMERON, A. W. Oxygen concentration and protein
13 source affect the development of preimplantation goat embryos *in vitro*. **Reproduction**
14 **Fertility and Development**, v.3, n.5, p.601-607, 1991.
15
- 16 BAYSAL, K. et al. Na⁺ de Ca²⁺ efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive
17 Ca²⁺/2Na⁺ exchanger. **American Journal of Physiology**, v.266, p.800-808, 1994.
18
- 19 BERG, U.; BREN, G. *In vitro* production of bovine blastocysts by *in vitro* maturation
20 and fertilization of oocytes and subsequent *in vitro* culture. **Zuchthygiene**, v.24, p.132-
21 139, 1989.
22
- 23 BERTHELOT, F.; TERQUI, M. Effects of oxygen, CO₂/pH and medium on the *in*
24 *vitro* development of individually culture porcine one- and two-cell embryos.
25 **Reproduction Nutrition Development**, v.36, n.3, p.241-251, 1996.
26
- 27 BETTERIDGE, K. J. et al. Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal
28 oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.
29
- 30 BETTS, D. H.; KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence.
31 **Theriogenology**, v.55, n.1, p.171-191, 2001.
32
33

- 1 BORMANN, C. L.; ONGERI, E. M.; KRISHER, R. L. The effect of vitamins during
2 maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential *in vitro*.
3 **Theriogenology**, v.59, n.6, p.1373-1380, 2003.
4
- 5 BORTOLOTTI, E.B. PDGF, retinol and insulin in the regulation of bovine oocyte nuclear
6 maturation and their consequent effect in the embryonic development. 2000. 55p.
7 **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em
8 Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria.
9
- 10 BRACKETT, B. G. et al. *In vitro* fertilization of cow ova. **Theriogenology**, v.9, n.1, p.89-
11 95, 1978.
12
- 13 BRACKETT, B. G. et al. Fertilization and early development of cow ova. **Biology of**
14 **Reproduction**, v.23, p.189-205, 1980.
15
- 16 BRACKETT, B. G. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow.
17 **Biology of Reproduction**, v.27, n.1, p.147-158, 1982.
18
- 19 BRACKETT, B. G. et al. Bovine twins resulting from *in vitro* fertilization.
20 **Theriogenology**, v.21, n.1, p.224-229, 1984.
21
- 22 BRACKETT, B. G.; YOUNIS, A. I.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Enhanced viability after
23 *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with light concentrations of
24 luteinizing hormone. **Fertility and Sterility**, v.52, n.2, p.319-324, 1989.
25
- 26 BRATTON, S. B. et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades. In death
27 receptor and stress-induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, v.256, p.27-33,
28 2000.
29
- 30 BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.; EPPIG, J. Interactions between somatic cell and
31 germ cell throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.43, p.543-547,
32 1990.
33

- 1 CAMOUS, S. et al. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early
2 bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. **Journal of Reproduction and**
3 **Fertility**, v. 72, n.2, p. 479-485, 1984.
4
- 5 CAROLAN, C. et al. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviductal
6 fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, n.6,
7 p.1115-1128, 1995.
8
- 9 CASTILHO, R. F. et al. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in
10 cultured cerebellar granule cells. **Journal of Neuroscience Research**, v.18, p.10277-
11 10286, 1998.
12
- 13 CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. **Nature**, v.184, p.466-467, 1959.
14
- 15 CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the Fallopian tubes.
16 **Nature**, v.168, p.697-698, 1951.
17
- 18 CHANG, S. H. et al. The effector phase of physiological cell death exclusively on the
19 posttranslational activation of resident components. **Experimental Cell Research**, v.277,
20 n.1, p.15-30, 2002.
21
- 22 COSCIONI, A.C. et al. Sperm function and production of bovine embryos in vitro after
23 swim-up with different calcium and caffeine concentration. **Animal Reproduction**
24 **Science**, n.67, v. 3, p. 59-67, Jul, 2001.
25
- 26 CRITSER, E.S. et al. Acquisition of developmental competence during maturation in
27 vitro. **Theriogenology**, v.25, p.125(Abstr), 1986.
28
- 29 CRYNS, V.; YUAN, J. Protease to die for. **Genes and Development**, v.12, n.11,
30 p.1551-1570. 1998.
31
- 32 CURTIS, S. E. **Environmental Management in Animal Agriculture**. Ames: Iowa
33 State University, 1983. 409p.
34

- 1 DEKEL, N. Spatial relationship of follicular cell in the control of meiosis. In:
2 HESELTINE, F.; FIRST, N. L. **Progress in Clinical and Biological Research**. Meiotic
3 inhibition: molecular control of meiosis. Alan R. Liss, Inc., New York, 1988, p.87-101.
4
- 5 DEKEL, N.; GALIANI, D.; BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed
6 oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development.
7 **Biology of Reproduction**, v.38, p.517-521, 1988.
8
- 9 DENAULT, J. B.; SALVESEN, G. S. Caspases: keys in the ignition of cell death.
10 **Chemical Reviews**, v.102, n.2, p.4489-4500, 2002.
11
- 12 DE SMEDT, V.; CROZET, N.; GALL, L. Morphological and functional changes
13 accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. **Journal**
14 **Experimental Zoology**, v.269, p.128-139, 1994.
15
- 16 DIDENKO, V. V.; HORNSBY, P. J. Presence of double-strand breaks with single-base
17 3'overhangs in cell undergoing apoptosis but nor necrosis. **Journal of Cell Biology**,
18 v.135, p.1369-1996.
19
- 20 DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef
21 heifers after artificial insemination. **Journal Reproduction and Fertility**, v.59, p.463-
22 468, 1980.
23
- 24 DOWNS, S. M. The maintenance of meiotic arrest arrest in mammalian oocytes. In:
25 BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. **Fertilization in Mammals**.
26 Noewell: Serono, p.5-16, 1990.
27
- 28 DOWNS, S. M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian
29 oocytes. **Theriogenology**, v.39, n.1, p.65-79, 1993.
30
- 31 DUMOULIN, J. C. et al. Effect of oxygen concentration on human *in vitro* fertilization
32 and embryo culture. **Human Reproduction**, v.14, n.2, p.465-466, 1999.
33

- 1 DUNLAP, S. E.; VINCENT, C. K. Influence of post breeding thermal stress on
2 conception rate in beef cattle. **Journal Animal Science**, v.32, p.1216-1218, 1971.
3
- 4 DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and fetal loss in beef
5 heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v.58,
6 p.39-44, 2000.
7
- 8 DUTT, R. H. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high
9 ambient temperature. **Journal Animal Science**. v.22, p.713-719, 1963.
10
- 11 EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic
12 resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal Dairy Science**.
13 v.76, p.2899-2905, 1993.
14
- 15 EALY, A. D. et al. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock
16 and use of antioxidants as thermoprotectants. **Journal Animal Science**, v.73, p.1401-1407,
17 1995.
18
- 19 EALY, A. D. et al. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of
20 maternal heat stress in cows. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.535-47, 2000.
21
- 22 ECKERT, J. et al. Exogenous protein affects development competence and metabolic
23 activity of bovine preimplantation embryo *in vitro*. **Reproduction, Fertility and**
24 **Development**, v.10, n.4, p.327-332, 1998.
25
- 26 EDWARDS, R. G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and
27 human ovarian oocytes. **Nature**, v.208, n.8, p.349-351, 1965.
28
- 29 EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and
30 preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**,
31 v.46, p.138-145, 1997.
32

- 1 EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein
2 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing
3 oocytes. **Biology of Reproduction**. v.55, p.340-346, 1996.
4
- 5 EDWARDS, L.J. et al. Modifications made to culture medium by bovine oviduct
6 epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development.
7 **Molecular Reproduction and Development**, v.46, n.2, p.146-154, 1997.
8
- 9 ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary.
10 Journal of animal Science, v.25, p.800-805, 1966. In: GONÇALVES, P. B. D.;
11 FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução**.
12 São Paulo: Livraria Varela, 2002. Cap. 11, p.227-260.
13
- 14 EPPIG, J. J. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins *in vivo* and
15 *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.23, p.545-552, 1980.
16
- 17 EPPIG, J. J.; WARD-BAILEY, P.; COLEMAN, D. L. Hypoxanthine and adenosine
18 in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte
19 meiotic arrest. **Biology of Reproduction**, v.33, p.1041-1049, 1985.
20
- 21 EPPIG, J. J. et al. Differential action of sulfated glycosaminoglycans on follicle
22 stimulating hormone-induced functions of *cumulus oophorus* isolated from mice.
23 **Biology of Reproduction**, v.27, p.399-406, 1982.
24
- 25 EYESTONE, W. H.; FRIST, N. L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst
26 stage with oviductal tissue or in conditioned medium. **Journal of Reproduction and**
27 **Fertility**, v.85, n.2, p.715-720, 1989.
28
- 29 EYESTONE, W.H.; JONES, J.M.; FIRST, N.L. Some factors affecting the efficacy of
30 oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. **Journal of**
31 **Reproduction and Fertility**, v. 92, n.1, p.59-64, 1991.
32

- 1 FADOK, V. A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the apoptotic lymphocytes
2 triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of Immunology**,
3 v.148, n.7, p.2207-2216, 1992.
4
- 5 FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus
6 monkeys, hamster and rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, n.2,
7 p.673-679, 1993.
8
- 9 FOULADI NASHTA, A. A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K. H. S.
10 Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*:
11 a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biology of**
12 **Reproduction**, v.59, p.255-262, 1998.
13
- 14 FUJINO, Y. et al. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. **Human**
15 **Reproduction**, v.11, n.7, p.1480-14-83, 1996.
16
- 17 FUKUI, Y. Effect of sera and the steroid hormone on development of bovine oocytes
18 matured and fertilized in vitro and co-cultured oviduct epithelial cells. **Journal and**
19 **Animal Science**, v.23, p.1318-1323, 1989.
20
- 21 FUKUI, Y.; SAKUMA, Y. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to
22 ovarian activity, follicular size and the presence or absence of *cumulus* cells. **Biology of**
23 **Reproduction**, v. 22, p. 669-673, 1980.
24
- 25 FULKA, J. JR.; PAVLOK, A.; FULKA, J. *In vitro* fertilization of zona-free bovine
26 oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.64, n.2, p.495-
27 499, 1982.
28
- 29 GALL, L. et al. Meiotically incompetent and competent goat oocytes: timing of
30 nuclear events and protein phosphorylation. **Theriogenology**, v.46, n.4, p.825-835,
31 1996.
32

- 1 GANDHI, A. P. et al. A single medium supports development of bovine embryos
2 throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, v.15, n.2,
3 p.395-401, 2000.
- 4
- 5 GANDOLFI, F. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing
6 embryonic development from zygote blastocyst. **Theriogenology**, v.41, n.1, p.95-100,
7 1994.
- 8
- 9 GANDOLFI, F.; MOOR, R.M. Stimulation of early embryonic development in the
10 sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. **Jornal of Reproduction and**
11 **Fertility**, v. 81, n.1, p. 23-28, 1987.
- 12
- 13 GANDOLFI, F. Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells. **Microscopy**
14 **Resarch Technology**, v. 32, n.1, p.1-12, 1995.
- 15
- 16 GARDNER, D. K. et al. Enhanced rates of cleavage and development for sheep
17 zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic
18 cell: amino acids, vitamins and culturing embryos in group stimulate development.
19 **Biology of Reproduction**, v.50, p.390-400, 1994.
- 20
- 21 GARDNER, D.; LANE, M. Amino acids and ammonia regulate mouse embryo
22 development in culture. **Biology of Reproduction**, v.48, p.377-385, 1993.
- 23
- 24 GARRIS, D. R.; MITCHELL, J. A. Intrauterine oxygen tension during the estrous
25 cycle in the guinea pig: relation to uterine blood volume and plasma estrogen and
26 progesterone levels. **Biology of Reproduction**, v.21, n.1, p.149-159, 1979.
- 27
- 28 GEWIES, A. Introduction to apoptosis. **ApoReview**, p.1-26, 2003. Disponível em:
29 <<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>>. Acessado em 14 de outubro
30 de 2009.
- 31
- 32 GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B.
33 D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (2^a ed.), **Biotécnicas aplicadas à**
34 **reprodução animal**, Editora Roca, São Paulo, p.261-292, 2008.

