

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**EFEITO DAS ESTAÇÕES DO ANO NAS ALTERAÇÕES  
CELULARES DE OÓCITOS E EMBRIÕES DA ESPÉCIE  
OVINA**

**Filipe Queirós Gondim Bezerra**

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

**Recife-PE  
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**Filipe Queirós Gondim Bezerra**

**EFEITO DAS ESTAÇÕES DO ANO NAS ALTERAÇÕES  
CELULARES DE OÓCITOS E EMBRIÕES DA ESPÉCIE  
OVINA**

**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

B574e Bezerra, Filipe Queirós Gondim  
Efeito das estações do ano nas alterações celulares de  
oócitos e embriões da espécie ovina / Filipe Queirós Gondim  
Bezerra. – 2010.  
112 f. : il.

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

CDD 636.08926

1. Complexo
2. *Cumulus oophorus*
3. Bastocistos
4. Apoptose
5. Caspase
6. Folículo
7. Ovino
- I. Oliveira, Marcos Antônio Lima de
- II. Título

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

**EFEITO DAS ESTAÇÕES DO ANO NAS ALTERAÇÕES CELULARES DE  
OÓCITOS E EMBRIÕES DA ESPÉCIE OVINA**

Tese de Doutorado elaborada por

**FILIPE QUEIRÓS GONDIM BEZERRA**

Aprovada pela

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

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

---

**Paulo Fernandes de Lima**  
Prof. Dr. UFRPE - Examinador

---

**Adalto Chiamenti**  
Prof. Dr. IFRN - Examinador -

---

**Marcelo Cavalcanti Rabelo**  
Dr. SARA-PE - Examinador -

---

**Elielete Maria Pires de Azevedo**  
Dra. PREFEITURA DO RECIFE - Examinadora -

**UFRPE**  
**Recife, 22 de fevereiro de 2010**

*O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.*  
(Thomas Huxley)

*" Experiência não é o que aconteceu com você; mas o que você fez com o que lhe aconteceu "*  
( Aldous Huxley )

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, pela força que me impulsionou nunca deixando desistir.

Aos meus pais, (Newton e Silvanete) e irmã (Amanda) que mesmo longe conseguem transmitir todo amor, orientação, lição de vida e apoio em tudo que faço.

Ao meu amado filho Rafael que me estimulou para concluir mais esta etapa de minha vida.

A minha esposa e grande amiga, Luciana, pelo companheirismo e amor imprescindíveis, estando sempre ao meu lado, inclusive nas maiores turbulências. Que Deus possa abençoá-la em todos os seus desafios, pois, sem seu apoio incondicional, a realização desse trabalho não teria sido possível.

Ao professor Marcos Antônio Lemos de Oliveira, pela orientação, respeito e paciência sempre dispensados, até nos momentos mais tensos.

Aos amigos da Pós-Graduação, Arthur Nascimento, Cristiano, Edvaldo Rosas, Espedito, José Monteiro, Leopoldo, Marcelo Rabelo, Ricardo Chaves pelo apoio irrestrito, companheirismo, amizade e companhia nos experimentos de pesquisa.

Aos funcionários da UFRPE, Dona Sônia, Alcir, Joana e Edna pela ajuda e ao apoio durante todo o Doutorado.

A empresa SUIMAX que administra o matadouro de Igarassu, seu proprietário Sr. Natal, seu gerente Maurício, o colega veterinário Pedro e todos os seus funcionários pela gentileza e fornecimento do material utilizado na pesquisa.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por terem participado do desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa de Incentivo para Capacitação de Docentes da CAPES, pelo apoio na realização desta pesquisa.

À Profa. Claudia pela forma gentil que sempre me atendeu e pela realização da estatística dos artigos.

A banca examinadora pela atenção dispensada na correção deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram e aqui não estão citados.

A todos os animais, que mesmo inocentemente, contribuíram de forma indispensável para o meu desenvolvimento e evolução científica.

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
LISTAS DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Oogênese e Maturação <i>in vitro</i> .....	3
2.2. Meios de maturação e cultivo <i>in vitro</i> .....	12
2.3 Adaptação e aclimatação ambiental.....	15
2.4 Estresse térmico Calórico.....	19
2.4.1 Consequências do estresse térmico no sistema reprodutivo.....	21
2.5 Morte Celular Programada.....	27
2.5.1 Apoptose oocitária e embrionária.....	33
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
4. CAPÍTULO I.....	62
5. CAPÍTULO II.....	79



**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
- E<sub>2</sub> – 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

M II – 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

P<sub>4</sub> – Progesterona

pc – Picograma

PBS – *Phosphate-Buffered Saline*

PIV – Produção *in vitro*

PV – Peso vivo

PVA – Álcool polivinílico

PVP – Polivinilpirrolidona

RNA – Ácido ribonucléico

RNA<sub>m</sub> – 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 FIGURAS**

	<b>Página</b>
Figura 1 Porcentagem de blastocistos positivos para Apoptose (Fragmentação do DNA) em fêmeas ovinas ( $P < 0,05$ ) pelo teste F, abatidos nas estações seca e chuvosa na Região Metropolitana do Recife.....	71
Figura 2 Efeito das estações seca e chuvosa na atividade das enzimas Caspase do grupo II de oócitos recuperados (REC.) e maturados <i>in vitro</i> (MIV) da espécie ovina ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.....	89
Figura 3 Efeito das estações seca e chuvosa na fragmentação de DNA (Tunel) de oócitos recuperados (REC) e maturados <i>in vitro</i> (MIV) da espécie ovina ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.....	89
Figura 4 Frequência respiratória (FR) e Temperatura retal (TR) de ovinos nas estações seca e chuvosa.....	90

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1 Tabela 1: Média e desvio padrão de oócitos recuperados, maturados <i>in vitro</i> (MIV) e fertilizados <i>in vitro</i> (FIV) da espécie ovina abatidas nas estações seca e chuvosa na Região Metropolitana do Recife-PE.....	70
Tabela 2 Média e desvio padrão de embriões CIV (D-3), CIV (D-4), mórula (D-5) e blastocistos (D-8) da espécie ovina abatidas nas estações seca e chuvosa na Região Metropolitana do Recife-PE.....	70
Tabela 3 Média e desvio padrão da qualidade de complexo <i>cumulus oophorus</i> (CCOs) recuperados não maturados de fêmeas ovinas abatidas na região Metropolitana do Recife.....	87
Tabela 4 Média e desvio padrão da qualidade de complexo <i>cumulus oophorus</i> (CCOs) maturados <i>in vitro</i> (MIV) da espécie ovina abatidas na região Metropolitana do Recife.....	87
Tabela 5 Média e desvio padrão do estágio da maturação nuclear de oócitos da espécie ovina abatida na região Metropolitana do Recife.....	88

**Título:** Efeito das estações do ano nas alterações celulares de oócitos e embriões da espécie ovina

**Autor:** Filipe Queirós Gondim Bezerra

**Orientador:** Marcos Antonio Lemos de Oliveira

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar o efeito das estações do ano na maturação nuclear *in vitro* e na indução da morte celular por apoptose em oócitos ovino também como o efeito na capacidade de desenvolvimento de oócitos na produção *in vitro* de embriões da espécie ovina. Os ovários de ovelhas na estação seca (outubro a março) e chuvosa (abril a setembro) foram colhidos em abatedouro e transportados ao Laboratório de Biotécnicas da Reprodução da UFRPE. Os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) foram colhidos pela técnica de “*slicing*” dos folículos entre 2 a 6 mm de diâmetro e selecionados com base na morfologia. Nesta etapa foram realizadas 12 repetições, onde os CCOs foram submetidos a maturação, fertilização e cultivo *in vitro*. A porcentagem de oócitos clivados foi determinada no dia 3 (D-3) e os oócitos que se desenvolveram aos estádios de 8-16 células (D-4), mórula (D-5) e blastocisto (D-8) após a fecundação. A qualidade dos blastocistos foi avaliada com o corante DAPI e a determinação de blastômeros positivos para apoptose e fragmentação de DNA através do teste de TUNEL. Foi encontrada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nas fases fertilização, D-3 e D-4. Não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) às fases de maturação *in vitro*, mórula e blastocisto e na fragmentação de DNA (TUNEL). Em outra etapa 25 oócitos foram colocados em meio básico de maturação (MBM). Após a maturação, foi determinado o estágio de maturação nuclear com o corante DAPI, a atividade das enzimas Caspases do grupo II com reagente PhiPhiLux-G<sub>1</sub>D<sub>2</sub> e fragmentação de DNA (TUNEL). Nos estádios de maturação nuclear as fases de Vesícula Germinativa, Metáfase I, Telófase I e Metáfase II não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Foi encontrada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na atividade das enzimas Caspases dos oócitos maturados *in vitro*. A fragmentação do DNA não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Nas condições observadas neste estudo, os resultados permitem concluir que não houve efeito da estação do ano na maturação nuclear *in vitro* e na apoptose de oócitos também como na capacidade de desenvolvimento de oócitos e na produção *in vitro* de embriões da espécie ovina.

**Palavras-chave:** Complexos *cumulus oophorus*, fertilização, blastocisto, apoptose, folículos, caspase

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA  
Tese de Doutorado em Ciência Veterinária  
Recife, 22 de fevereiro de 2010

**Title:** Effect of seasons on cellular changes of oocytes and embryos of sheep.

**Author:** Filipe Queirós Gondim Bezerra

**Advisor:** Marcos Antonio Lemos de Oliveira

## **ABSTRACT**

This study aimed to determine the effect of seasons on nuclear maturation *in vitro* and inductions of cell death by apoptosis in sheep oocytes as well as the effect on the ability of develop from oocytes *in vitro* sheep embryos. The ewes ovaries during the dry season (October to March) and rainy season (April-September) 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 morphology. In this stage were performed 12 repetitions, where the COCs were subjected to maturation, and *in vitro* fertilization. The percentage of cleaved oocytes was determined on day 3 (D-3) and the oocytes that developed to the stages of 8-16 cells (D-4), morula (D-5) and blastocyst (D-8) after fertilization. The blastocysts quality was assessed with the pigment DAPI and the determination of blastomeres positive for apoptosis and DNA fragmentation by TUNEL test. It was found significant difference ( $P < 0.05$ ) during D-3 and D-4 fertilization stages. No significant difference ( $P > 0.05$ ) was observed on morula and blastocyst *in vitro* maturation phases and DNA fragmentation (TUNEL). In the stage 25 oocytes were placed in maturity basic medium (MBM). After maturation, we determined the stage of maturity with the nuclear dye DAPI, the enzyme activity of group II caspases with reagent PhiPhiLux-G1D2 and DNA fragmentation (TUNEL). In the stages of nuclear maturation stages of germinal vesicle, metaphase I, telophase I and metaphase II showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). Significant difference ( $P < 0.05$ ) in enzyme activity of caspases *in vitro* matured oocytes. The DNA fragmentation was not significantly different ( $P > 0.05$ ). Under the conditions observed in this study, the results indicate that there was no effect of season on *in vitro* nuclear maturation and apoptosis of oocytes as well as on the development of oocytes and *in vitro* production of sheep embryos.

**Key words:** Cumulus oophorus, fertilization, blastocyst, apoptosis, follicle, caspase, TUNEL

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA  
Doctor's Thesis Veterinary Science  
Recife, February 22, 2010



## 1. INTRODUÇÃO

O rebanho ovino no Brasil atinge a cifra de 16.628.571 cabeças, sendo destas aproximadamente 60% localizadas na região Nordeste do país (IBGE/PPM, 2008). Apesar de deter mais da metade do rebanho ovino, o Nordeste necessita de pesquisas e tecnologias para minimizar a relação custo/benefício do sistema de produção, estimulando o desenvolvimento e criando novas possibilidades de agronegócio. A baixa produtividade dos rebanhos locais tem sido contornada através da importação de raças exóticas para o semi-árido nordestino, porém é preciso cautela devido à susceptibilidade destas raças as temperaturas elevadas encontrada nesta região.

A tolerância ao calor e a adaptabilidade a ambientes tropicais e subtropicais são fatores muito importantes na produção ovina (BARBOSA et al., 1995). Dessa forma, temperaturas elevadas e radiação solar intensa, condições prevalentes no agreste e semi-árido nordestino durante quase todo o ano, podem levar os animais ao estresse calórico ocasionando declínio na produção em virtude da queda no consumo de matéria seca (GUERRINI, 1981) e na eficiência digestiva (BHATTACHARYA e HUSSAIN, 1974), além de aumentar as exigências de energia de manutenção dos animais (MCDOWELL, 1969).

Alguns estudos já demonstraram que em ruminantes a exposição de oócitos ao estresse térmico *in vivo* ou *in vitro* reduz de maneira dramática o desenvolvimento embrionário e as taxas de gestação, pouco se sabe sobre a susceptibilidade dos oócitos de ovinos a temperatura elevada. Em bovinos, o estresse térmico calórico *in vitro* reduz o potencial de maturação, fecundação e de desenvolvimento do oócito bem como induz alterações celulares típicas de apoptose (ROTH e HANSEN, 2004a; 2005). Estudos recentes indicaram que a morte celular por apoptose é um mecanismo importante

responsável pela redução na competência oocitária induzida pelo estresse térmico. Nesses estudos, o bloqueio da apoptose resgatou a capacidade de desenvolvimento de oócitos expostos a temperatura elevada (ROTH e HANSEN, 2004a).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo determinar as alterações celulares induzidas pelo estresse térmico calórico e o efeito das estações seca e chuvosa na indução de apoptose durante a maturação *in vitro* de oócitos e produção *in vitro* de embriões da espécie ovina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Oogênese e Maturação *in vitro*

Oogênese é o processo de formação, crescimento e maturação dos gametas femininos. Esse processo começa na vida fetal e continua após o nascimento, passa por uma aceleração durante a puberdade e se completa na ovulação, quando o ovócito maduro é liberado do folículo. A ruptura do folículo de Graaf, na ovulação esta sob o controle de hormônios gonadotróficos e depende de um correto balanço endócrino (DERIVAUX, 1980).

Durante o preleptóteno, fase que antecede a prófase 1 da meiose, ocorre a replicação do DNA para então, dar início à meiose. Esta atividade de síntese marca a transformação da ovogônia em ovócito. Os ovócitos então formados passam sucessivamente, pelos estágios de prófase, anáfase, e telófase de primeira divisão meiótica (BETTERIDGE et al., 1989). Em fêmeas o processo meiótico é interrompido por dois períodos de desenvolvimento, na primeira interrupção da meiose os ovócitos permanecem em estágios de diplóteno conhecido como estágio de dictióteno ou vesícula germinativa (VG), onde permanecem até atingir a puberdade quando são estimulados a reassumir a meiose antes da ovulação (TSAFRIRI e KRAICER, 1972). A retomada da meiose ocorre imediatamente após um estímulo hormonal *in vivo* ou simplesmente pela retirada do ovócito de dentro do folículo ovariano *in vitro*. Os oócitos sofrem progressão nuclear do estágio de diplóteno da prófase 1 da primeira divisão meiótica para metáfase II (DEKEL et al., 1988; HYTTEL et al., 1989; SUN e MOOR, 1991). A progressão do estágio de dictiose para metáfase II é caracterizada como maturação meiótica. Essa maturação se caracteriza pelo rompimento da vesícula germinativa,

condensação da cromatina, separação dos cromossomos homólogos e a emissão do primeiro corpúsculo polar, os cromossomos se organizam do mesmo plano formando a placa equatorial, estágio que corresponde à metáfase II. (SUM et al., 2001; SILVA et al., 2002) Nesse período, ocorre a segunda interrupção da meiose e essa somente será retomada se o oócito for fertilizado pelo espermatozóide. A ativação do ovócito pelo espermatozóide durante a fecundação estimula o término da meiose (segunda divisão reducional) ocorrendo a separação da cromatina e a emissão do segundo corpúsculo polar caracterizando assim, o final da ovogênese (WASSARMAN, 1994 )

A maturação nuclear refere-se à habilidade do núcleo em retomar a meiose, ou seja, chegar ao estágio de metáfase da segunda divisão meiótica-Meta II, o que pode ser observado por microscopia através da extrusão do primeiro corpúsculo polar (MERMILLOD et al., 2008), o que ocorre entre 16 e 24h após o início da MIV(COGNIÉ et al., 2003). A compreensão do processo da maturação de oócitos fora do organismo teve início com Pincus e Enzman (1935), quando observaram que oócitos de coelhas retirados do ambiente folicular e condicionados em meio de cultura com as condições mínimas de pH e osmolaridade retomavam a meiose espontaneamente. Resultados semelhantes foram encontrados com oócitos de camundongos, ovelhas, vacas, porcas, humanos e macacos (EDWARDS, 1965).