- 1 GONZALES, C. I. M.; OLIVEIRA, V. S. Técnicas para incrementar a eficiência
2 reprodutiva de caprinos e ovinos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE
3 ZOOTECNIA, 18., 1991, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: [s.n.] 1991. p. 71-102.
4
- 5 GOTO, K. et al. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos
6 derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. **Journal of**
7 **Reproduction and Fertility**. v. 83, n. 2, p. 753-758, 1988.
8
- 9 GREEN, D. R.; EVAN, G. I. A matter of life and death. **Cancer Cell**, v.1, n.1, p.19-30,
10 2002.
11
- 12 GROSS, A.; MCDONNELL, J. M.; KORSSMEYER, S. J. BCL-2 family members and
13 the mitochondria in apoptosis. **Genes and Development**, v.13, p.1899-1911, 1999.
14
- 15 GRUNERT, E. **Infertilidad en la vaca**. Montevideo, Uruguay. (10^a ed.) Hemisferio Sur,
16 1989, 475p.
17
- 18 GUNTER, T. E. et al. The Ca²⁺ transport mechanisms of mitochondria and Ca²⁺ uptake
19 physiological-type Ca²⁺ transients. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1366, p.5-15, 1998.
20
- 21 GUSMÃO, A. L. et al. Colheita, avaliação e criopreservação de embriões caprinos.
22 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 115-119,
23 2003.
24
- 25 GUZELOGLU, A. et al. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of
26 dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Animal Reproduction**
27 **Science**, v.66, p.15-34, 2001.
28
- 29 HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. (6^a ed.) Editora Manole. São Paulo: SP, 1994,
30 654p.
31
- 32 HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. (7^o ed.) Lea and
33 Febiger. Philadelphia: 2000. 509p.
34

- 1 HANDROW, R.R.; LENZ, R.W.; AX, R.L. Structural comparisons among
2 glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa.
3 **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.107, n.4, p.1326-32, 1982.
4
- 5 HANSEN, P. J.; THATCHER, W. W.; EALY, A. D. In: Large Dairy Herd
6 Management. In: Van H.H.; Wilcox, C. J. **Large Dairy Herd Management**.
7 Champaign, p. 116, 1992.
8
- 9 HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human**
10 **Reproduction**, v.3, n.10, p.919-925, 1997.
11
- 12 HARDY, K. et al. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human
13 preimplantation embryo development. **Proceedings of the National Academy of**
14 **Sciences**, v.98, n.4, p.1655-1660, 2001.
15
- 16 HASHIMOTO, S. et al. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for
17 supporting the subsequent development of bovine *cumulus*-oocyte complexes.
18 **Molecular Reproduction and Development**, v.57, n.4, p.353-360, 2000.
19
- 20 HASLER J.F. Current status and potential of embryo transfer and reproductive
21 technology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science** , v. 75, n.10, p. 2857-79, 1992.
22
- 23 HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776,
24 2000.
25
- 26 HERNÁNDEZ-CERÓN, J. et al. Differences in heat tolerance between
27 preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. **Journal**
28 **Dairy Science**, v.87, p. 53-58, 2004.
29
- 30 HEYMAN, Y. et al. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved
31 development using coculture with trophoblastic vesicles. **Theriogenology**, v. 27, p.59-
32 68, 1987.
33

- 1 HOWELL, J. L. et al. Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows
2 during spring and summer. **Journal Dairy Science**, v. 77, p. 735-739, 1994.
3
- 4 HOCKENBERY, D. et al. BCL-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks
5 programmed cell death. **Nature**, v.348, p.334-336, 1990.
6
- 7 HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation
8 and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.35-47, 1989.
9
- 10 HYTTEL, P. Bovine *cumulus*-oocyte desconnection *in vitro*. **Anatomy and Embryology**,
11 v.176, p.41-44, 1987.
12
- 13 HYTTEL, P. Oocyte maturation and fertilization in cattle – ultrastructural aspects.
14 **Copenhagen; A/S Carl F. Moertensen**, 1988.
15
- 16 HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle.
17 **Theriogenology**, v.47, n.1, p.23-32, 1997.
18
- 19 IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática. Disponível em:
20 <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/>>. Acesso em: 08 nov. 2009.
21
- 22 IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of
23 cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**,
24 v.50, n.1, p.119-121, 1977.
25
- 26 IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M. T. Effect of culture media on
27 embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. **Theriogenology**, v.52, n.4,
28 p.847-861, 1999.
29
- 30 JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Reproductive failure in females. In: HAFEZ, E. S.
31 E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animal**. 7^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams
32 & Wilkins, 2000. Cap. 17. p. 261-278.
33

- 1 JU, J. C.; TSENG J. K. Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine
2 oocytes under hyperthermia. **Molecular Reproduction Development**, v.68, n.1, p.125-
3 133, 2004.
- 4
- 5 JU, J. et al. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle
6 configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.64, p.1677-1689, 2005.
- 7
- 8 JURISICOVA, A. et al. Expression and regulation of genes associatd with cell death during
9 murine preimplantation embyo development. **Molecular Reproduction Development**,
10 v.51, n.3, p.243-253, 1998.
- 11
- 12 KEEFER, C.L.; BRACKETT, B.G.; TROOP, C.G. Bovine fertilization after in vitro
13 insemination with motile sperm fraction. **Theriogenology**, v.23, p.198 (Abstr), 1985.
- 14
- 15 KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. R.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological
16 phenomenon with raging implication in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26,
17 p.239-257, 1972.
- 18
- 19 KERR, J. F. R.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis: its significante in
20 cancer and canser therapy. **Cancer**, v.73, p.2013-2026, 1994.
- 21
- 22 KESKINTEPE, L.; BURNLEY, C.A.; BRACKETT, B. G. Production of viable bovine
23 blastocysts in defined in vitro conditions. **Biology of Reproduction**, v.52, n.6, p.1410-
24 7, 1995.
- 25
- 26 KROEMER, G. The proto-oncogene BCL-2 and its role in regulating apoptosis.
27 **Nature Medicine**, v.3, p.614-620, 1997.
- 28
- 29 KIM, L.H. et al. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine
30 oocytes. **Theriogenology**, v.52, n.3, p.537-547, 1999.
- 31
- 32 KING, W. A. et al. Meiosis in bovine matures *in vitro* and *in vivo*. **ACTA**
33 **Veterinarian Scandinavia**, v.27, p.267-279, 1986.
- 34

- 1 KOTHAKOTA, S. et al. Caspase 3-generated fragment of gelsolin: effectors of
2 morphological change in apoptosis. **Science**, v.294-298, 1997.
- 3
- 4 KOYA, R. C. et al. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane
5 potential loss and cytochrome c release. **Journal of Biological Chemistry**, v.275,
6 n.20, p.15343-15349, 2000.
- 7
- 8 KRININGER, C. E. et al. Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat
9 shock on growth of preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and**
10 **Development**, v.63, p.335-340, 2002.
- 11
- 12 KRISHER, R. L.; LANE, M.; BAVISTER, B. D. Development competence and
13 metabolism of bovine embryos culture in semi-defined and culture media. **Biology of**
14 **Reproduction**, v.60, p.1345-1352, 1999.
- 15
- 16 KWIATKOWSKI, D. J. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer.
17 **Nature Cell Biology**, v.11, p.103-108, 1999.
- 18
- 19 LAMBERT, R. D. et al. *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vivo* and
20 collected at laparoscopy. **Theriogenology**, v.25, n.1, p.117-133, 1986.
- 21
- 22 LEE, C. N.; AX, R. L. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the
23 female bovine reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.9, p.2006-9, 1984.
- 24
- 25 LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRISTSER, E. S.; FIRST, N. L. Effects of fetal calf
26 serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and
27 hamster *cumulus*-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, v.35, n.3, p.850-857,
28 1986.
- 29
- 30 LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. et al. Development potential of bovine oocytes
31 matured *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.36, n.2, p.376-383, 1987.
- 32
- 33 LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. et al. *In vitro* maturation and fertilization of bovine
34 oocyte. **Theriogenology**, v.31, n.1, p.61-74, 1989.

- 1
2 LI, J.; FOOTE, R. H. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium
3 with one to twenty per cent oxygen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98,
4 n.1, p.163-167, 1993.
5
- 6 LIMA, P.F. Use of retinoids and growth factor to *in vitro* production of bovine
7 embryos. Recife: **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Programa de Pós-
8 graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife,
9 2004.
10
- 11 LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death. II. Endocrine
12 potentiation of the breakdown of the intersegment muscles of silkmoths. **Journal of**
13 **Insect Physiology**, v.10, p.643-649, 1964.
14
- 15 LOCKSHIN, R. A.; ZACHERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of
16 the theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, n.7, p.545-550, 2001.
17
- 18 LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M. P. Effect of protein
19 supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygote in
20 synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**,
21 v.51, n.8, p.1565-1576, 1999.
22
- 23 LONG, C.R., DAMIANI, P., PINTO-CORREIA, C., MacLean, R.A., Duby, R.T. and
24 Robl, J.M. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes
25 matured in vitro under various conditions of fertilization. **Journal of Reproduction**
26 **and Fertility**, v.102, p.361-369, 1994.
27
- 28 LU, K. H. et al. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in*
29 *vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. **Veterinary Record**, v.121, n.11, p.259-260,
30 1987.
31
- 32 LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo
33 production in vitro by glutathione-containing media. **Molecular Reproduction and**
34 **Development**, v.43, p.437-443, 1996.

- 1 MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death.
2 **American Journal of Pathology**, v.146, n.1, p.3-15, 1995.
3
- 4 MAJUMBAR, A.; MOGHA, I. V.; ANSARJ, M. R. Successful superovulaqtion in
5 prepubertal Barbari goats. **Indian Journal Sciences**, New Delhi, v. 60, n. 11, p. 1304-
6 1306, 1990.
7
- 8 MARCHAL, R. et al. Effects of cell cycle dependent kinase inhibitor on nuclear and
9 cytoplasmic maturation of porcine oocytes. **Molecular Reproduction and**
10 **Development**, v.60, p.65-75, 2001.
11
- 12 MARQUANT-LE GUIENNE, B. et al. *In vitro* culture of bovine egg fertilized either *in*
13 *vivo* or *in vitro*. **Reproduction Nutrition Development**, v.29, p.559-568, 1989.
14
- 15 MARQUANT-LE GUIENNE, B. et al. Evolution of bull semen fertility by homologous
16 *in vitro* fertilization test. **Reproduction Nutrition Development**, v.30, p.259-266,
17 1990.
18
- 19 MARTIN, S. J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a
20 general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by
21 overexpression of Bcl-2 and Abl. **Journal Experiment Medicine**. v.182, p.1545-1556,
22 1995.
23
- 24 MARTINO, A. et al. Meiotic competence prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**,
25 v.41, n.4, p.969-980, 1994.
26
- 27 MAAS, D. H.; STOREY, B.T.; MASTROIANNI, L JR. Oxygen tension in the oviduct
28 of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Fertility and Sterility**, v.27, n.11, p.1312-7,
29 1976.
30
- 31 MASTROIANNI, L.; JONES, R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube.
32 **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39, p.99-102, 1965.
33

- 1 MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo.
2 **Zygote**, v.8, p.57-68, 2000.
3
- 4 MENEZO, L.; STRINGFELLOW, D.; BIELANSKI, A. Thoughts on risk management
5 for *in vitro* production of bovine embryos. **Human Reproduction**, v.13, n.4, p.256-265,
6 1998.
7
- 8 MERMILLOD, P.; TOMANEK, R.; MEIJER, L. High development competence of
9 cattle oocytes maintained at the vesicle stage for 24 hours in culture by specific
10 inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.55,
11 p.89-95, 2000.
12
- 13 MILLER, P.J.; GLIEDT, D.L.; LESTER, T.D. et al. Addition of bovine oviductal
14 epithelial cell (BOEC) and/or penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) to
15 bovine *in vitro* fertilization (IVF) medium increases the subsequent embryo cleavage
16 rate. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, 1992.
17
- 18 MILOVANOV, C.; SIRARD, M. A. Manipulation of chromosome condensation by
19 protein synthesis inhibitors and cyclic maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**,
20 v.41, n.4, p.819-827, 1994.
21
- 22 MITALIPOV, S. M. NUSSER, K. F.; WOLF, D. P. Parthenogenetic activation of
23 *rhesus monkey* oocytes and reconstructed embryos. **Biology of Reproduction**, v.65,
24 p.253-259, 2001.
25
- 26 MITCHELL, J. A.; YOCHIM, J. M. Measurement of intrauterine oxygen tension in the
27 rat and its regulation by ovarian steroid hormones. **Endocrinology**, v.83, n.4, p.691-
28 700, 1968.
29
- 30 MOGAS, T.; PALOMO M.J.; IZQUIERDO, M.D., et al. Developmental capacity of *in vitro*
31 matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats
32 **Theriogenology** 47 (6): 1189-1203 apr 15, 1997.
33

- 1 MONTAGNER, M.M. Production of bovine embryo in vitro using frozen-thawed
2 media, Hepes and retinol. 1999. 68p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária)
3 - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa
4 Maria.
5
- 6 MOCHLY-ROSEN, D. Localization of protein kinase by anchoring proteins: A theme
7 in signal transduction. **Science**, v.268, p.247-251, 1995.
8
- 9 MORITA, Y.; TILLY J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass.
10 **Development Biology**, v.213, p.1-17, 1999.
11
- 12 MUZIO, M. et al. An induced proximity model for caspase-8 activation. **Journal of**
13 **Biological Chemistry**, v.273, p.2926-2930, 1998.
14
- 15 NÂÃS, I. A. **Princípios de Conforto Térmico na Produção Animal**. São Paulo: SP.
16 (ed.) Editora Ícone. 1989. 340p.
17
- 18 NICHOLSON, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during
19 apoptotic cell death. **Cell Death and Differentiation**, v.6, p.1028-1042, 1999.
20
- 21 NIWA, K.; PARK, C.K.; OKUDA, K. Penetration in vitro of bovine oocytes during
22 maturation by frozen-thawed spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**,
23 v.91, n.1, p.329-36, 1991.
24
- 25 NUMABE, T. et al. Pentoxifylline improves *in vitro* fertilization and subsequent
26 development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 225-233, 2001.
27
- 28 OHMORI, T. et al. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents
29 (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by BCL-2. **Biochemical and Biophysical Research**
30 **Communications**, v.192, n.1, p.30-36, 1993.
31
- 32 OLIVEIRA, M. A. L. et al. Nova perspectiva da fertilização de embriões bovinos. In:
33 CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, VIII, 1991, Belo

- 1 Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991, v.2,
2 p.303.
3
- 4 OLIVEIRA, M. A. L. et al. Co-culture of *Mus musculus* embryos with monolayers of
5 primary and continuous lineages in a system without external CO₂ flow. **Ciência Rural**,
6 v.27, n.1, p.123-127, 1997.
7
- 8 OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 heterodimerizes *in vivo*
9 with a conserved homolog, BAX, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v.74, n.4,
10 p.609-619. 1993.
11
- 12 ONGERI, E. M. et al. Development of goat embryos after *in vitro* fertilization and
13 parthenogenetic activation by different methods. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1933-1945,
14 2001.
15
- 16 OZAWA, M. et al. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities
17 induced by heat stress during follicular recruitment in goats. **Reproduction**, v.129,
18 p.621-630, 2005.
19
- 20 PALMA, G.A.; MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I)
21 at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*.
22 **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, p.347-353, 1997.
23
- 24 PARK, Y. S.; LIN, Y. C. Effect of epidermal growth factor (EGF) and defined simples
25 media on *in vitro* bovine oocyte maturation and earls embryonic development.
26 **Theriogenology**, v.39, n.2, p.475-484, 1993.
27
- 28 PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in
29 hepatobiliary diseases. **Aquiver Gastroenterology**, v.38, n.2, p.38-44, 2001.
30
- 31 PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm
32 separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and
33 early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, n.6, p.859-869, 1995.
34