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

Com aprimoramento nos meios de maturação de oócitos, Fulka et al. (1982), perseguindo os mesmos objetivos, obtiveram taxas de 45% de formação pró-nuclear, evitando a importância da etapa da maturação no processo de produção *in vitro* (PIV) de embriões. Utilizando sêmen congelado e capacitando em meio altamente iônico, preconizado por Brackett e Oliphant (1975), Fukui et al. (1983) alcançaram taxas de 27% de formação pró-nuclear em fertilização de oócitos MIV.

O conhecimento que célula do *cumulus oophorus* são de fundamental importância no processo de maturação de oócitos *in vitro*, pela alta taxa de formação pró-nuclear após a FIV (BALL et al., 1983), contribuiu de forma significativa na obtenção de resultados mais consistentes no processo de maturação de oócitos. Com a inserção de melhorias no processo de maturação e, utilizando meio isotônico na capacitação espermática bovina, um percentual de fecundação acima de 58% foi obtido por Iritani et al. (1984). Taxa de clivagem de 15% foi relatada por Hensleigh e Hunter (1985), quando oócitos bovinos, depois de MIV por 48 horas, foram fecundados com sêmen congelado.

Bases consistentes que impulsionaram a PIV de embriões bovinos em maior escala, a partir de oócitos imaturos foram alcançadas quando Frayrer-Hosken et al. (1986), Lu et al. (1987) e Sirard et al. (1988) obtiveram o desenvolvimento de oócitos MIV e FIV até o estágio de blastocistos, obtidos inicialmente, após a transferência de zigotos ou embriões clivados dentro de ovidutos, resultando em prenhez, após a transferência do embrião.

Desta forma, ressalta-se a importância das condições da maturação de oócitos, pois a mesma afeta de forma significativa à capacidade de fecundação, determinando precocemente a competência do desenvolvimento embrionário, predominantemente no

estádio inicial de clivagem em consequência do RNAm ter origem dos pools nos oócitos (SIRISATHIEN, 2002).

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

Os oócitos produzem substancias reguladoras com função relacionada à atividades das células do *cumulus*, bem como componentes dessas células somáticas atuam ativamente no mecanismo de crescimento e maturação oocitária. Mesmo não sendo essenciais para a maturação de oócitos, maior eficiência é observada, quando as células do *cumulus* estão presentes nos processos de maturação, fertilização e desenvolvimento de embriões, evidenciando a importância dessas células na maturação de oócitos *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008).

As células da granulosa, sob ação das gonadotrofinas hipofisárias, secretam o líquido folicular, que como consequência do acúmulo acentuado desse líquido, promove a dissociação dessas células e a formação de uma grande cavidade repleta de fluido, denominada de antro folicular (HAFEZ, 2000). O crescimento do oócito cessa após a formação do antro que, no bovino, atinge o diâmetro que varia de 1,7 a 2,0 mm (MOTLIK, 1989). Há correlação entre o grau de metabolismo do oócito e o tamanho do folículo, onde oócitos de folículos grandes podem iniciar o fenômeno metabólico da maturação, enquanto que os de folículos pequenos continuam com o metabolismo característico de oócitos imaturos (RODRIGUEZ et al., 2003). Desta forma, torna-se

evidente, porque em folículos terciários que não atingem o completo desenvolvimento estão presentes oócitos incapazes de completar a meiose (SIRARD e COENEN, 1993).

No procedimento *in vitro*, oócitos de mamíferos que atingem o estágio de diplóteno da primeira prófase da meiose, reiniciam espontaneamente a maturação meiótica quando não estão sob a influência do ambiente folicular (PINCUS e ENZMANN, 1935; EDWARDS, 1965; THIBAUT, 1973; SIRARD e COENEN, 1993). Nesse processo realizado sem a ação das gonadotrofinas, ocorre rompimento da vesícula germinativa, início da condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo compacto e do envelope nuclear. Desta forma, em todos os mamíferos, a maturação nuclear pode ocorrer quando são removidos de folículos antrais e cultivados *in vitro* (THIBAUT et al., 1987). De modo semelhante à maturação *in vitro*, em seguida a expulsão do primeiro corpúsculo polar, o oócito alcança à fase de metáfase II e, novamente interrompe a meiose, sendo o processo reiniciado mediante a fertilização ou ativação partenogénica (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Nos conceptos bovinos e ovinos, os oócitos iniciam a meiose, respectivamente aos 82 e 55 dias de gestação (MIKICH, 1991; SILVA et al., 2002).

Concomitantes à maturação nuclear, o citoplasma sofre transformações essenciais na síntese de proteínas, na reserva lipídica, na migração e na organização das organelas, como o complexo de Golgi, mitocôndrias e grânulos corticais, em número, tamanho e/ou posição (CRAN, 1989; HYTTEL et al., 1997). Em oócitos maduros, as mitocôndrias apresentam localização mais central, enquanto os grânulos corticais (GCs), associados a um segmento do retículo endoplasmático liso, se deslocam para a periferia do citoplasma (RUMPF et al., 1995). Durante o desenvolvimento do oócito, o aparelho de Golgi aumenta gradativamente sua função, comprovado pelo aumento do número de membranas envolvidas na secreção de glicoproteínas para a formação da

zona pelúcida e de substâncias para a estruturação dos grânulos corticais (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Com localização logo abaixo da membrana plasmática, esses grânulos causam modificações na zona pelúcida, impedindo a penetração de gametas masculinos supranumerários (THIBAUT et al., 1987).

A relevância da maturação citoplasmática concomitantemente à maturação nuclear está no fato que, segundo Leibfried-Rutledge et al. (1986), uma parcela dos oócitos não é hábil para promover a formação do pró-núcleo em seu citoplasma, principalmente, nessa fase, que coincide com o início do desenvolvimento embrionário.

Procedimentos inadequados durante a maturação *in vitro* podem causar defeitos a nível nuclear ou citoplasmático ou ainda, em ambas as estruturas (YANG et al., 1998). Durante o processo, inúmeros fatores podem agir sobre a maturação de oócitos, dentre eles, a substância inibidora da maturação do oócito (OMI), um polipeptídeo de baixo peso molecular, presente no fluido de pequenos e médios folículos bovinos, suínos, hamsters e camundongo, que bloqueia os oócitos no estágio de diplóteno da primeira fase meiótica (TSAFRIRI et al., 1982), atuando por meio das uniões intercelulares entre as células do *cumulus* e o oócito (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Fatores como as purinas, que também apresentam baixo peso molecular, são encontrados no fluido folicular de várias espécies (DOWNS, 1990), juntos a hipoxantinas e a adenosina atuam sinergicamente, mantendo o oócito em bloqueio pela inibição da atividade da fosfodiesterase e por elevar o nível de AMPc (EPPIG et al., 1985; DOWNS, 1993).

No decurso da maturação de oócitos, a enzima adenilciclase, quando ativada, transforma o trifosfato de adenosina (ATP) em AMPc que mantém o oócito em inibição meiótica, por ativar a proteína quinase. Para evitar a alta concentração intercelular de AMPc que impede a retomada da meiose (DOWNS, 1993), a enzima fosfodiesterase transforma o AMPc em 5'AMP que é ineficaz para acionar a proteína quinase



(MOCHLY-ROSEN, 1995). A redução da concentração do AMPc induz a desfosforilação das proteínas inativas que se tornam ativas e provocam a dissolução nuclear (DOWNS, 1993).

Alterações estruturais e bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento oocitário e na fase final de sua maturação (MOOR et al., 1983), podem ser observadas quando o oócito atinge 65 a 70% do seu volume final, ainda no estágio de vesícula germinativa (SCHULTZ, 1986). Nessa fase, ocorre a transcrição e o armazenamento de RNA (ácido ribonucléico) que é essencial na geração de proteínas relacionadas à maturação e ao desenvolvimento inicial do embrião (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989). A concomitância da síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) e da histona, durante as primeiras divisões meióticas, limita a concentração dessas proteínas no núcleo, reduzindo a taxa de clivagem (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989).

As células foliculares, mediante ação dos hormônios, podem liberar fatores que induzem os oócitos a estimular a fosfodiesterase, em consequência ocorre a redução da concentração de AMPc, a reação de proteínas quinases e a ativação do fator intercelular promotor da fase-M (MPF), que coordena a retomada da meiose em oócitos ovinos e bovinos (TATEMOTO e TERADA, 1998). Durante a evolução do estágio de metáfase para o de anáfase, a ação do fator promotor da maturação é menos expressiva, que volta à normalidade após a liberação do primeiro corpúsculo polar (WU et al., 1997).

Morfologicamente, os oócitos com maior potencial de viabilidade de maturação podem ser avaliados por características definidas das células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma, sendo de bom potencial para maturação aqueles que se apresentam aderido a três ou mais camadas de células, dispostas de forma compacta, intactas e sem expansão, constituindo o complexo *cumulus oophorus* (CCO), citoplasma homogêneo sem granulação e cor marrom (KING et al., 1986; YOUNIS et al., 1989; YANG e LU,

1990; GONÇALVES et al., 2008). Tais atributos possibilitam uma maior taxa de fecundação e de desenvolvimento embrionário (FUKUI e ONO, 1988; BRACKETT et al., 1989). Já os oócitos desnudos, possivelmente originados de folículos atrésicos, talvez degenerados, quando fecundados formam o pró-núcleo masculino mais tarde (LEIBFRIED e FIRST, 1979), inviabilizando a fecundação (SHIOYA et al., 1988; YOUNIS et al., 1989).

As dimensões do folículo e a constituição do fluido folicular são outros fatores que podem intervir na qualidade e no desenvolvimento do oócito (ARLOTTO et al., 1995; BLONDIN et al., 1997), tendo em vista que oócitos originários de folículos translúcidos mostram-se em atresia e com potencial reduzido para maturação (GRIMES e IRLAND, 1986). Em bovinos, oócitos presentes em folículos com diâmetro inferior a 2 mm, geralmente não são competentes para reiniciar a meiose, enquanto que altas taxas de folículos maiores de 8 mm encontram-se em processo de atresia ou apresentando oócitos em processo de maturação (GONÇALVES et al., 2008). Enquanto os obtidos de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm gozam de competência para alcançar o estágio máximo de desenvolvimento embrionário (YANG et al., 1998; NAGAI, 2001). Oócitos aspirados de folículos um pouco antes do pico ovulatório do hormônio luteinizante (LH) apresentam maior competência para alcançar o desenvolvimento até estágio de blastocisto do que aqueles com diâmetro entre 2 a 6 mm, assim, tornou-se procedimento de rotina em bovinos, utilizar folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm para maturação *in vitro* pelo maior disponível no ovário e pela dificuldade de identificar oócitos capacitados antes da fecundação (GONÇALVES et al., 2008).

Células do *cumulus oophorus* (CCO'S) apresentam-se em policamadas compactas e, por ocasião da maturação, sob o estímulo dos hormônios LH e FSH entram em processo de expansão, interrompendo as comunicações com o oócito

(HYTTEL, 1987; 1988; SZOLLOSI, 1991). Essas células, assim como às da granulosa, são essenciais na nutrição, crescimento, divisão meiótica, maturação citoplasmática e na fecundação do oócito (EPPIG, 1980; FUKUI e SAKUMA, 1980). Nas células somáticas que envolvem o oócito, durante as maturações citoplasmáticas e nucleares, ocorrem modificações morfológicas específicas. As células do *cumulus* iniciam um arranjo na matriz extracelular, rica em ácido hialurônico, e tal fenômeno é denominado de expansão ou mucificação das células do *cumulus* (EPPIG et al., 1982; BUCCIONE et al., 1990).

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

Células íntegras do *cumulus* exercem maior influência no processo de maturação *in vitro* do que no grau de granulação citoplasmática, na atividade ovariana ou no tamanho do folículo (FUKUI e SAKUMA, 1980), em consequência, o desenvolvimento do oócito não é afetado pelo ciclo estral da fêmea doadora (LEIBFRIED e FIRST, 1979; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989). A remoção das células do *cumulus* de oócitos oriundos de pequenos folículos antrais afeta sua habilidade para atingir a maturação nuclear e citoplasmática (SUM et al., 2001).

A qualidade do oócito é de suma importância nas biotecnologias de reprodução assistida (VASSENA et al. 2003, desta forma a presença das células do *cumulus* é incide em benefícios para a obtenção de embriões após a FIV, pois oócitos desnudos têm uma taxa de clivagem baixa (FATEHI et al., 2005). Fukui e Sakuma (1980) observaram que em bovinos não houve diferença na maturação *in vitro* em oócitos de

diferentes qualidades, mas quando os oócitos eram recuperado de folículo de menor diâmetro ( $\leq 4$  mm), possuíam qualidade superior aos de maior diâmetro ( $> 4$  mm).

## **2.2. Meios de maturação e Cultivo *in vitro***

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

Na maioria dos estudos sobre a maturação *in vitro* de oócitos de mamíferos, o meio mais utilizado é o TCM-199 com sais de EARLE (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1986), o qual é modificado de acordo com o procedimento de cada laboratório, geralmente ao meio é adicionado L-glutamina, bicarbonatos de sódio, HEPES, piruvato de sódio e hormônios. A adição de substâncias neste meio tem demonstrado contribuir para melhorias no processo de MIV de oócitos.

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

O embrião quando esta na fase de pré implantação acontece o processo de clivagem que tem início por meio de divisões meióticas, através da ativação do genoma

embrionário com formação dos blastômeros, a seguir, agregação e compactação dos mesmos, diferenciação do trofoblasto e do botão embrionário, formação e expansão da blastocele e, rompimento da zona pelúcida (PRATHER e FIRST, 1988). *In vitro*, esse fenômeno pode sofrer influencia de fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como composição da atmosfera gasosa, pH, luminosidade, aminoácidos, fatores de crescimento e vitaminas (GONÇALVES et al., 2008).

Nos meios utilizados para desenvolvimento de embriões na maioria dos mamíferos estudados, ainda existe controvérsias tanto qualitativa quanto quantitativamente dos componentes utilizados no processo (IZQUIERDO et al., 1999).

A solução para o problema do bloqueio no desenvolvimento do embrião (THOMPSON, 2000), veio na década de 80 com a introdução da co-cultura com vários tipos de células, como por exemplo, da tuba uterina e da granulosa. Zigotos bovinos fecundados *in vitro* e transferidos para ovidutos de coelhas (FUKUI, 1989) ou de ovelhas (LU et al., 1987) superaram o bloqueio do desenvolvimento, atingindo o estágio de blastocisto. Segundo Van Inzen et al. (1995), este fato demonstra que a contribuição do oviduto ao desenvolvimento embrionário *in vitro* não é espécie-específica, entretanto, esse procedimento apresenta desvantagens, como o uso de animais para hospedeiros intermediários, custos e manutenção dos animais, assim como perda de embriões.

No entanto, sobre a situação do bloqueio de desenvolvimento embrionário, deve-se considerar também que, as células secretam diversos compostos com concentrações variáveis de acordo com suas especializações, nutrição ou tempo de cultivo, podendo, inclusive, utilizar os nutrientes presentes no meio, como também alterá-los, o que impossibilita avaliar a relação entre exigências do embrião e os compostos presentes no

meio de cultivo (BRACKETT et al., 1989; YOUNIS et al., 1989; OLIVEIRA et al., 1991,1997).

Na busca de um sistema de cultivo embrionário *in vitro* semelhante ao ambiente materno, surge na década de 90 às primeiras pesquisas sobre meio quimicamente definido com possibilidade de um meio simples como o *Hamsters Embryo Culture Medium* (HECM) ou um complexo como o TCM-199, ambos sem adição de soro, e com potencial para produzirem mórulas e blastocistos (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1991).