- 1 PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. In vitro fertilization of bovine
2 oocytes using heparin-treated and swim-up separated frozen thawed bovine semen is
3 repeatable and results in high frequencies of fertilization. **Theriogenology**, v.35, p.234
4 (Abstr), 1985.
5
- 6 PARRISH, J. J. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen.
7 **Theriogenology**, v.25, n.1, p.591-600, 1986.
8
- 9 PATEL, T.; GORES, G. J. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing
10 to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. **Liver**
11 **Transplant Surgery**, v.4, p.42-50,1998.
12
- 13 PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine
14 preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochem Biophys**
15 **Research Communicator**, v.295, p.37-42, 2002a.
16
- 17 PAWSHE, C. H. et al. Comparison of various maturation treatments on *in vitro*
18 maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers.
19 **Theriogenology**, v.46, n.4, p.971-982, 1996.
20
- 21 PAYTON, R. R. et al. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from
22 antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.71,
23 p.1303-1308, 2004.
24
- 25 PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo*
26 and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**,
27 v.62, p.665-675, 1935.
28
- 29 PINYPUMMINTER, T.; BAVISTER, B. D. *In vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine
30 oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture
31 media. **Biology of Reproduction**, v.45, p.736-742, 1991.
32

- 1 PINYPUMMINTER, T.; BAVISTER, B. D. Effects of amino acids on development *in*
2 *vitro* of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. **Reproduction, Fertility and**
3 **Development**, v.8, n.5, p.835-841, 1996.
- 4
- 5 PRATHER, R. S.; FIRST, N. L. A. A review of early mouse embryogenesis and its
6 application to domestic species. **Journal of Animal Science**, v.66, p.2626-2635, 1988.
- 7
- 8 PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Embryonic development in
9 superovulated dairy cattle exposed to elevated temperatures between days 1 to 7 post
10 insemination. **Theriogenology**, v.30, p.195-209, 1988.
- 11
- 12 PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Influence of summer heat stress on
13 pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial
14 insemination. **Theriogenology**, v.31, p.765-778, 1989a.
- 15
- 16 PUTNEY, D. J. et al. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to
17 elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. **Animal**
18 **Reproduction Science**, v.19, p.37-51, 1989b.
- 19
- 20 REUTELINGSPERGER, C. P.; VAN HEERDE, W. L. Annexin V, the regulator of
21 phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. **Cell**
22 **Molecular Life Science**, v.53, n.6, p.527-532, 1997.
- 23
- 24 REXROAD JR, C.E.; POWELL, A.M. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in
25 medium 199. **Journal of Animal Science**, v.66, n. 4, p.947-953, 1988.
- 26
- 27 RHO, G. J.; HAHNEL, C.; BETTERIDGE, K. J. Comparatons of oocytes maturation tims
28 and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat
29 embryo *in vitro*. **Theriogenology**, v.56, n.3, p.503-516, 2001.
- 30
- 31 RIEGER, D. et al. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal
32 cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos.
33 **Journal of Reproduction and Fertility**, v.105, n.1, p.91-98, 1995.
- 34

- 1 RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after
2 exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v.121, p.107-
3 115, 2001.
- 4
- 5 ROCHA, A. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in
6 *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 657-665, 1998.
- 7
- 8 RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E. et al. Selection of prepubertal goats' oocytes using the
9 brilliant cresyl blue test. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1397-1509, 2002.
- 10
- 11 RODRIGUEZ, C. et al. Ovine oocytes metabolism depending on follicle size.
12 **Theriogenology**, v.59, n.1, p.478, 2003.
- 13
- 14 ROMAN-PONCE, H. et al. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows.
15 **Journal Animal Science**, v. 46, p. 175-180, 1978.
- 16
- 17 RON, M. et al. Factors affecting conception rate of Israeli Holstein cows. **Journal Dairy**
18 **Science**, v. 67, p. 854-860, 1984.
- 19
- 20 ROSE-HELLEKANT, T. A.; LIBERSKY-WILLIAMSON, E. A.; BAVISTER, B. D.
21 Energy substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine oocytes
22 alter acquisition of development competence. **Zygote**, v.6, n.4, p.285-294, 1998.
- 23
- 24 ROSENBERG, A. et al. Multicollision Model for Amplification by Stimulated
25 Emission of Bremsstrahlung. **Physical Review Archive**, v.49, p.1917-1920, 1982.
- 26
- 27 ROTH, Z. et al. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development
28 and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of**
29 **Reproduction and Fertility**, v.120, p.83-90, 2000.
- 30
- 31 ROTH, Z. et al. Improvement of quality of oocyte collected in the autumn by enhanced
32 removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v.122,
33 p.737-744, 2001.
- 34

- 1 ROTH, Z. et al. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine
2 somatotropin on the quality of oocyte aspirated in the autumn from previously heat-
3 stressed cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1398-1405, 2002.
4
- 5 ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental
6 competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology**
7 **Reproduction**, v.71, p.1898-1906, 2004a.
8
- 9 ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat
10 shock during maturation. **Biology Reproduction**, v.71, p. 2072-2078, 2004b.
11
- 12 ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of
13 cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation.
14 **Reproduction**, v.129, p.235-244, 2005.
15
- 16 RUMPF, R. et al. Fecundação *in vitro* na espécie bovina: a experiência do CENARGEN.
17 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, n.3-4, p.219-232, 1995.
18
- 19 RUTLEDGE, J. J. et al. Seasonality of cattle embryo production in a temperate
20 region. **Theriogenology**, v. 51, n.2, p. 330, 1999.
21
- 22 SALLES, H. O., SIMPLÍCIO, A. A., SANTOS, D. O. Embryo viability after induction
23 or synchronization in prepubertal and pubertal female goats. In: SCIENTIFIC
24 MEETING OF EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION (AETE), 11.,
25 1998. Veneza, **Proceedings...**Veneza: **AETE**, 1998. p.240.
26
- 27 SALLES, H. O.; SANTOS, D. O.; SIMPLÍCIO, A. A. Superovulação em fêmeas
28 caprinas pré-púberes e púberes da raça Anglo-nubiana. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.
29 10, n. 1, p. 137-138, 2000. Supplement.
30
- 31 SALLES, H. O. et al. **Manual de transferência de embriões em caprinos**. Sobral:
32 Embrapa Caprinos, 2002. p.64 (Embrapa Caprinos. Documentos, 40) 2002.
33

- 1 SANDERS, E. J.; TORKKELI, P. H.; FRENCH, A. S. Patterns of cell death during
2 gastrulation in chick and mouse embryos. **Anatomy and Embryology**, v.195, n.2,
3 p.147-154, 1997.
4
- 5 SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis.
6 **Cardiovascular Research**, v.45, n.3, p.528-537, 2000.
7
- 8 SAUNDERS JR., J. W. Death in embryonic systems. **Science**, v.154, n.749, p.604-612,
9 1966.
10
- 11 SCHULTZ, R. M. Molecular aspects of mammalian oocyte growth and maturation. In:
12 ROSSANT, J.; PEDERSEN, R. A. **Experimental approaches to mammalian**
13 **embryonic development**. New York: Academic Press, 1986, p.195-237.
14
- 15 SHIMIZU, T. et al. Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances
16 susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. **Reproduction**, v.129, n.4, p.463-72, 2005.
17
- 18 SILVA, J. R. V. et al. Características morfológicas e controle do crescimento folicular
19 durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, v.12, n.2, p.105-117,
20 2002.
21
- 22 SILVA, R. G. **Introdução à Bioclimatologia Animal**. São Paulo:SP. (ed.) Editora
23 Nobel. 2000, 256p.
24
- 25 SIMPLÍCIO, A. A.; SALLES, H. O.; SANTOS, D. O. Transferência de embriões nos
26 pequenos ruminantes domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo
27 Horizonte, v. 5, p. 17-25, out. 2002. Supplement
28
- 29 SIRARD, M. A.; LAMBERT, R. D. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes
30 obtained by laparoscopy. **Biology of Reproduction**, v.33, n.2, p.487-494, 1985.
31
- 32 SIRARD, M. A. et al. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent
33 embryos. **Biology of Reproduction**, v.39, p.546-552, 1988.
34

- 1 SIRARD, M. A.; COENEN, K. The co-culture of *cumulus* enclosed bovine oocytes and
2 hemisections of follicles: effect on meiotic resumption. **Theriogenology**, v.40, n.4, p.933-
3 942, 1993.
- 4
- 5 SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine
6 oocytes. **Theriogenology**, v.49, n.2, p.483-497, 1998.
- 7
- 8 SIRISATHIEN, S. Development and application of bovine *in vitro* fertilization. Athens.
9 2002. **Dissertation** (Doctor of Philosophy) – Faculty of the University of Georgia.
- 10
- 11 SLAWETA, R. Respiration of bull spermatozoa in presence of exogenous glutathione
12 (GSH). **ACTA Physiological Pol**, v. 38, n.1, p. 31-35, 1987.
- 13
- 14 SMAILI, S. S. et al. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell
15 death signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.2, p.183-
16 190, 2003.
- 17
- 18 SUM, Q. Y. et al. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo
19 developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, *cumulus* cells,
20 follicular size, and protein synthesis inhibition. **Molecular Reproduction and**
21 **Development**, v.59, n.2, p.192-198, 2001.
- 22
- 23 SUN, F. Z.; MOOR, R. M. Nuclear-citoplasmic interactions during ovine oocyte maturation.
24 **Development**, v.111, p.171-180, 1991.
- 25
- 26 SUTOVSKY, P. et al. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* of
27 culture cattle oocyte *cumulus* complexes. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1277-1287,
28 1993.
- 29
- 30 SZOLLOSI, D. Maturation de l'ovocyte. In: TRIBAUT, C. and LEVASSEUR, M. C.: La
31 reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris, **INRA/Ellipses**, 1991.
- 32

- 1 TAKASE, K.; ISHIKAWA, A. M.; HOSHIAI, H. Apoptosis in the degeneration
2 process of unfertilized mouse ova. **Tohoko Journal of Experimental Medicine**, v.175,
3 p.69-76, 1995.
- 4
- 5 TATEMOTO, H.; TERADA, T. Involvement of cumulus cells stimulated by FSH in
6 chromatin condensation and the activation of maturation – promoting factor in bovine
7 oocytes. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.1007-1020, 1998.
- 8
- 9 TEOTIA, A.; SHARMA, G. T.; MAJUMDAR, A. C. Fertilization and development of
10 caprine oocytes matured over granulose cell monolayers. **Small Ruminant Research**, v.40,
11 n.2, p.165-177, 2001.
- 12
- 13 THOMPSON, C. B. Apoptosis. In: PAUL, W. E. (Ed.). **Fundamental Immunology**, (4^o
14 ed.) Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999, p.813-829.
- 15
- 16 THOMPSON, J. G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a
17 decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.
- 18
- 19 THORNBERRY, N. A. et al. A combinatorial approach defines specificities of members of
20 the caspases family and granzyme B. functional relationships for key mediators of
21 apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, 17907-17911, 1997.
- 22
- 23 THIBAUT, C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent process?
24 **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, p.1-15, 1977.
- 25
- 26 THIBAUT, C. *In vitro* maturation and fertilization of rabbit and cattle oocytes. In:
27 SEGAL, S. J.; CROZIER, P. A.; CORFMAN, P. G.; CONDLIFFE, C. C. (eds.). **The**
28 **Regulation of Mammalian Reproduction**. Michigan: Springfield, III, 1973, p.113-119.
- 29
- 30 THIBAUT, C.; SZOLLOSI, O.; GERARD, M. Mammalian oocytes maturation.
31 **Reproduction Nutrition Development**, v.27, p.865-896, 1987.
- 32
- 33 TOMPKINS, E. C. et al. Effect of post-breeding thermal stress on embryonic mortality
34 of swine. **Journal Animal Science**, v.26, p.377-380, 1967.

- 1 TILLY, J. L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.162-
2 172, 1996.
- 3
- 4 TILLY, J. L. Commuting the death sentence: how oocyte strive to survive. **Nature**
5 **Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, p.838-848, 2001.
- 6
- 7 TSAFRIRI, A.; DEKEL, N.; BAR-AMI, S. The role of oocyte maturation inhibitor in
8 follicular regulation of oocyte maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**,
9 v.64, p.541-551, 1982.
- 10
- 11 VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. From co-culture to defined
12 medium: State of the art and practical considerations. **Reproduction of Domestic**
13 **Animal**, v.36, p.25-28, 2001.
- 14
- 15 VAN INZEN, W. G. et al. Culture of embryos to the blastocyst stage using buffalo rat
16 liver (BRL) cells. **Theriogenology**, v.43, n.4, p.723-738, 1995.
- 17
- 18 VASCONCELOS, J. L. M. **Manejo de vacas leiteiras para melhoria do**
19 **desempenho reprodutivo durante períodos de estresse calórico**, 2003. Disponível em:
20 [<www.milkpoint.com.br >](http://www.milkpoint.com.br) Acesso em: 22 maio, 2008.
- 21
- 22 VOELKEL, S. A.; HU, Y. X. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell
23 bovine embryos in two systems. **Theriogenology**, v.37, n.6, p.1117-1131, 1992.
- 24
- 25 WARD, F. et al. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration
26 of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire.
27 **Theriogenology**, v.57, n.8, p.2105-17, 2002.
- 28
- 29 WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. e NEIL, J. D. (Eds.).
30 **The Physiology of Reproduction**, 2^a ed. New York: Raven Press, p.571-628, 1994.
- 31
- 32 WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. e
33 NEIL, J. D. (eds.). **The Physiology of Reproduction**, 2^a ed. New York: Raven Press,
34 p.79-122, 1994.