Kim et al. (1993) e Rosenkrans e Frist (1994) adicionaram aminoácidos ao meio de cultivo e elevaram os índices de desenvolvimento embrionário nos meios piruvato, lactato e albumina da tireóide (TALP) + álcool polivinílico (PVA) e meio de cultivo CR1 + Albumina Sérica Bovina (BSA). Essa fonte de macromoléculas resultante da junção de aminoácidos e PVA viabilizaram o meio quimicamente definido para o cultivo embrionário com melhor êxito (LIU e FOOTE, 1995). Com os avanços das pesquisas foi possível transformar o meio de cultura em um similar ao ambiente da tuba uterina (LAWITTS e BIGGERS, 1993), como no caso do Flúido Sintético de Oviduto (SOF) ou adequar um meio simples, com alta concentração de potássio, como o Meio Simples Otimizado com Potássio (KSOM).

Todavia, existem muitas controvérsias sobre a utilização de meios quimicamente definidos para produção de embriões, Krisher et al. (1999), Lonergan et al. (1999) não obtiveram bons resultados, do mesmo modo, embriões produzidos em meios suplementados com PVA apresentaram modificações no metabolismo (ECKERT et al., 1998; THOMPSON, 2000), como redução no teor de proteína (THOMPSON et al., 1998). Considerando que a albumina é a proteína existente em maior quantidade nos órgãos genitais das fêmeas, talvez a adição da mesma ao meio quimicamente definido

possa contribuir na obtenção de resultados satisfatórios no desenvolvimento embrionário. Nesse sentido, a forma recombinante dessa proteína alcançou resultados animadores (ECKERT et al., 1998) e com resultados semelhantes ao do BSA (LANE et al., 2003).

Com o avanço das pesquisas, desenvolveu-se o sistema de cultivo em duas fases, que inicia com o meio quimicamente definido e termina com a presença de soro (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1996). Através desse meio, percentuais superiores a 50% de blastocistos podem ser alcançados (KRISHER et al., 1999), pois o meio de cultura é potencializado pelo soro que tem uma ação bifásica sobre os embriões (VANROOSE et al., 2001), não permitindo um desenvolvimento inicial adequado, porém, elevando a produção de mórulas e blastocistos. Em função disso é compreensível que o cultivo de embriões, a partir dos estágios iniciais de desenvolvimento até o de blastocisto, em meio semidefinido, não obtém a eficiência esperada, seja na cultura simples (RIBEIRO, 1990) ou condicionada em monocamadas celulares (RIBEIRO, 1990; OLIVEIRA et al., 1999).

Como o meio quimicamente definido não contém produtos de origem animal, os riscos de uma possível contaminação aos embriões são reduzidos (YOSHIOKA et al., 1997).

### **2.3. Adaptação e aclimatação ambiental**

Os animais portam-se como um sistema termodinâmico, que continuamente trocam energia com o ambiente. Neste processo, os fatores externos do ambiente tendem a produzir variações internas no animal, influenciando na quantidade de energia trocada entre ambos, havendo então a necessidade de ajustes fisiológicos para a ocorrência do balanço de calor (SILVA, 2000; BAÊTA e SOUZA, 1997). A adaptação

a um dado ambiente está relacionada com mudanças estruturais, funcionais ou comportamentais observadas no animal, objetivando a sobrevivência, reprodução e produção em condições adversas (BAÊTA e SOUZA, 1997).

No conceito biológico, adaptação é o resultado da ação conjunta de características morfológicas, anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais, no sentido de promover o bem-estar e favorecer a sobrevivência de um organismo em um ambiente específico (BAÊTA e SOUZA, 1997). Já a adaptação genética é um conjunto de alterações herdáveis nas características que favorecem a sobrevivência de uma população de indivíduos em um determinado ambiente, podendo envolver modificações evolutivas em muitas gerações (seleção natural) ou a aquisição de propriedades genéticas específicas (seleção artificial) (SILVA, 2000).

Segundo Silva (2000) para melhor compreensão da adaptação e aclimatação dos animais são importantes todos os processos utilizados pelos animais para manter a temperatura corporal relativamente constante, os mecanismos gerais de adaptação e os específicos para ruminantes.

Fatores ambientais externos e o micro clima dentro das instalações exercem efeitos diretos e indiretos sobre a produção animal em todas as fases de produção e acarretam redução na produtividade, com consequentes prejuízos econômicos. O conhecimento das respostas ou adaptações fisiológicas, físicas e comportamentais dos animais relacionados ao ambiente térmico nos permite a tomada de medidas e/ou alteração de manejo, da nutrição, instalações e equipamentos, objetivando a maximização da atividade (SILVA, 2000).

Os animais homeotérmicos possuem uma zona de termoneutralidade, entre temperatura mínima e máxima, ou seja, uma faixa de temperatura ambiente em que o animal não precisa produzir ou perder temperatura corporal, onde seu metabolismo é



mínimo. Essa zona de temperatura é aonde os animais estão em conforto térmico (entre temperatura mínima e temperatura máxima) e podem expressar seu máximo potencial genético (NÂÃS, 1989).

Nâãs (1989) observou que a zona de conforto térmico é dependente de diversos fatores, sendo alguns ligados ao animal, como peso, idade, estado fisiológico, tamanho do grupo, nível de alimentação e genética e outros ligados ao ambiente como a temperatura, velocidade do vento, umidade relativa do ar, tipo de piso. Também, existe uma zona de temperatura ambiental em que o animal consegue manter a sua homeotermia, entre temperatura inferior (TI) e temperatura superior (TS), ou seja, manter a sua temperatura interna relativamente estável, independente da temperatura ambiental. Entretanto, o animal necessitará de ajustes fisiológicos para manter a temperatura corporal constante. Quando a temperatura ambiente encontra-se abaixo da temperatura de conforto, o animal precisa produzir calor corporal (termogênese). Já, quando a temperatura encontra-se acima da zona de conforto térmico (termólise), o animal precisa perder calor para o ambiente. Ambos os casos irão utilizar a energia de manutenção para gerar ou dissipar calor, diminuindo a energia que seria utilizada para a produção e/ou reprodução (CURTIS, 1983).

Abaixo da TI, o animal não consegue aporte de energia térmica suficiente para compensar as perdas, e acima de TS, o organismo é incapaz de impedir a elevação de sua temperatura interna, ocorrendo hipotermia e hipertermia, respectivamente. Os animais possuem mecanismos básicos para perder/absorver calor para o ambiente. Estes mecanismos podem ser divididos em duas categorias: os não- evaporativos ou sensível e os evaporativos ou latentes (CURTIS, 1983).

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

latentes incluem a perda de calor por evaporação de água por respiração e sudação (mudança do estado da água de líquido para gasoso) (SILVA, 2000).

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

A radiação pode ser definida como a transferência de energia de um corpo a outro através de ondas eletromagnéticas. Uma superfície comporta-se de três maneiras quanto à radiação: (1) refletindo a energia incidente (fração da radiação incidente refletida); (2) absorvendo a energia (fração da radiação incidente absorvida pela superfície atingida) e (3) transmitindo a energia (energia incidente que passa através da superfície) (NÂÃS, 1989).

A pigmentação da epiderme influencia nas trocas térmicas e esta é determinada pela melanina, que é formada nos melanócitos pela oxidação do aminoácido tirosina e sua função é a proteção contra a radiação ultravioleta, função fundamental para os animais que vivem nos trópicos. A exposição de animais à radiação ultravioleta desencadeia a reação de oxidação da tirosina para a formação de melanina, que então é depositada na epiderme (CURTIS, 1983).

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

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

#### **2.4. Estresse térmico calórico (ETC)**

A existência de um organismo, seja qual for sua espécie, é consequência de uma série de ações e reações da natureza. O ambiente, e particularmente o clima são importantes fatores que podem afetar tais interações.

Head (1995) diz que o ambiente compreende todos os fatores físicos, químicos e biológicos que circundam o corpo do animal, e inclui fatores relativos à temperatura e luz, fatores que provoquem mudanças de comportamento e que causem doenças, entre outros, variando com o passar do tempo e da localidade.

Em vacas Holandesas confinadas em *free stall* a taxa de gestação caiu de 71% durante o inverno para 45% durante o verão (PIRES et al., 2002), o que representa uma perda considerável para a indústria de leite e derivados.

O estresse térmico calórico (ETC) compromete a função reprodutiva em várias espécies tais como ovinos (DUTT, 1963), caprinos (OZAWA et al., 2005), suínos (TOMPKINS et al., 1967), coelhos (WOLFENSON e BLUM, 1988) e bovinos (EALY et al., 1993), afetando as funções fisiológicas em vários tecidos do sistema reprodutivo. Por exemplo, o estresse térmico compromete a dinâmica folicular (WOLFENSON et al., 1995), reduz a viabilidade de oócitos (ROCHA et al., 1998) e compromete o desenvolvimento embrionário (EALY et al., 1993; DUNLAP e VICENT, 1971).

Enquanto alguns estudos em bovinos já demonstraram que a exposição de oócitos ao estresse térmico *in vivo* ou *in vitro* reduz de maneira dramática o desenvolvimento embrionário e as taxas de gestação, pouco se sabe sobre a susceptibilidade dos oócitos de ovinos a temperatura elevada. Em bovinos, o ETC *in vitro* reduz o potencial de maturação, fecundação e de desenvolvimento do oócito bem como induz alterações celulares típicas de apoptose (ROTH e HANSEN, 2004a; 2005). Estudos recentes indicaram que a morte celular por apoptose é um mecanismo importante responsável pela redução na competência oocitária induzida pelo estresse térmico. Nesses estudos, o bloqueio da apoptose resgatou a capacidade de desenvolvimento de oócitos expostos a temperatura elevada (ROTH e HANSEN, 2004a). Dessa forma, a determinação e caracterização do ETC em oócitos ovinos são de extrema importância para o desenvolvimento de medidas que reduza os efeitos negativos da temperatura elevada na competência oocitária em animais expostos a temperatura elevada.

A infertilidade associada ao ETC é um problema de ordem multifatorial, pois afeta as funções fisiológicas e celulares em vários tecidos. Por exemplo, pode comprometer a dinâmica folicular reduzindo o crescimento do folículo dominante (BADINGA et al., 1993) e a habilidade do mesmo em exercer dominância

(WOLFENSON et al., 1995; WILSON et al., 1998). Além disso, já foi observado que em animais expostos ao estresse calórico ocorre a emergência precoce do folículo dominante da segunda onda folicular (WOLFENSON et al., 1995) o que pode levar a ovulação de um oócito já envelhecido. Existe um grande número de estudos demonstrando que embriões no período de pré-implantação são particularmente susceptíveis a hipertermia. Já foi demonstrado, que o estresse calórico no período de pré-implantação reduz a sobrevivência embrionária em várias espécies (DUTT, 1963; WOLFENSON e BLUM, 1988), inclusive em ovinos e caprinos (DUTT, 1963; EALY et al., 1993). Essa redução acontece provavelmente pelo efeito direto da alta temperatura no embrião. Da mesma forma, o choque térmico calórico induzido durante a cultura de embriões produzidos in vitro diminui o desenvolvimento ao estágio de blastocisto, aumenta a mortalidade embrionária e reduz a taxa de prenhez em animais submetidos à transferência de embriões (ALLISTON et al., 1965; EALY et al., 1995).

#### **2.4.1. Consequências do estresse térmico no sistema reprodutivo**

Elevadas temperaturas ambientais podem diminuir a concentração de LH no plasma, que é necessário para o completo desenvolvimento do folículo dominante. Os folículos dominantes desenvolvidos em um ambiente com baixo nível de LH possivelmente terão seu desenvolvimento final e sua diferenciação afetados negativamente (GUZELOGLU et al., (2001). Existem discrepâncias na literatura a respeito da secreção hormonal durante um estresse térmico calórico agudo. Concentrações de estradiol ( $E_2$ ) no plasma podem ser diminuídas, aumentadas ou não serem afetadas pelo estresse térmico. Paradoxos similares ocorrem para a concentração de progesterona ( $P_4$ ) e do LH. O crescimento e o desenvolvimento dos folículos ovarianos, que podem ser precisamente monitorados pela ultrassonografia, podem ser ou não ser afetados pelo calor (BADINGA et al., 1993).

O ETC parece ter um efeito de retardar as funções ovarianas, caracterizado por alterações na genesi e na dinâmica folicular, alterando as concentrações de FSH (BADINGA et al., 1993). Havendo um efeito aditivo do estresse térmico e da maior produção de leite na diminuição das taxas de concepção. Guzeloglu et al. (2001) demonstraram que os folículos ovarianos são suscetíveis ao estresse térmico calórico. O folículo pré-ovulatório é um importante componente do sistema reprodutivo e a deterioração desta função durante o estresse térmico pode afetar outros eventos reprodutivos, tal como a secreção de gonadotropina e subsequente desenvolvimento do corpo lúteo (CL) e do embrião.

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

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

Além de afetar os folículos ovarianos, o ETC também é capaz de afetar o corpo lúteo. Observou-se que vacas submetidas a estresse térmico apresentaram fases luteínicas mais longas. O estradiol do folículo dá início à luteólise em bovinos, e a redução deste causada pelo estresse térmico-calórico influencia este processo. Após a interrupção do estresse térmico as vacas apresentam luteólise e os folículos reiniciam seu desenvolvimento normalmente (VASCONCELOS, 2003), porém a recuperação dos oócitos se dá bem mais tarde (ROTH et al., 2002).

A influência ou não do ETC no CL durante a fase luteínica intermediária é menos clara. Foi demonstrado que o estresse térmico aumenta, diminui ou não afeta as concentrações de progesterona no sangue. As células do CL são diferentes daquelas do folículo. Por conseguinte, se o estresse térmico diminui os níveis de progesterona no sangue, então essa redução seria causada pelos efeitos do estresse térmico no folículo, que por fim afeta o corpo lúteo. De outro modo, alterações na taxa do metabolismo associadas ao ETC podem afetar o metabolismo da progesterona (VASCONCELOS, 2003). Entretanto, Balazs (2004) não observou mudanças significativas nos níveis de  $P_4$  em vacas superovuladas da raça Holandesas-Friesian criadas na região semi-árida de Pernambuco, comparando-se o momento em que o embrião era recuperado, o primeiro e segundo ciclos.

O folículo pré-ovulatório é um componente chave no sistema reprodutivo (IRELAND, 1987), sendo as taxas de concepção em vacas de leite inversamente relacionadas à temperatura ambiente durante a fase folicular (INGRAHAM et al., 1976). O ETC também deprime a dominância folicular como indica a ausência de decréscimo dos folículos médios durante a primeira onda de desenvolvimento folicular, maior tamanho e decréscimo lento no diâmetro do segundo maior folículo, aumento no número de folículos grandes durante a primeira onda de desenvolvimento folicular e surgimento mais cedo do folículo pré-ovulatório (BADINGA et al., 1993; WILSON et al., 1998b; GUZELOGLU et al., 2001). Quando a dominância folicular está reduzida, mais de um folículo dominante pode se desenvolver, explicando o aumento no número de partos gêmeares ocorridos em determinados períodos do ano em vacas de alta produção leiteira (RYAN e BOLAND, 1991; SARTORI et al., 2000).

Trout et al. (1998) em um estudo realizado na Flórida, quando os animais apresentaram temperaturas retais entre 40 a 40,9°C, não observaram diferenças na duração do ciclo estral ou intervalo entre estros nos grupos controle ou sob estresse

térmico-calórico. Um aumento nos níveis de progesterona foi observado entre os dias 11 a 14 e 16 a 17 nas vacas sob ETC. Contudo, uma diminuição nestes valores foi observada entre os dias 19 a 21.

Estudos *in vitro* demonstraram a susceptibilidade oocitária aos efeitos diretos da temperatura elevada. O estresse térmico durante a maturação *in vitro* (MIV) reduziu a maturação nuclear, a fecundação (ROTH e HANSEN, 2005) e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004a; JU et al., 2005). A exposição de oócitos bovinos à temperatura severa de 42-43°C (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004b) ou à temperatura moderada de 40-41°C (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004a) durante as primeiras 12 horas (h) de MIV (0-12h MIV) bloqueou ou reduziu o desenvolvimento embrionário. Existe na literatura apenas um relato em que o estresse térmico *in vitro* foi aplicado durante a fase de VG. Neste experimento a exposição de oócitos VG ao estresse térmico de 41°C reduziu o desenvolvimento embrionário (PAYTON et al., 2004). A susceptibilidade oocitária à temperatura elevada deve-se em parte à incapacidade do oócito em ativar mecanismos termoprotetores, como o aumento da síntese das proteínas do choque térmico (HSPs) (EDWARDS e HANSEN, 1997).