- 1 WATSON, A. J. et al. Preimplantation development of *in vitro* matured and *in vitro*
2 fertilized ovine zygote: comparison between co-culture on oviduct epithelial cell
3 nomolayers and culture under low oxygen atmosphere. **Biology of Reproduction**, v.50,
4 n.4, p.715-724, 1994.
- 5
- 6 WHITTINGHAN, D. G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and**
7 **Fertility**, v.14 (Suppl.), p.7-21, 1971.
- 8
- 9 WOLFENSON, D.; BLUM, O. Embryonic-development, conception rate, ovarian-
10 function and structure in pregnant rabbits heat-stressed before or during implantation.
11 **Animal Reproduction Science**. v.17, p.259-270, 1988.
- 12
- 13 WOLFENSON, D. et al. Effect of heat stress on follicular development during the
14 estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1106-1113,
15 1995.
- 16
- 17 WOLTER, K. G. et al. **Movement of BAX from the citosol to mitochondria during**
18 **apoptosis**. Journal of Cell Biology, v.139, p.1281-1292, 1997.
- 19
- 20 WYLLIE, A. H.; KEER, J. F. R.; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of
21 apoptosis. **International Review of Cytology**, v.5, p.97-104, 1980.
- 22
- 23 XU, K. P. et al. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes
24 matured and fertilized *in vitro* and co-culture with bovine oviductal epithelial cell.
25 **Journal of Reproduction and Fertility**, n.94, v.1, p.33-43, 1992.
- 26
- 27 YANAGIMACHI, R.; Mammalian fertilization. In: Knobil A.; Neill, J.D., editors. **The**
28 **physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p. 187-317, 1994.
- 29
- 30 YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of BCL-2 and BAX proteins in
31 relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal**
32 **Reproduction Science**, v.70, n.3-4, p.159-169, 2002.
- 33

- 1 YANG, X. et al. Control of oocyte maturation in cows – biological factors.
2 **Theriogenology**, v.49, n.2, p.471-482, 1998.
3
- 4 YANG, X.; LU, K. H. The influence of bovine oocyte type on *in vitro* fertilization and
5 subsequent development *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.355-362, 1990.
6
- 7 YOSHIOKA, K. et al. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in
8 synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. **Theriogenology**, v.48, n.5,
9 p.997-1006, 1997.
10
- 11 YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Influence of serum
12 and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Gamete Research**,
13 v.23, p.189-201, 1989.
14
- 15 YIN, X. M.; OLTVAI, Z. N.; KORSMEYER, S. J. BH1 and BH2 domains of BCL-2
16 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with BAX. **Nature**,
17 v.369, p.321-333, 1994.
18
- 19 ZHANG, G. et al. Caspase inhibition prevents staurosporine-induced apoptosis in CHO-
20 K1 cells. **Apoptosis**, v.3, n.1, p.27-33, 1998.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

CAPÍTULO 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

**Avaliação de oócitos caprinos submetidos à estresse calórico induzido durante a
maturação *in vitro*.**
(Evaluation of goat oocytes subjected to heat stress induced during in vitro maturation)

**ER Santos Junior; RM Chaves; FQG Bezerra; CR Aguiar Filho; FF Paula-Lopes;
JDR Alves; MC Rabelo; CH Dezotti; PF Lima; MAL Oliveira**

1 **RESUMO**

2 Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito do estresse térmico calórico durante a
3 maturação *in vitro* de oócitos e seu reflexo na produção de embriões na espécie caprina.
4 Os ovários foram coletados em abatedouro e transportados ao Laboratório de
5 Biotécnicas da Reprodução da UFRPE. Os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) foram
6 coletados pela técnica de fatiamento dos folículos entre 2 a 6 mm de diâmetro,
7 selecionados com base na morfologia e colocados em meio básico de maturação. Nas 10
8 repetições, os CCOs foram submetidos aos tratamentos de estresse térmico calórico a
9 41°C por 0 (termoneutralidade a 39°C), 3, 6, 12, 18 e 24 horas de maturação *in vitro*. Os
10 dados foram avaliados na maturação, fertilização, clivagem (D-3), estágio de 8-16
11 células (D-4), mórula (D-5), blastocisto (D-8) após fecundação e blastocistos positivos
12 para apoptose através do Teste de TUNEL. Foi observada diferença significativa ($P <$
13 0,05) em todos os tempos estudados de estresse térmico na maturação, fecundação, D-3,
14 D-4, D-5. No D-8 não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tempos
15 de 3 vs 6 e 18 vs 24 h e nos blastocistos TUNEL positivos nos tempos de 0 vs 3, 3 vs 6,
16 12 vs 18 e 18 vs 24 h de estresse térmico. Nas condições observadas neste estudo, os
17 resultados permitem concluir que o tempo em que o oócito é exposto ao estresse
18 térmico durante a maturação *in vitro* é de grande importância para o desenvolvimento
19 embrionário e o nível apoptótico de suas células.

20

21 **Palavras-chave:** Folículos, complexos *cumulus oophorus*, apoptose, Teste de TUNEL.

22

23

24

25

1 **ABSTRACT**

2 This study aimed to evaluate the effect of heat stress during maturation *in vitro* of
3 oocytes goats. Ovaries of goats were collected in a slaughterhouse and transported to
4 the Laboratory of Biotechnical Reproduction of UFRPE. The *cumulus oophorus*
5 complexes (COCs) were collected by the technique of slicing of the follicles from 2 to 6
6 mm in diameter and selected based on morphological classification and placed in basic
7 medium maturity (MBM). In 10 replicates the COCs were submitted to the caloric heat
8 stress at 41 ° C for 0 (the thermoneutral 39 ° C), 3, 6, 12, 18 and 24 hours of maturation
9 *in vitro*. The percentage of oocytes was determined in the maturation, fertilization,
10 cleaved (D-3), stage of 8-16 cells (D-4), morale (D-5), blastocyst (D-8) after
11 fertilization and blastocyst positive for apoptosis by TUNEL test. Significant difference
12 ($P < 0.05$) in all time periods of heat stress on maturation, fertilization, D-3, D-4, D-5.
13 The D-8 was not significantly different ($P > 0.05$) between the periods of 3 vs 6 to 18 vs
14 24 h and the blastocyst TUNEL positive at 0 vs 3, 3 vs 6, 12 vs 18 and 18 vs 24 h of
15 heat stress. Under the conditions observed in this study, the results indicate that the time
16 in which the oocyte is exposed to heat stress during maturation *in vitro* is essential to
17 define the embryonic development and their level of apoptotic cells.

18

19 **Keywords:** Follicles, complexes *cumulus oophorus*, apoptosis, TUNEL test.

20

21 **INTRODUÇÃO**

22 O rebanho caprino no Brasil atinge o total de 10.033.271 cabeças, sendo destas
23 93,8% localizadas na região Nordeste do país, sendo 15,26% em Pernambuco
24 (ANUALPEC, 2008). Apesar de deter praticamente todo o rebanho caprino, o Nordeste
25 necessita de pesquisas e tecnologias para minimizar a relação custo/benefício do sistema

1 de produção, estimulando o desenvolvimento e criando novas possibilidades de
2 agronegócio. A baixa produtividade dos rebanhos locais tem sido contornada através da
3 importação de raças exóticas para o semi-árido nordestino, porém, é preciso cautela
4 devido à susceptibilidade destas raças às temperaturas elevadas encontrada nesta região
5 (SIMPLÍCIO et al., 2007).

6 Sabe-se hoje que o oócito e o embrião são os alvos principais dos efeitos
7 deletérios induzidos pelo estresse térmico (EALY et al., 1995; EDWARDS e HANSEN,
8 1996), provocando danos celulares que ativam a cascata de apoptose (MAKAREVICH
9 e MARKKULA, 2002). Não obstante à óbvia importância dos mecanismos celulares
10 desencadeados pela temperatura elevada, pouco se sabe sobre os eventos moleculares
11 que acionam a apoptose, bem como os mecanismos de sobrevivência celular em resposta
12 ao estresse em oócitos e embriões da espécie caprina (MORITA e TILLY, 1999;
13 TILLY, 2001).

14 Este estudo visa abordar a problemática do estresse térmico nas funções
15 reprodutivas de caprinos, fornecendo dados fundamentais sobre os mecanismos de
16 morte celular em oócitos expostos a temperatura elevada. Tendo como objetivo avaliar
17 o efeito do estresse térmico durante a MIV de oócitos e na produção *in vitro* de
18 embriões da espécie caprina.

19

20

21 **MATERIAL E MÉTODOS**

22 Foram utilizados ovários oriundos de fêmeas caprinas SRD com idade variando
23 de 12 a 46 meses, abatidas no abatedouro Suimax, localizado na cidade de Igarassu,
24 Região Metropolitana do Recife-PE (latitude 08° 03' 14" S, longitude 34° 52' 52" W). A
25 temperatura ambiente mínima e máxima na estação seca (outubro a março) foi de 23 a

1 33°C e na chuvosa (abril a setembro) de 18 a 31°C, respectivamente. A umidade relativa
2 média do ar foi de 71% no período seco e 85% no período chuvoso (INMET, 2009).

3 Imediatamente após o abate, os ovários foram transportados ao laboratório em
4 garrafa térmica contendo solução fisiológica a 30°C acrescida de 30µg/mL de sulfato de
5 gentamicina em um período máximo de uma hora.

6 Os complexos cumulus oophorus (CCOs) foram coletados de folículos
7 ovarianos medindo entre 2 a 6 mm de diâmetro pela técnica de fatiamento. O líquido
8 folicular foi depositado em placa de Petri contendo o meio de colheita (MC) constituído
9 por 8,0 mg de bicarbonato de sódio, 45,0 mg de glucose, 5,6 mg de piruvato de sódio,
10 11,9 mg de HEPES, 2,5 mg de sulfato de gentamicina e 20,0 mg de álcool polivinílico
11 em 50 mL de TALP.

12 Os CCOs depositados em placa de Petri foram levados para seleção e
13 recuperação. Uma vez selecionados, com base na classificação morfológica descrita por
14 Gonçalves et al. (2008), os oócitos foram lavados (3 vezes) no meio MC. Após esta
15 etapa, foram colocados 25 oócitos em gotas de 100 µL sob óleo de parafina esterilizada,
16 no meio básico de maturação (MBM) constituído por TCM 199 suplementado com 50
17 µg/mL de piruvato de sódio, 2,6 mg/mL de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal
18 bovino (SFB), 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 20 µg/mL de FSH/LH (Pluset®) e 1
19 mg/mL de álcool polivinílico. Para a maturação *in vitro* (MIV), os oócitos foram
20 colocados em estufa a 39°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 24
21 horas.

22 Em 10 repetições por tratamento (n = 96-113 oócitos/tratamento), os CCOs
23 foram submetidos ao estresse térmico calórico a 41°C por 0 (termoneutralidade a 39°C),
24 3, 6, 12, 18 e 24 horas de maturação *in vitro*.

1 Após a maturação, os oócitos foram submetidos ao processo de fecundação in
2 vitro (FIV), utilizando sêmen fresco conforme Cavalcanti Neto (2004) na concentração
3 espermática de 2×10^6 /mL em meio definido modificado (mDM) de acordo com
4 Keskinetepe et al. (1998), constituído de 0,1250 g de glucose, 0,1552 g de bicarbonato
5 de sódio, 0,0069 g de piruvato de sódio, 0,0500 g de álcool polivinílico, 0,0500 g de
6 cafeína e 50 µg/mL de gentamicina em 50 mL de mDM, durante 18h.

7 Os zigotos foram mecanicamente desnudados no agitador mecânico Vortex® em
8 meio “Synthetic oviduct fluid” modificado (SOFm) durante três minutos a velocidade
9 “7” (escala 1-10), e 25 estruturas foram transferidas para as gotas de 100 µL do meio
10 SOFm, suplementados com 10% de SFB, sob óleo de parafina esterilizada. Essas
11 estruturas foram incubadas a 39°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, 5% O₂ e 90%
12 N₂ e depois de sete dias de cultivo, avaliou-se o número de células, taxa de clivagem e
13 quais alcançaram estádios de blastocisto.

14 A fragmentação de DNA, que é uma característica da apoptose, foi analisada
15 com o Teste de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick*
16 *and labeling*) (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a; ROTH e HANSEN, 2004). A
17 identificação de embriões positivos para apoptose e a morfologia nuclear embrionária
18 foi realizada com auxílio de um microscópio de fluorescência, com objetiva de 1000x.

19 A porcentagem de oócitos clivados foi determinada no dia 3 (D-3) e a
20 porcentagem de oócitos que se desenvolveram aos estádios de 8-16 células, mórula e
21 blastocisto foi determinada nos dias 4 (D-4), 5 (D-5) e 8 (D-8) após a fecundação,
22 respectivamente. A qualidade dos blastocistos formados no D-8 foi avaliada através da
23 contagem total de células por blastocisto com o corante DAPI e a determinação de
24 blastômeros positivos para apoptose através do teste de TUNEL.

1 Para a estatística foi realizada análise de variância pelo método dos quadrados
 2 mínimos. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão (análise de variância
 3 entre grupos). Considerando também as medidas tratadas em percentuais, procedeu-se
 4 uma comparação de variâncias, *teste F* para variâncias ao nível de significância 5% ($P <$
 5 $0,05$). Depois, um *teste t* para comparação de médias, no nível de significância 5%, para
 6 variâncias equivalentes ou variâncias distintas, conforme o que foi verificado no *teste F*
 7 para variâncias (SAMPAIO, 2007).