Recentemente um número considerável de evidências demonstra que o oócito pode ser danificado pelo ETC causando uma redução na sua capacidade de desenvolvimento (PUTNEY et al., 1989a; ROTH e HANSEN, 2004b). O choque térmico pode danificar oócitos antes da maturação (estádio de vesícula germinativa), (PAYTON et al., 2004), durante a maturação (ROTH e HANSEN, 2004a) e após a maturação (JU e TSENG, 2004).

Um fator peculiar ao oócito bovino no estágio de VG é que o mesmo permanece no folículo antral por um período longo de 42 dias e durante este tempo o animal



exposto ao ETC pode sofrer oscilações de temperatura corporal acima de 41°C (PUTNEY et al., 1988; PUTNEY et al., 1989b; EALY et al., 1993; WOLFENSON et al., 1993; RIVERA e HANSEN, 2001).

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

Oócitos fertilizados de ovelhas e vacas, quando colocados em altas temperaturas, tanto *in vitro* como *in vivo* são prejudicados porém, continuam a se desenvolver, somente morrendo durante os estádios críticos da implantação (JAINUDEEN e HAFEZ, 2000). O ETC é mais prejudicial à sobrevivência embrionária quando ocorre logo após o estro. Em particular, o ETC reduz a viabilidade do embrião no dia 8 (D-8) após o estro se vacas superovuladas são expostas a ao estresse térmico-calórico no dia 1 (D-1), porém não no dia 3, 5 e 7 (EALY et al., 1993). Uma das razões para esse fenômeno é que os embriões se tornam mais resistentes a aumentos de temperatura ao passo que se desenvolvem. Temperaturas que bloqueiam o desenvolvimento dos embriões bovinos no estágio de 2 células têm efeito intermediário em embriões com 4-8 células e pouco ou nenhum efeito no desenvolvimento de mórulas (ROMAN-PONCE et al., 1978; ROSENBERG et al., 1982; EALY et al., 1995; EDWARDS e HANSEN, 1997).

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

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

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

Os efeitos do ETC podem também afetar a qualidade dos oócitos levando a variações estacionais no sucesso dos sistemas de produção de embriões *in vitro*. Um queda nas taxas de desenvolvimento embrionário durante o verão foram reportadas em

Louisiana (ROCHA et al., 1998) e Wisconsin (RUTLEDGE et al., 1999). Ron et al. (1984) e Roth et al. (2002) demonstraram que as taxas de concepção em vacas leiteiras permaneciam baixas, mesmo quando os animais não estavam mais sendo expostos ao estresse térmico-calórico.

## **2.5. Morte celular programa (MCP)**

Apoptose é um tipo de morte celular programada caracterizada fenotipicamente pelo encolhimento ou redução de tamanho da célula, compactação da cromatina, vacuolização do citoplasma e formação de corpos apoptóticos (pequenos fragmentos) dentro da célula. Bioquimicamente é caracterizada pela fragmentação do DNA, que em humanos é mediada pelo fator de fragmentação e em camundongos pela DNase ativada por caspase, alterações mitocondriais e destruição celular controlada pela família das proteases cisteínas conhecidas como caspases (PARDO-VELEZ et al., 2007). Dependendo do estímulo, a apoptose pode ser induzida por duas vias: intrínseca, pela via da mitocôndria, ou extrínseca, pela via de receptores de fatores de necrose tumoral (TNF) ou por resposta a um estímulo externo como uma citocina. Os principais executores da apoptose são as caspases, proteases que induzem poros na membrana celular das mitocôndrias, e liberação do citocromo-c, um fator indutor de apoptose (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005). Tanto oócitos não fecundados como embriões envelhecidos exibem graus variáveis de fragmentação e morte celular. A fragmentação é resultado de alterações moleculares características da morte celular programada (MCP) ou apoptose, a qual requer a ativação de genes específicos envolvidos na execução do programa de MCP (GORDO et al., 2002; HAJNÓCZKY et al., 2003). Atualmente são conhecidas duas vias de apoptose, a primeira por estimulação dos receptores de morte que se encontram na superfície da célula e ativação das

caspses e a segunda via de morte celular envolvendo a mitocôndria, que pode ser ativada por vários fatores incluindo dano no DNA, hipóxia, ausência de fatores de crescimento, além de outros. Esses estímulos promovem a liberação do citocromo c no citoplasma e resultam na ativação da cascata das caspses (BRATTON et al., 2000; GORDO et al., 2002). Segundo esses autores, as caspses são proteases que residem principalmente no citoplasma sob a forma de pró-enzimas inativas e são responsáveis pela transmissão do sinal de morte. A atividade das caspses é executar a clivagem proteolítica de muitas proteínas importantes que garantem a integridade e sobrevivência celular. Por fim, as caspses ainda ativam as endonucleases que fragmentam o DNA (GORDO et al., 2002). Pouco se conhece sobre os sinais que desencadeiam a apoptose em embriões e os mecanismos precisos que executam e controlam o programa de apoptose. Entretanto, toda a via apoptótica parece ter como ponto em comum a ativação da família das caspses (WASIELAK & BOGACKI, 2006). Oócitos envelhecidos possivelmente perdem a função protetora de alguns componentes celulares presentes no citoplasma, levando o oócito à incompetência do desenvolvimento e à morte. Acredita-se que as oscilações de  $Ca^{2+}$ , possam também estar envolvidas na sinalização da apoptose, especialmente quando iniciadas em oócitos envelhecidos (GORDO et al., 2002).

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

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

Existem várias famílias de genes envolvidas nesse processo, uma dessas famílias é a do gene BCL-2 (*B cell leukemia/lymphoma 2*), que pode estar presente no citosol bem como em organelas como as mitocôndrias. O primeiro integrante desta família, o BCL-2 proto-oncogênico, foi descoberto pela transformação cromossômica t (14/18) de células linfocitárias B de humanos (WYLLIE et al., 1980; HOCKENBERY et al., 1990; OHMORI et al., 1993). Esta família de proteínas é composta por antagonistas da morte (BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, BCL-W, MVL-1) e agonistas da morte (BAX, BKA, BAD, BID, BIK, BCL-X<sub>S</sub>) e outros (GROSS et al., 1999). Estas proteínas compartilham estruturas homologas dos domínios BH1, 2, 3 e 4, embora nem todos os membros possuam todos os domínios. Os domínios BH1 e BH2 dos antagonistas são necessários para heterodimerizar com os agonistas da morte e, inversamente, o domínio BH3 dos agonistas da morte é requerido para que ocorra a heterodimerização com os antagonistas da morte para promover a morte celular (GROSS et al., 1999; YIN et al., 1994).

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

As proteínas da família BCL-2 podem estar inseridas na membrana mitocondrial na forma de dímeros ou polímeros e sua estrutura quaternária está diretamente relacionada com seu poder de inibir ou ativar a apoptose (KROEMER, 1997). A proteína BAX é um membro pró-apoptótico da família da BCL-2 que, na ausência de estímulos apoptóticos, encontra-se predominantemente solúvel no citosol. Por outro lado, na presença de estímulos apoptóticos, ocorre a transformação dessa proteína do citosol para as mitocôndrias e sua inserção nas membranas mitocondriais (WOLTER et al., 1997; ZHANG et al., 1998). Os mecanismos pelos quais a BAX é inserida nessas membranas ainda não estão elucidados, mas tal evento pode estar associado à formação do poro transitório de permeabilidade. Por este poro, ocorre a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (SMAILI et al., 2003). Não se sabe se uma elevação de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico serve de sinal para a transformação da BAX e para a amplificação do sinal apoptótico na presença de um determinado estímulo. Além disso, a propagação do sinal do  $\text{Ca}^{2+}$  entre células pode indicar que os aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico são importantes para transmissão dos sinais apoptóticos entre diferentes células (BAYSAL et al., 1994; CASTILHO et al., 1998; GUNTER et al., 1998).