8

9 RESULTADOS

10 A média de oócitos recuperados não apresentou diferença significativa ($P >$
 11 $0,05$). Nos oócitos maturados e fecundados *in vitro* expostos ao estresse térmico durante
 12 a maturação, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) em todos os tempos
 13 estudados (Tabela 1).

14 Nos embriões no D-3 (clivados), embriões cultivados até o D-4 (8 - 16 células) e
 15 no D-5 (mórula), foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) em todos os
 16 tempos estudados de estresse térmico na maturação. Os resultados demonstram que a
 17 medida que aumenta o tempo de estresse térmico, o número de estruturas obtidas com a
 18 produção *in vitro* (PIV) diminuí significativamente (Tabela 2).

19 **Tabela 1:** Média e desvio padrão de oócitos recuperados, maturados *in vitro* (MIV) e
 20 fecundados *in vitro* (FIV) da espécie caprina submetidos a diferentes tempos
 21 de estresse térmico na maturação.

Etapas da Produção <i>in</i> <i>vitro</i>	Tempo de estresse térmico na maturação a 41°C					
	0 h ($\bar{X} \pm s$)	3 h ($\bar{X} \pm s$)	6 h ($\bar{X} \pm s$)	12 h ($\bar{X} \pm s$)	18 h ($\bar{X} \pm s$)	24 h ($\bar{X} \pm s$)
Oócitos recuperados	107,9±5,89 ^a	106±5,30 ^a	100,1±4,74 ^a	100,9±4,48 ^a	103,4±4,14 ^a	101,9±4,58 ^a
Maturação <i>in vitro</i> (24h)	69,3±6,21 ^a	44,1±6,98 ^b	34,8±2,52 ^c	16,7±1,76 ^d	11,1±0,99 ^e	7,8±1,03 ^f
Fecundação <i>in vitro</i> (18h)	42,0±7,08 ^a	25,4±3,27 ^b	17,7±3,23 ^c	11,9±1,19 ^d	7,9±0,99 ^e	3,4±0,84 ^f

22 Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo *teste t*.

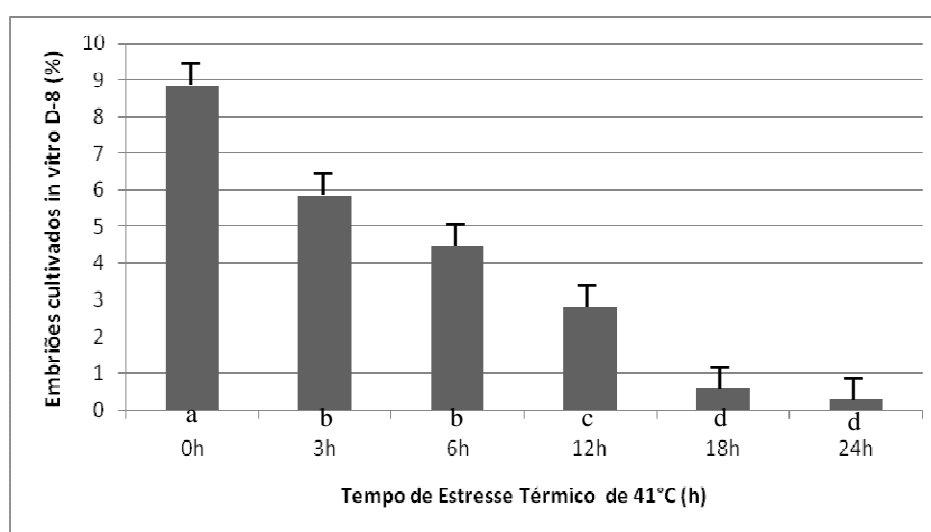
23 \bar{X} = média, s = desvio padrão.

1 **Tabela 2:** Média e desvio padrão de embriões clivados (D-3), embriões (D-4) e mórulas
 2 (D-5) da espécie caprina submetidos a diferentes tempos de estresse térmico
 3 na maturação.

Etapas da Produção <i>in vitro</i>	Tempo de estresse térmico na maturação a 41°C					
	0 h ($\bar{x} \pm s$)	3 h ($\bar{x} \pm s$)	6 h ($\bar{x} \pm s$)	12 h ($\bar{x} \pm s$)	18 h ($\bar{x} \pm s$)	24 h ($\bar{x} \pm s$)
Embriões (D-3)	28,1±2,84 ^a	23,6±2,79 ^b	14,1±2,28 ^c	6,8±1,39 ^d	4,7±1,05 ^e	1,8±0,78 ^f
Embriões (D-4)	26,9±2,84 ^a	22,5±2,63 ^b	12,1±1,91 ^c	4,8±1,22 ^d	2,6±0,69 ^e	1,5±0,84 ^f
Mórulas (D-5)	20,3±3,30 ^a	15,9±1,59 ^b	8,8±2,65 ^c	3,0±1,24 ^d	1,6±0,51 ^e	1,0±0,47 ^f

4 Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo teste *t*.
 5 \bar{x} = média, *s* = desvio padrão.

6
 7 Nos embriões cultivados até D-8 foi observada diferença significativa ($P < 0,05$)
 8 à medida que aumentava os tempos de estresse térmico. Não sendo observada diferença
 9 significativa ($P > 0,05$) entre os tempos de 3 vs 6 horas e 18 vs 24 horas quando
 10 comparado o porcentual de blastocistos PIV. Tendo o grupo controle (0h) obtido $8,80 \pm$
 11 $2,32$ (% \pm s) de embriões em estágio de blastocisto e os demais grupos $5,99 \pm 1,34$, $4,59$
 12 $\pm 1,07$, $2,77 \pm 1,13$, $0,58 \pm 0,51$ e $0,29 \pm 0,48$ dos embriões D-8 dos oócitos maturados
 13 expostos ao estresse térmico de 41°C por 3, 6, 12, 18 e 24 horas, respectivamente
 14 (Figura 1).

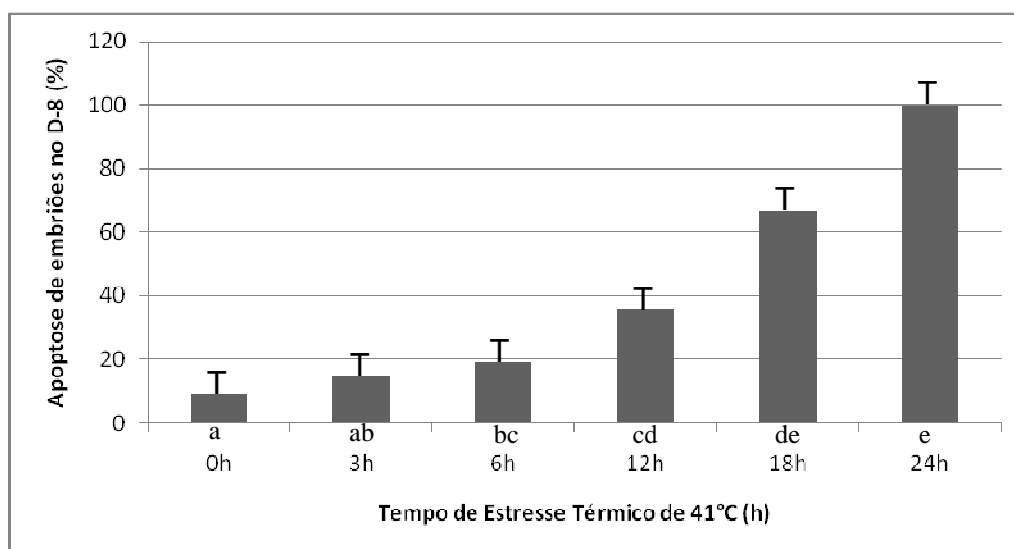


15
 16 **Figura 1:** Porcentagem e desvio padrão de embriões caprinos PIV ($P <$
 17 $0,05$) pelo teste *F*, no D-8 (blastocisto) em diferentes tempos de estresse
 18 térmico calórico a 41°C.

19

1 Nos embriões positivos para Apoptose (Teste de TUNEL) cultivados até o D-8,
 2 foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) à medida que aumentava os tempos de
 3 estresse térmico, mas quando comparado a porcentagem de embriões com degeneração
 4 de DNA (TUNEL) entre os tempos de 0 vs 3, 3 vs 6, 12 vs 18 e 18 vs 24 horas de
 5 estresse térmico não se obteve diferença significativa ($P > 0,05$). Tendo o grupo
 6 controle (0h) obtido $9,42 \pm 0,63$ (% \pm s) de embriões em estágio de blastocisto positivos
 7 para o teste de TUNEL e os demais grupos $14,06 \pm 0,56$, $19,56 \pm 0,73$, $35,71 \pm 0,94$,
 8 $66,66 \pm 0,51$ e $100 \pm 0,48$ dos embriões oriundos de oócitos maturados expostos ao
 9 estresse térmico de 41°C por 3, 6, 12, 18 e 24 horas, respectivamente (Figura 2).

10



11

12 **Figura 2:** Porcentagem e desvio padrão da apoptose diagnosticada pelo Teste
 13 de TUNEL em embriões caprinos PIV ($P < 0,05$) pelo *teste F*, no D-8
 14 (blastocisto) em diferentes tempos de estresse térmico calórico a 41°C .

15

16 DISCUSSÃO

17 Freitas et al. (2007) utilizando meio de maturação composto de TCM-199
 18 suplementado com cisteamina e fator de crescimento epidermal, obtiveram uma taxa de
 19 MIV de 48,90%, valores inferiores aos encontrados no grupo controle deste estudo
 20 (64,22%). Cognié e Baril (2002) verificaram que, após a fecundação e PIV durante uma

1 semana, 60 a 70% dos oócitos maturados *in vivo* que ovularam se desenvolvem até o
2 estágio de blastocisto, no entanto, a taxa de desenvolvimento dos blastocistos varia de
3 35 a 50% para os oócitos FIV. Resultados estes semelhantes aos obtidos no grupo
4 controle deste experimento.

5 Durante o cultivo e o desenvolvimento na pré-implantação, perturbações no
6 microambiente do embrião podem levar à inibição do desenvolvimento e a morte
7 embrionária (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a). O presente estudo é o primeiro
8 relato em caprinos que indica uma evolução em tempo de estresse térmico. Mesmo que
9 a PIV na espécie esteja em evolução (PAULA et al., 2008), foram obtido 8,85% de
10 blastocistos no GC, reduzindo em número a medida que aumentava o tempo de estresse
11 térmico calórico.

12 Quando se aplica um choque térmico que produza danos na maturação oocitária
13 *in vitro*, sua membrana característica, configuração da cromatina e fusos meióticos são
14 alterados, assim, o desenvolvimento da competência dos oócitos após fecundação ou
15 ativação partenogenética é também comprometido (JU, 2005). Foi observado neste
16 estudo que ocorreu uma redução gradativa no número de oócitos MIV à medida que o
17 tempo de exposição ao choque térmico aumentava, refletindo diretamente em cada fase
18 da PIV de embriões. De acordo com Zavy (1994) e Ealy et al. (1995), estas fases são
19 mais vulneráveis durante a maturação *in vivo* (ovulação), fecundação, dentro de 2 dias
20 após fecundação e, na primeira divisão de clivagem, evidenciado neste estudo *in vitro*
21 após as 12h de estresse térmico, reduzindo o número de blastocistos.

22 Ju et al. (1999) observaram que o choque térmico em oócitos bovinos por uma
23 hora a 40 ou 42°C não teve efeitos deletérios sobre blastocistos formados após FIV.
24 Corroborando com este estudo, a taxa de formação de blastocisto diminui quando o
25 choque térmico é sustentado para 12h a 41°C (EDWARDS e HANSEN, 1997) se

1 acentuando à medida que aumenta o tempo de exposição. Quando aumenta a
2 temperatura para 43°C, a competência do desenvolvimento dos oócitos tratados é
3 severamente reduzida na sequência de uma exposição de 45 minutos (JU et al., 1999),
4 sendo a temperatura e a duração de exposição deste choque fatores limitantes da PIV
5 (EALY et al., 1995; JU et al., 1999; TSENG et al., 2004).

6 Ealy et al. (1995) e Tseng et al. (2004) observaram que embriões de bovinos de
7 duas células, quando submetido a um choque térmico a 40°C por 3h, não produzia
8 efeito sobre o desenvolvimento embrionário, corroborando com este estudo, a
9 competência do desenvolvimento diminuiu quando aquecido a 41°C e a 42°C durante
10 um período mais longo de tempo. Estes efeitos também foram relatados em embriões
11 suínos por Ju e Tseng (2004). Para estes autores, parece claro que os efeitos das
12 condições produzidas por altas temperaturas sobre a viabilidade e desenvolvimento da
13 competência dos oócitos e embriões depende tanto da temperatura como da duração da
14 exposição ao choque térmico.

15 Ealy et al. (1993) avaliaram a termotolerância de embriões bovinos pela
16 introdução de choque térmico para o animal nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 após a inseminação,
17 seguido por análise de viabilidade e as fase de embriões recuperados a partir do útero no
18 D-8. A partir do D-3 os embriões adquiriram uma resistência maior ao calor com a
19 progressão dos estádios de desenvolvimento. Ju et al. (1999) estudando o estresse
20 térmico em bovinos observaram que um aumento substancial na termotolerância é
21 adquirido no D-4, em embriões provenientes de FIV. Quando os embriões são obtidos
22 de oócitos que durante a maturação receberam altos níveis de estresse térmico, reduz-se
23 o número de estruturas e sendo o estresse por mais de 12h diminui o número de
24 blastocistos produzidos *in vitro* (ROTH e HANSEN, 2004).

1 Paula-Lopes e Hansen (2002a) obtiveram 27,6% dos blastômeros bovinos
2 positivos para marcação TUNEL após exposição a 41°C por 9h. Taxas aproximadas
3 foram obtidas neste estudo, com tempos de exposições de 6h e 12h, sendo 14,28 e
4 33,33%, respectivamente. Paula-Lopes e Hansen (2002a) concluíram que é possível
5 observar, que apoptoses mais extensas podem ocorrer após estresses mais severos,
6 comprometendo o desenvolvimento embrionário, como observado neste estudo durante
7 18 e 24h de estresse, aonde as alterações de DNA nos blastocistos com marcação
8 TUNEL positivo chegaram a 66,60 e 100% dos embriões obtidos, respectivamente.

9 A temperatura que induziu a apoptose, incluindo aquela característica do choque
10 térmico a 41°C, também o fez em caprinos, sugerindo que a apoptose pode ser induzida
11 na pré-implantação de embriões expostos à hipertermia materna (PAULA-LOPES e
12 HANSEN, 2002ab). Além disso, o grau de apoptose vivido pelos embriões PIV,
13 geralmente reflete a severidade do choque térmico. Neste estudo, o porcentual de
14 células que foram TUNEL positivas aumentou com o prolongamento do choque
15 térmico. A indução de apoptose foi tempo dependente e o número de células apoptóticas
16 aumentou proporcionalmente após 6, 12, 18 e 24h de exposição, como observado por
17 Paula-Lopes e Hansen (2002a, b) em exposições de até 12h.

18 É importante ressaltar o papel benéfico da apoptose por um tempo curto,
19 permitindo assim que na pré-implantação embrionária o estresse térmico possa ser
20 suportado (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a). Alguns estudos indicam que a
21 apoptose representa um risco ao embrião (BRISON e SCHULTZ, 1997; MATWEE et
22 al., 2000) porém, em certos tratamentos, o desenvolvimento embrionário aumenta e a
23 apoptose diminui (BRISON e SCHULTZ, 1997; KOLLE et al., 2002; MAKAREVICH
24 e MARKKULA, 2002). É simplista a apoptose vista unicamente como um marcador de
25 embrião com estresse sem perceber que o processo pode contribuir para a sobrevivência

1 do embrião, em resposta a este estresse nas fases iniciais de cultivo (ROTH e HANSEN,
2 2004; 2005) comprometendo a qualidade e a quantidade dos embriões PIV.

3 Atualmente, mais informações estão disponíveis nas respostas fisiológicas das
4 células dos oócitos e embriões mamíferos ao estresse térmico às temperaturas elevadas
5 (PAYTON et al., 2004; JU e TSENG, 2004; JU, 2005). Para compreender melhor os
6 mecanismos de lesão térmica ou termotolerância, mais trabalhos sobre os efeitos do
7 estresse térmico durante a MIV em oócitos e embriões são necessários em caprinos.
8 Estes conhecimentos serão úteis na solução ou no desenvolvimento de estratégias para
9 minimizar a baixa fertilidade e alta mortalidade dos embriões das espécies domésticas
10 nas estações quentes.

11

12 **CONCLUSÃO**

13 Nas condições observadas neste estudo, os resultados permitem concluir que o
14 tempo em que o oócito caprino é exposto ao estresse térmico durante a maturação *in*
15 *vitro* é de grande importância para definir o desenvolvimento embrionário e o nível
16 apoptótico de suas células.

17

18 **AGRADECIMENTOS**

19 Agradecemos à Empresa Suimax, seus diretores e funcionários por
20 disponibilizar os animais necessários a execução deste experimento.

21

22 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

23 ANUALPEC - **Anuário da Pecuária Brasileira**, 2008. São Paulo, p. 291.

24

- 1 BRISON, D. R.; SCHULTZ, R. M. Apoptosis during mouse blastocyst formation:
2 evidence for a role for survival factors including transforming growth factor I. **Biology**
3 **of Reproduction**, v.56, p.1088–1096, 1997.
- 4
- 5 CAVALCANTI NETO, C. C. Uso do retinol na produção *in vitro* de embriões caprinos.
6 113p. 2004. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em
7 Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Ferais.
- 8
- 9 COGNIÉ, Y.; BARIL, G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus
10 *in vivo* e *in vitro* chez la bebris e la chèvre. **Produção Animal**, v.15, p.199-207, 2002.
- 11
- 12 EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic
13 resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal Dairy Science**.
14 v.76, p.2899-2905, 1993.
- 15
- 16 EALY, A.D. et al. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat
17 shock and use of antioxidants as thermoprotectants. **Journal of Animal Science**. v.73,
18 p.1401-1407, 1995.
- 19
- 20 EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein
21 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing
22 oocytes. **Biology of Reproduction**, v.55, p.340–346, 1996.
- 23
- 24 EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and
25 preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**,
26 v.46, p.138-145, 1997.
- 27
- 28 FREITAS, V. J. F. et al. Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes
29 explorados no nordeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 (Supl. 3), p.781-
30 786, 2007.
- 31
- 32 GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B.
33 D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (2^a ed.), **Biotécnicas aplicadas à**
34 **reprodução animal**, Editora Roca, São Paulo, p.261-292, 2008.

- 1
2 INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em:
3 <http://www.inmet.gov.br/html/prev_climatica_tempo/prognostico>. Acesso em: 23 abr.
4 2009.
5
- 6 JU, J. C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to
7 molecular signaling. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.79-90, 2005.
8
- 9 JU, J. C.; PARKS, J. E.; YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes
10 and embryos after shortterm heat shock. **Molecular Reproduction Development**, v.53,
11 p.336-340, 1999.
12
- 13 JU, J. C., TSENG J. K. Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine
14 oocytes under hyperthermia. **Molecular Reproduction and Development**, v.68, p.125-
15 133, 2004.
16
- 17 KESKINTEPE, L.; SIMPLICIO, A. A.; BRACKETT, B.G. Caprine blastocyst
18 development after in vitro fertilization with spermatozoa frozen in different extenders.
19 **Theriogenology**, v.49, n.7, p.1265-1274, 1998.
20
- 21 KOLLE, S. et al. Growth hormone inhibits apoptosis in vitro produced bovine embryos.
22 **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.180–186, 2002.
23
- 24 MAKAREVICH, A.V.; MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of
25 bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation
26 and culture, **Biology of Reproduction**, v.66, p.386–392, 2002.
27
- 28 MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo.
29 **Zygote**, v.8, p.57–68, 2000.
- 30 MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass.
31 **Development Biology**, v.213, p.1–17, 1999.
32

- 1 PAULA, N. R. O. et al. Embriões caprinos produzidos *in vivo* ou *in vitro*: técnicas,
2 problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte,
3 v.32, n.1, p.21-35, 2008.
4
- 5 PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine
6 preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and**
7 **Biophysical Research Communicator**, v.295, p.37-42, 2002a.
8
- 9 PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Heat Shock-Induced Apoptosis in
10 Preimplantation Bovine Embryos. Is a Developmentally Regulated Phenomenon.
11 **Biology of Reproduction**, v.66, p.1169–1177, 2002b.
12
- 13 PAYTON, R. R. et al. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from
14 antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.71,
15 p.1303-1308, 2004.
16
- 17 ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental
18 competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of**
19 **Reproduction**, v.71, p.1898-1906, 2004.
20
- 21 ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of
22 cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation.
23 **Reproduction**, v.129, p.235-244, 2005.
24
- 25 SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**, 3ª Ed.. Belo
26 Horizonte: FEPMVZ, 2007. 264p.
27
- 28 SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F. Biotécnicas da reprodução
29 como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de**
30 **Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.234-246, 2007.
31
- 32 TILLY, J. L. Commuting the death sentence: how oocyte strive to survive. **Nature**
33 **Reviews Molecular Cell Biologic**, v.2, p.838–848, 2001.
34

1 TSENG, J. K. et al. Influences of follicular size on parthenogenetic activation and *in*
2 *vitro* heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes. **Reproduction in Domestic**
3 **Animal**, v.39, p.146-153, 2004.

4

5 ZAVY, M. T. Embryonic mortality in cattle. *In*: Zavy MT, RD Geisert (Ed.).
6 **Embryonic mortality in domestic species**. Boca Raton: CRC Press., p.99-140, 1994.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

CAPÍTULO 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

**Avaliação de oócitos ovinos submetidos à estresse calórico induzido durante a
maturação *in vitro*.**
*(Evaluation of sheep oocytes subjected to heat stress induced during in vitro
maturation)*

**ER Santos Junior; RM Chaves; FQG Bezerra; CR Aguiar Filho; FF Paula-Lopes;
JDR Alves; MC Rabelo; CH Dezotti; PF Lima; MAL Oliveira^A**

1 **RESUMO**

2 Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito do estresse térmico durante a maturação
3 *in vitro* de oócitos e seu reflexo na produção de embriões da espécie ovina. Os ovários
4 de ovelhas foram coletados em abatedouro e transportados ao Laboratório de
5 Biotécnicas da Reprodução da UFRPE. Os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) foram
6 coletados pela técnica de fatiamento dos folículos entre 2 a 6 mm de diâmetro,
7 selecionados com base na classificação morfológica e colocados em meio básico de
8 maturação. Em cada 10 repetições os CCOs foram submetidos aos tratamentos de
9 estresse térmico calórico a 41°C por 0 (termoneutralidade a 39°C), 3, 6, 12, 18 e 24
10 horas de maturação *in vitro*. A porcentagem de oócitos foi determinada na maturação,
11 fecundação, clivagem (D-3), estágio de 8-16 células (D-4), mórula (D-5), blastocisto
12 (D-8) após fecundação e blastômeros positivos para apoptose através do teste de
13 TUNEL. Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) em todos os tempos estudados
14 de estresse térmico na maturação. Na fecundação, D-3, D-4, D-5 e D-8 não foi
15 observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tempos de 18 vs 24h e nos
16 blastocistos TUNEL positivos nos tempos de 0 vs 3, 3 vs 6, 12 vs 18 e 18 vs 24h de
17 estresse térmico. Nas condições observadas neste estudo, os resultados permitem
18 concluir que o tempo em que o oócito é exposto ao estresse térmico durante a maturação
19 *in vitro* é de grande importância para o desenvolvimento embrionário e o nível
20 apoptótico de suas células.

21

22 **Palavras-chave:** Folículos, complexos *cumulus oophorus*, apoptose, teste de TUNEL.

23

24

25

1 **ABSTRACT**

2 This study aimed to evaluate the effect of heat stress during maturation *in vitro* of sheep
3 oocytes. Ovaries of sheep were collected in a slaughterhouse and transported to the
4 Laboratory of Biotechnical Reproduction of UFRPE. The *cumulus oophorus* complexes
5 (COCs) were collected by the technique of slicing of the follicles from 2 to 6 mm in
6 diameter and selected based on morphological classification and placed on the basic
7 stages. In 10 replicates the COCs were submitted to the caloric heat stress at 41 ° C for
8 0 (the thermoneutral 39 ° C), 3, 6, 12, 18 and 24 hours of maturation *in vitro*. The
9 percentage of oocytes was determined in the maturation, fertilization, cleaved (D-3),
10 stage of 8-16 cells (D-4), morale (D-5), blastocyst (D-8) after fertilization and
11 blastocyst positive for apoptosis by TUNEL test. Significant difference ($P < 0.05$) in all
12 time periods of heat stress in ripening. In fertilization, D-3, D-4, D-5 and D-8 was not
13 significantly different ($P > 0.05$) between the times of 18 vs 24 hours in blastocyst
14 TUNEL positive at 0 vs 3, 3 vs 6, 12 vs 18 and 18 vs 24 h of heat stress. Under the
15 conditions observed in this study, the results indicate that the time in which the oocyte
16 is exposed to heat stress during maturation *in vitro* is essential to define the embryonic
17 development and their level of apoptotic cells.

18

19 **Keywords:** Follicles, *cumulus oophorus* complexes, apoptosis, TUNEL test.

20

21 **INTRODUÇÃO**

22 A ovinocultura tem mostrado nos últimos anos ser uma atividade agropecuária
23 de extrema importância para algumas regiões brasileiras com 14.027.271 cabeças,
24 ocupando o 16º lugar no ranking mundial (ANUALPEC, 2008). Reconhecidamente no
25 Nordeste já mostrou sua potencialidade e sua promessa em ser uma atividade que se

1 adapta bem às adversas condições climáticas da região, que é reconhecida pelo
2 potencial para produção de carne e pele ovina (SIMPLÍCIO et al., 2007). No entanto,
3 existe uma elevada demanda para este produto, o que resultou em aumento significativo
4 nas importações brasileiras, demonstrando que há muito espaço para o crescimento da
5 ovinocultura no Brasil (D'ARAÚJO, 2001).

6 A elevada temperatura no ambiente é um dos principais fatores responsáveis
7 pela redução da fertilidade em animais criados em fazendas (EALY et al., 1995). Tem
8 sido relatado que a viabilidade de oócitos e embriões de vaca são menores durante as
9 estações quentes do que na época fria (MONTY e RACOWSKY, 1987; AL-
10 KATANANI et al., 2002). Esta estacional depressão do desempenho reprodutivo pode
11 ser causada por múltiplos fatores, incluindo ambiente inadequado, manejo, bem como a
12 idade e espécie-específica sensibilidade a estes fatores (BADINGA et al., 1985).

13 Este estudo visa abordar a problemática do estresse térmico nas funções
14 reprodutivas de ovinos, fornecendo dados fundamentais sobre os mecanismos de morte
15 celular em oócitos expostos a temperatura elevada, tendo como objetivo avaliar o efeito
16 do estresse térmico durante a MIV de oócitos da espécie ovina.

17 **MATERIAL E MÉTODOS**

18 Foram utilizados ovários oriundos de fêmeas ovinas SRD com idade variando
19 de 12 a 46 meses, abatidas no abatedouro Suimax, localizado na cidade de Igarassu,
20 Região Metropolitana do Recife-PE (latitude 08° 03' 14" S, longitude 34° 52' 52" W). A
21 temperatura ambiente mínima e máxima na estação seca (outubro a março) foi de 23 a
22 33°C e na chuvosa (abril a setembro) de 18 a 31°C, respectivamente. A umidade relativa
23 média do ar foi de 71% no período seco e 85% no período chuvoso (INMET, 2009).

1 Imediatamente após o abate, os ovários foram transportados ao laboratório em
2 garrafa térmica contendo solução fisiológica a 30°C acrescida de 30µg/mL de sulfato de
3 gentamicina em um período máximo de uma hora.

4 Os complexos cumulus oophorus (CCOs) foram coletados de folículos
5 ovarianos medindo entre 2 a 6 mm de diâmetro pela técnica de fatiamento. O líquido
6 folicular foi depositado em placa de Petri contendo o meio de colheita (MC) constituído
7 por 8,0 mg de bicarbonato de sódio, 45,0 mg de glucose, 5,6 mg de piruvato de sódio,
8 11,9 mg de HEPES, 2,5 mg de sulfato de gentamicina e 20,0 mg de álcool polivinílico
9 em 50 mL de TALP.

10 Os CCOs depositados em placa de Petri foram levados para seleção e
11 recuperação. Uma vez selecionados, com base na classificação morfológica descrita por
12 Gonçalves et al. (2008), os oócitos foram lavados (3 vezes) no meio MC. Após esta
13 etapa, foram colocados 25 oócitos em gotas de 100 µL sob óleo de parafina esterilizada,
14 no meio básico de maturação (MBM) constituído por TCM 199 suplementado com 50
15 µg/mL de piruvato de sódio, 2,6 mg/mL de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal
16 bovino (SFB), 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 20 µg/mL de FSH/LH (Pluset®) e 1
17 mg/mL de álcool polivinílico. Para a maturação *in vitro* (MIV), os oócitos foram
18 colocados em estufa a 39°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 24
19 horas.

20 Em 10 repetições por tratamento (n = 94-116 oócitos/tratamento), os CCOs
21 foram submetidos ao estresse térmico calórico a 41°C por 0 (termoneutralidade a 39°C),
22 3, 6, 12, 18 e 24 horas de maturação *in vitro*.

23 Após a maturação, os oócitos foram submetidos ao processo de fecundação *in*
24 *vitro* (FIV), utilizando sêmen fresco conforme Cavalcanti Neto (2004) na concentração
25 espermática de 2 X 10⁶/mL em meio definido modificado (mDM) de acordo com

1 Keskinetepe et al. (1998), constituído de 0,1250 g de glucose, 0,1552 g de bicarbonato
2 de sódio, 0,0069 g de piruvato de sódio, 0,0500 g de álcool polivinílico, 0,0500 g de
3 cafeína e 50 µg/mL de gentamicina em 50 mL de mDM, durante 18h.

4 Os zigotos foram mecanicamente desnudados no agitador mecânico Vortex® em
5 meio “Synthetic oviduct fluid” modificado (SOFm) durante três minutos a velocidade
6 “7” (escala 1-10), e 25 estruturas foram transferidas para as gotas de 100 µL do meio
7 SOFm, suplementados com 10% de SFB, sob óleo de parafina esterilizada. Essas
8 estruturas foram incubadas a 39°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, 5% O₂ e 90%
9 N₂ e depois de sete dias de cultivo, avaliou-se o número de células, taxa de clivagem e
10 quais alcançaram estádios de blastocisto.

11 A fragmentação de DNA, que é uma característica da apoptose, foi analisada
12 com o Teste de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick*
13 *and labeling*) (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a; ROTH e HANSEN, 2004). A
14 identificação de embriões positivos para apoptose e a morfologia nuclear embrionária
15 foi realizada com auxílio de um microscópio de fluorescência, com objetiva de 1000x.

16 A porcentagem de oócitos clivados foi determinada no dia 3 (D-3) e a
17 porcentagem de oócitos que se desenvolveram aos estádios de 8-16 células, mórula e
18 blastocisto foi determinada nos dias 4 (D-4), 5 (D-5) e 8 (D-8) após a fecundação,
19 respectivamente. A qualidade dos blastocistos formados no D-8 foi avaliada através da
20 contagem total de células por blastocisto com o corante DAPI e a determinação de
21 blastômeros positivos para apoptose através do teste de TUNEL.

22 Para a estatística foi realizada análise de variância pelo método dos quadrados
23 mínimos. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão (análise de variância
24 entre grupos). Considerando também as medidas tratadas em porcentuais, procedeu-se
25 uma comparação de variâncias, *teste F* para variâncias ao nível de significância 5% ($P <$

1 0,05). Depois, um teste *t* para comparação de médias, no nível de significância 5%, para
 2 variâncias equivalentes ou variâncias distintas, conforme o que foi verificado no teste *F*
 3 para variâncias (SAMPAIO, 2007).

4

5 RESULTADOS

6 Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) na média de oócitos
 7 recuperados. Na média da maturação *in vitro* foi observada diferença significativa ($P <$
 8 $0,05$) em todos os tempos de maturação expostos ao estresse. O mesmo ocorreu na
 9 média da FIV na qual foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) em quase a
 10 totalidade dos tempos de estresse térmico estudados, porém não sendo observada
 11 diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparado os tempos de 18 vs 24 horas de
 12 estresse térmico (Tabela 1).

13 Nos embriões no D-3 (clivados), embriões no D-4 e embriões no D-5 (mórula),
 14 foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) nos resultados dos tempos de 0, 3,
 15 6 e 12 horas de estresse térmico, não apresentando diferença significativa ($P > 0,05$)
 16 quando comparado os resultados nos tempos de 18 vs 24 horas de estresse térmico
 17 (Tabela 2).

18

19 **Tabela 1:** Média e desvio padrão de oócitos recuperados, maturados *in vitro* (MIV) e
 20 fecundados *in vitro* (FIV) da espécie ovina submetidos a diferentes tempos
 21 de estresse térmico na maturação.

Etapas da Produção <i>in</i> <i>vitro</i>	Tempo de estresse térmico na maturação a 41°C					
	0 h ($\bar{x} \pm s$)	3 h ($\bar{x} \pm s$)	6 h ($\bar{x} \pm s$)	12 h ($\bar{x} \pm s$)	18 h ($\bar{x} \pm s$)	24 h ($\bar{x} \pm s$)
Oócitos recuperados	107,2±5,22 ^a	110,4±5,66 ^a	106,7±4,92 ^a	100,8±4,28 ^a	101,6±4,16 ^a	99,8±5,73 ^a
Maturação <i>in</i> <i>vitro</i> (24h)	75,8±4,54 ^a	50,0±3,74 ^b	35,4±3,77 ^c	12,4±1,71 ^d	9,9±1,59 ^e	4,6±,96 ^f
Fecundação <i>in</i> <i>vitro</i> (18h)	42,0±5,03 ^a	26,7±2,94 ^b	19,1±1,72 ^c	5,9±1,19 ^d	3,3±0,94 ^e	2,9±0,73 ^e

22 Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo teste *t*.

23 \bar{x} = média, s = desvio padrão.

24

1 **Tabela 2:** Média e desvio padrão de embriões clivados (D-3), embriões (D-4) e mórulas
 2 (D-5) da espécie ovina submetidos a diferentes tempos de estresse térmico na
 3 maturação.

Etapas da Produção <i>in vitro</i>	Tempo de estresse térmico na maturação a 41°C					
	0 h ($\bar{x} \pm s$)	3 h ($\bar{x} \pm s$)	6 h ($\bar{x} \pm s$)	12 h ($\bar{x} \pm s$)	18 h ($\bar{x} \pm s$)	24 h ($\bar{x} \pm s$)
Embriões (D-3)	32,5±3,97 ^a	20,0±2,49 ^b	11,5±1,08 ^c	3,4±0,84 ^d	2,4±0,51 ^e	2,7±0,82 ^e
Embriões (D-4)	24,3±2,62 ^a	14,5±2,06 ^b	6,9±0,73 ^c	2,6±0,51 ^d	1,4±0,69 ^e	1,9±0,73 ^e
Mórulas (D-5)	19,9±2,68 ^a	11,0±2,21 ^b	3,8±0,63 ^c	2,4±0,51 ^d	1,0±0,81 ^e	0,7±0,67 ^e

4 Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo *teste t*.

5 \bar{x} = média, s = desvio padrão.

6

7 Nos embriões cultivados até D-8 foi observada diferença significativa ($P < 0,05$)

8 à medida que aumentava os tempos de estresse térmico. Tendo o grupo controle (GC)

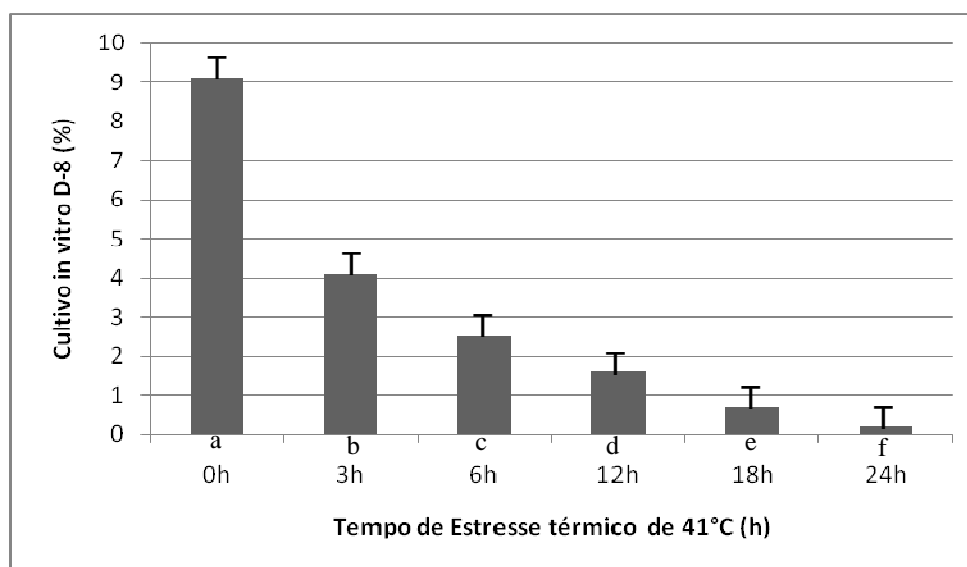
9 (0h) obtido $9,14 \pm 2,44$ (% \pm s) de embriões em estágio de blastocisto e os demais

10 grupos $4,16 \pm 0,96$, $2,53 \pm 1,25$, $1,58 \pm 0,51$, $0,68 \pm 0,67$ e $0,20 \pm 0,42$ dos blastocistos

11 (D-8) obtidos dos oócitos maturados expostos ao estresse térmico de 41°C por 3, 6, 12,

12 18 e 24 horas, respectivamente (Figura 1).

13



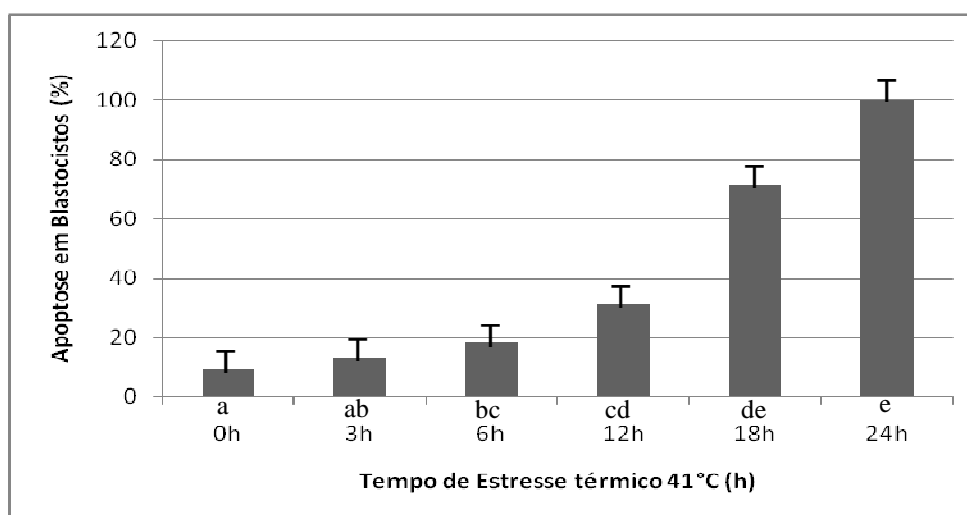
14

15 **Figura 1:** Porcentagem e desvio padrão de embriões ovinos PIV ($P < 0,05$)
 16 pelo *teste F*, no D-8 (blastocistos) em diferentes tempos de estresse térmico
 17 calórico.

18

1 Nos embriões produzidos *in vitro* (PIV) positivos para Apoptose (Teste de
 2 TUNEL) cultivados até o D-8, foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) à medida
 3 que aumentava os tempos de estresse térmico estudados. Não foi observado diferença
 4 significativa ($P > 0,05$) nos embriões apoptóticos de ovinos com 0 vs 3, 3 vs 6, 6 vs 12,
 5 12 vs 18 e 18 vs 24 horas quando comparado o percentual de embriões TUNEL
 6 positivos. Tendo o GC (0h) obtido $9,18 \pm 0,56$ (% \pm s) de embriões em estágio de
 7 blastocisto positivos para o teste de Tunel e os demais grupos $13,04 \pm 0,51$, $18,51 \pm$
 8 $0,52$, $31,25 \pm 0,52$, $71,42 \pm 0,52$ e $100 \pm 0,42$ dos embriões produzidos com oócitos
 9 maturados expostos ao estresse térmico de 41°C por 3, 6, 12, 18 e 24 horas,
 10 respectivamente (Figura 2).

11



12

13 **Figura 2:** Porcentagem e desvio padrão de apoptose diagnosticada pelo
 14 TUNEL em embriões ovinos PIV ($P < 0,05$) pelo *teste F*, no D-8 em vários
 15 tempos de estresse térmico calórico.

16

17 DISCUSSÃO

18 Freitas et al. (2007) utilizando meio de maturação composto de TCM-199
 19 suplementado com cisteamina e fator de crescimento epidermal, obtiveram uma taxa de
 20 MIV de 33,3%, valores inferiores aos encontrados no GC deste estudo (70,70%).
 21 Independente do sistema de cultivo, as taxas de maturação de oócitos são similares
 22 (HOLM et al., 1994). Contudo, após transferência para receptoras sincronizadas, a PIV

1 de zigotos em meio SOF, reduziu a viabilidade do embrião para 15,0% a 25,0% em
2 comparação ao co-cultivo (RANILLA et al., 1998) e ao desenvolvimento no oviduto
3 (HOLM et al., 1996).

4 Durante o cultivo e o desenvolvimento na pré-implantação, perturbações no
5 microambiente do embrião podem levar à inibição do desenvolvimento e a morte
6 embrionária (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a). O presente estudo é o primeiro
7 relato em ovinos que indica uma evolução em tempo de estresse térmico. Mesmo que a
8 PIV na espécie esteja em evolução (PAULA et al., 2008), foram obtido 9,14% de
9 blastocistos no GC, reduzindo em número a medida que aumentava o tempo de estresse
10 térmico calórico. A escolha do tempo de exposição ao estresse térmico foi baseada em
11 estudos anteriores que demonstraram a susceptibilidade oocitária a períodos similares
12 de estresse térmico (PAYTON et al., 2004; JU e TSENG, 2004). As temperaturas
13 escolhidas refletem o intervalo médio de temperatura corporal aferida em animais
14 expostos ao estresse térmico *in vivo* (RIVERA e HANSEN, 2001).

15 Neste estudo, as taxas de blastocistos no D-8, foram baixas em comparação as
16 encontradas por Baldassare et al. (1996) e Gómez et al. (1998) utilizando meio SOF
17 suplementado com albumina sérica bovina (BSA), obtiveram 21% de blastocistos e
18 Holm et al. (1991) suplementando o mesmo meio com soro humano (SH) e Ptak et al.
19 (1999) suplementando com albumina sérica bovina (BSA) e SFB, obtiveram 25% e
20 30% de blastocistos, respectivamente.

21 Foi observado que neste estudo ocorreu uma redução gradativa nos oócitos
22 maturados à medida que o tempo de exposição ao choque térmico aumentava, refletindo
23 diretamente em cada fase da PIV de embriões bovinos. De acordo com Zavy (1994) e
24 Ealy et al. (1995), estas fases são mais vulneráveis durante a MIV (ovulação),
25 fecundação, dentro de 2 dias após fecundação e, na primeira divisão de clivagem,

1 evidenciado neste estudo após as 12h de estresse térmico, reduzindo o número de
2 blastocistos.

3 Ju et al. (1999) observaram que o choque térmico em oócitos bovinos por uma
4 hora a 40 ou 42°C não teve efeitos deletérios sobre blastocistos formados após FIV. Já
5 em outro estudo, a taxa de formação de blastocisto diminui quando o choque térmico é
6 sustentado por 12 horas a 41°C (EDWARDS e HANSEN, 1997) se acentuando à
7 medida que aumenta o tempo de exposição. Quando aumenta a temperatura a 43°C, a
8 competência do desenvolvimento dos oócitos tratados é severamente reduzida na
9 sequência de uma exposição de 45 minutos (JU et al., 1999), sendo a temperatura e a
10 duração de exposição deste choque fatores limitantes na PIV (EALY et al., 1995; JU et
11 al., 1999; TSENG et al., 2004).

12 Ealy et al. (1995) e Tseng et al. (2004) observaram que embriões de bovinos de
13 duas células, quando submetido a um choque térmico a 40°C por 3h, não produzia
14 efeito sobre o desenvolvimento embrionário. Estes autores observaram que, a
15 competência do desenvolvimento diminuiu quando aquecido a 41°C e a 42°C durante
16 um período mais longo de tempo (12h). Estes efeitos também foram relatados em
17 embriões suínos por Ju e Tseng (2004). Para estes autores, parece claro que os efeitos
18 das condições produzidas por altas temperaturas sobre a viabilidade e desenvolvimento
19 da competência dos oócitos e embriões depende tanto da temperatura como da duração
20 da exposição ao choque térmico.

21 Ealy et al. (1993) avaliaram a termotolerância de embriões bovinos pela
22 introdução de choque térmico para o animal nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 após a inseminação,
23 seguido por análise de viabilidade e as fase de embriões recuperados a partir do útero no
24 D-8. A partir do D-3 os embriões adquiriram uma resistência maior ao calor com a
25 progressão dos estádios de desenvolvimento. Ju et al. (1999) estudando o estresse

1 térmico em bovinos observaram que um aumento substancial na termotolerância é
2 adquirido no D-4, em embriões provenientes de FIV. Quando os embriões são obtidos
3 de oócitos que durante a maturação receberam altos níveis de estresse térmico, reduz-se
4 o número de estruturas e sendo o estresse por mais de 12h diminui o número de
5 blastocistos PIV (ROTH e HANSEN, 2004a).

6 Paula-Lopes e Hansen (2002a) obtiveram 27,6% dos blastômeros bovinos
7 positivos para marcação TUNEL após exposição a 41°C por 9h. Taxas aproximadas
8 foram obtidas neste estudo, com tempos de exposições de 6h e 12h, sendo 18,51 e
9 31,25%, respectivamente. Paula-Lopes e Hansen (2002a) concluíram que é possível
10 observar, que apoptoses mais extensas podem ocorrer após estresses mais severos,
11 comprometendo o desenvolvimento embrionário, como observado neste estudo durante
12 18 e 24h de estresse, onde as alterações de DNA nos blastocistos com marcação
13 TUNEL positivo chegaram a 71,42 e 100% dos embriões obtidos, respectivamente.

14 A temperatura que induziu a apoptose incluindo aquela característica do choque
15 térmico a 41°C salientou-se também em ovinos, sugerindo que a apoptose pode ser
16 induzida na pré-implantação de embriões expostos à hipertermia materna (PAULA-
17 LOPES e HANSEN, 2002ab). Além disso, o grau de apoptose vivido pelos embriões
18 PIV, geralmente reflete a severidade do choque térmico. Neste estudo, o porcentual de
19 células que foram TUNEL positivas com o aumento do tempo do estresse térmico
20 produziu aumento da apoptose, aumentando com a duração do choque térmico. A
21 indução de apoptose foi tempo dependente e o número de células apoptóticas aumentou
22 proporcionalmente após 6, 12, 18 e 24h de exposição, como observado por Paula-Lopes
23 e Hansen (2002ab) em exposições de até 12h.

24 Atualmente, mais informações estão disponíveis nas respostas fisiológicas das
25 células dos oócitos e embriões mamíferos submetidas ao estresse térmico em

1 temperaturas elevadas (PAYTON et al., 2004; JU e TSENG, 2004; JU, 2005). Segundo
2 estes autores, mais conhecimentos serão úteis na solução ou no desenvolvimento de
3 estratégias para minimizar a baixa fertilidade e alta mortalidade dos embriões das
4 espécies domésticas nas estações quentes. Para compreender melhor os mecanismos de
5 lesão térmica ou termotolerância, mais trabalhos sobre os efeitos do estresse térmico
6 durante a maturação em oócitos e embriões serão necessários em ovinos.

7 **CONCLUSÃO**

8 Nas condições observadas neste estudo, os resultados permitem concluir que o
9 tempo em que o oócito ovino é exposto ao estresse térmico durante a maturação *in vitro*
10 é de grande importância para definir o desenvolvimento embrionário e o nível
11 apoptótico de suas células.

12

13 **AGRADECIMENTOS**

14 Agradecemos à Empresa Suimax, seus diretores e funcionários por
15 disponibilizar os animais necessários a execução deste experimento.

16

17 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

18

19 ANUALPEC - **Anuário da Pecuária Brasileira**, 2008. São Paulo, p. 291.

20

21 AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and
22 exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal Dairy Science**,
23 v.85, p.390-396, 2002.

24

25 BADINGA, L. et al. Effects of climatic and management factors on conception rate of
26 dairy cattle in subtropical environment. **Journal Dairy Science**, v.68, p.78-85, 1985.

27

28 BALDASSARE, H. et al. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic
29 folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors.
30 **Theriogenology**. n.45, p.707-717, 1996.

- 1
2 CAVALCANTI NETO, C. C. Uso do retinol na produção *in vitro* de embriões caprinos.
3 113p. 2004. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em
4 Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Ferais.
5
6 D'ARAÚJO C. F. A. Apresentação de dados sobre a importância econômica e social das
7 palestras técnicas previstas no programa. In: Reunião Técnica "Apoio a Cadeia
8 Produtiva da Ovinocaprinocultura Brasileira (CNPq)", Brasília. **Anais...** Brasília, p.10-
9 15, 2001.
10
11 EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic
12 resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal Dairy Science.**
13 v.76, p.2899-2905, 1993.
14
15 EALY, A.D. et al. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat
16 shock and use of antioxidants as thermoprotectants. **Journal of Animal Science.** v.73,
17 p.1401-1407, 1995.
18
19 EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and
20 preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development,**
21 v.46, p.138-145, 1997.
22
23 FREITAS, V. J. F. et al. Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes
24 explorados no nordeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 (Supl. 3), p.781-
25 786, 2007.
26
27 GÓMEZ, M. C. et al. Cleavage, development and competence of sheep embryos
28 fertilized by intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization. **Theriogenology.**
29 v.49, n.8, p.1143-1154, 1998.
30
31 GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B.
32 D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J, V. F. (2ª ed.), **Biotécnicas aplicadas à**
33 **reprodução animal**, Editora Roca, São Paulo, p.261-292, 2008.
34

- 1 HOLM, P. et al. *In vitro* production of sheep blastocysts from IVM-oocytes using
2 frozen semen and oviduct epithelial cell co-culture for IVF. **Theriogenology**. v.35, n.3,
3 p.214-216, 1991.
- 4
- 5 HOLM, P. et al. *In vitro* vs *in vivo* culture of ovine IVM/IVF ova: effect on lambing.
6 **Theriogenology**, v.41, n.4, p.217, 1994.
- 7
- 8 HOLM, P.; WALKER, W. H.; SEAMARK, R. F. Embryo viability, duration of
9 gestation and birth weight in sheep after transfer of *in vitro* matured and *in vitro*
10 fertilized zygotes cultured *in vitro* or *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**,
11 v.107, p.175-181, 1996.
- 12
- 13 INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em:
14 <http://www.inmet.gov.br/html/prev_climatica_tempo/prognostico>. Acesso em: 23 abr.
15 2009.
- 16
- 17 JU, J. C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to
18 molecular signaling. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.79-90, 2005.
- 19
- 20 JU, J. C.; PARKS, J. E.; YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes
21 and embryos after shortterm heat shock. **Molecular Reproduction and Development**,
22 v.53, p.336-340, 1999.
- 23
- 24 JU, J. C., TSENG J. K. Nuclear and cytoskeletal alterations of *in vitro* matured porcine
25 oocytes under hyperthermia. **Molecular Reproduction and Development**, v.68, p.125-
26 133, 2004.
- 27
- 28 KESKINTEPE, L.; SIMPLICIO, A. A.; BRACKETT, B.G. Caprine blastocyst
29 development after *in vitro* fertilization with spermatozoa frozen in different extenders.
30 **Theriogenology**, v.49, n.7, p.1265-1274, 1998.
- 31
- 32 MONTY, D. E.; RACOWSKY, C. *In vitro* evaluation of early embryo viability and
33 development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. **Theriogenology**,
34 v.28, n.4, p.451-465, 1987.

- 1
2 PAULA, N. R. O. et al. Embriões caprinos produzidos *in vivo* ou *in vitro*: técnicas,
3 problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte,
4 v.32, n.1, p.21-35, 2008.
5
6 PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine
7 preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and**
8 **Biophysical Research Communicator**, v.295, p.37-42, 2002a.
9
10 PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Heat Shock-Induced Apoptosis in
11 Preimplantation Bovine Embryos. Is a Developmentally Regulated Phenomenon.
12 **Biology of Reproduction**, v.66, p.1169–1177, 2002b.
13
14 PAYTON, R. R. et al. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from
15 antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.71,
16 p.1303-1308, 2004.
17
18 PTAK, G. et al. Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production,
19 vitrification and birth of offspring. **Theriogenology**. v.52, n.8, p.1105-1114, 1999.
20
21 RANILLA, M. J. et al. The incidence of embryo and fetal loss following the transfer of
22 *in vitro*-cultured sheep embryos. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.248, 1998.
23
24 ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental
25 competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of**
26 **Reproduction**, v.71, p.1898-1906, 2004.
27
28 RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after
29 exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v.121, p.107-
30 115, 2001.
31
32 SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**, 3ª Ed.. Belo
33 Horizonte: FEPMVZ, 2007. 264p.
34

- 1 SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F. Biotécnicas da reprodução
2 como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução**
3 **Animal**, v.31, n.2, p.234-246, 2007.
4
- 5 TSENG, J. K. et al. Influences of follicular size on parthenogenetic activation and *in*
6 *vitro* heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes. **Reproduction in Domestic**
7 **Animal**, v.39, p.146-153, 2004.
8
- 9 ZAVY, M. T. Embryonic mortality in cattle. *In*: Zavy MT, RD Geisert (1ª Ed.).
10 **Embryonic mortality in domestic species**. Boca Raton: CRC Press. p.99-140, 1994.
11
12
13