Os mecanismos de comunicação entre as células como as junções comunicantes do tipo *Gap* (JG) têm sido frequentemente relacionados a processos de disseminação de morte celular. No entanto, a forma como estas junções celulares mediam tal processo ainda não está elucidada (GUTHRIE et al., 1999). Existem ainda outras inibidoras da apoptose como a BCL-x1 e proteínas indutoras da apoptose como a BAD e a BAK.

A ação no processo de apoptose das proteínas pertencentes à família BCL-2 situa-se ao nível da membrana mitocondrial, permitindo ou não a saída do citocromo c que é um ativador de caspases. As caspases, cisteíno proteases homólogas ao ced-3 do

*C. elegans*, exercem importante papel na rede sinalizadora da apoptose, as quais são ativadas em cascatas (BRATTON et al., 2000).

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

As caspases estão presentes no citoplasma sob forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas, após clivagem proteolítica à altura do ácido aspártico. Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalisar a ativação de outros membros dessa família, resultando em ampliação de cascata proteolítica (THOMPSON, 1999). Uma caspase é capaz de clivar outras e esta habilidade parece ser essencial para ativação dessas enzimas. Ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outra, em sequência, até gerar uma caspase efetora. Esta destrói proteínas essenciais da célula, ativa proteínas tóxicas ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose. Vários experimentos sugerem uma hierarquia na ativação das caspases, mas esta ordem e as caspases envolvidas podem diferir, dependendo do modo de indução da apoptose (THORNBERRY et al., 1997; NICHOLSON, 1999).

Várias proteínas são apontadas como “alvos” das caspases, mas ainda não foi estabelecida uma relação direta entre o corte dessas proteínas e a morte celular. A caspase 3 cliva uma proteína denominada ICAD (*Inhibitor of caspase-activated DNase*)

normalmente ligada a uma endonuclease (CAD) no citoplasma, ativando essa enzima, que entra no núcleo e inicia a fragmentação do DNA (BRATTON et al., 2000). Outra relação direta já identificada é a fragmentação, também pela caspase 3, da gelsolina, proteína ligada aos filamentos de actina (parte do citoesqueleto, que mantém a estrutura da célula). Essa fragmentação danifica os filamentos e a célula perde sua forma, o que leva a apoptose (KOYA et al., 2000).

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

A maioria dos receptores da morte celular identificados são membros da família de receptores para o fator de necrose tumoral (FNT) e caracterizado por apresentar porção extracelular rica em cisteína e uma região citoplasmática, chamada domínio da morte (do inglês, *death domain*), essencial para transdução intracelular do sinal de morte. Entre esses receptores, um dos mais estudados e melhor caracterizado é o fator de necrose tumoral receptor (FAZ) (CD95 ou APO-1). Quando o ligante-FAS se acopla ao receptor FAS, as moléculas do receptor se trimerizam formando um agregado de cadeias da morte. Finalmente, o agregado se liga a caspase 8, uma proteína adaptadora



presente no citosol, chamada de cadeia da morte quando associado ao receptor FAS (*FAS-associated death domain*, FADD). A ligação desse complexo à pró-caspase 8 resulta na ativação dessa enzima por clivagem proteolítica. A caspase-8 pode então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 (caspase efetora) (HENGARTNER, 2000).

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

### **2.5.1 Apoptose oocitária e embrionária**

Durante a vida reprodutiva da fêmea, a maioria dos folículos ovarianos torna-se atresico e seu respectivo oócito se degenera. Os folículos que não se submetem ao

processo de atresia continuam a crescer até a ovulação. Após a ovulação, se a fertilização não ocorrer dentro de um determinado tempo, o oócito perde sua capacidade fertilizante e começa a se degenerar (TAKASE et al., 1995; YANG e RAJAMAHENDRAN, 2002; HAFEZ e HAFEZ, 2000). Embora os mecanismos envolvidos neste processo de degeneração ainda não estejam muito bem elucidados, é provável que no oócito este processo ocorra por MCP (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2002).

A fim de melhorar a PIV do embrião, é usual a seleção morfológica dos CCOs com base no número de camadas de CC e no *ooplasma* do oócito. Este tipo de classificação, que relaciona a morfologia com a competência de desenvolvimento do oócito, vem sendo estudada há tempos (BRACKETT e ZUELKE, 1993; LEIBFRIED e FIRST, 1979; LONERGAN e GORDON, 1992; MADISON et al., 1992). Estes estudos demonstram que oócitos com *cumulus* compacto são, via de regra, originados de folículos “saudáveis” ou daqueles apenas com sinais de atresia, visto que oócitos com *cumulus* incompleto e/ou expandido originam-se de folículos com sinais mais avançados de atresia. Blondin e Sirard (1995) relataram que oócitos desnudos tiveram uma taxa de desenvolvimento embrionária muito reduzida, diferindo significativamente dos oócitos de classes morfológicas que apresentam CC. Em CCOs bovinos de diferentes morfologias existem uma correlação negativa entre a fragmentação nuclear das CCs e o potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Valores baixos na razão das proteínas BCL-2/BAX está relacionada com o aumento de fragmentação nuclear nas CC, não sendo observada variação da proporção dos BCL-2/BAX nas CCs de CCOs de diferentes morfologias, maturadas por 24h *in vitro*, independente da isoforma do gene BAX ser a alfa ou a psi (EMANUELLI, 2005).

Em estudo realizado por Yang e Rajamahendran (2002) constatou que CCOs de qualidade morfológica inferior têm a maioria de seus oócitos com anomalias morfológicas incluindo a fragmentação do *ooplasma* e das CC, características estas típicas de células submetidas ao processo de morte celular por apoptose (TILLY, 1996). Do mesmo modo, Takase et al. (1995) e Matwee et al. (1999) indicaram que a apoptose está relacionada ao processo de degeneração em oócitos imaturos de camundongos e bovinos.

Fujino et al. (1996) propôs que a fragmentação do DNA dos oócitos associadas a apoptose pode ser uma das razões para a qualidade pobre dos oócitos e a baixa fertilidade de ratos envelhecidos. O sistema de comunicação entre oócitos e as células somáticas que o cercam é estabelecido muito cedo, ainda quando os oócitos encontram-se circundados apenas por uma camada de células pré-granulosas, no início do desenvolvimento do folículo primordial. Durante todo o desenvolvimento folicular as CG comunicam-se com o seu oócito pelas JG assegurando o crescimento e maturação apropriada ao oócito (EPPIG, 1991).

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

Em mamíferos, as perdas embrionárias podem ocorrer em todas as fases da gestação (DISKIN e SREENAN, 1980; DUNNE et al., 2000). A incidência de perdas

embrionárias em novilhas inseminadas artificialmente pode chegar a 22% no 14º dia (D-14) de gestação e sem perdas adicionais até o 30º dia (D-30). No intervalo correspondente ao D-30 até o final da gestação, as perdas embrionárias/ fetais alcançam apenas 4,2%, indicando que a maioria das perdas ocorre durante as duas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário em bovinos (DUNNE et al., 2000).

Há fortes evidências que células embrionárias de mamíferos na fase de pré-implantação submetem-se ao processo de apoptose (BETTS e KING, 2001; HARDY, 1997). Os mecanismos utilizados pelo embrião para eliminar determinadas células ou linhagens de células não estão bem definidos.

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

As condições proporcionadas aos embriões na PIV são diferentes das condições encontradas pelos embriões *in vivo*. Nas condições *in vitro* há uma grande concentração de oxigênio reativo (OR). Yang et al. (1998), com o objetivo de elucidar as ações do

OR, determinaram a reação existente entre a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no embrião e as modificações morfológicas em suas células, concluindo que existe uma relação direta entre o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o número de células apoptóticas. As variáveis *in vitro*, nas quais o oócito e principalmente os embriões são submetidos, fazem com que a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* seja variável.

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

### 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.

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

ARLOTTO, T. et al. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, n.5, p.941-956, 1995.

BAÊTA, F. C.; SOUZA, C. F. **Ambiência em Edificações Rurais**. (eds.) Viçosa: UFV. 1997.

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.

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

BALL, G. D. et al. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology of Reproduction**, v.28, n.3, p.717-725, 1983..

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

BARBOSA, O.R. et al. Utilização de um índice de conforto térmico em zoneamento bioclimático da ovinocultura. **Boletim de Indústria Animal**, v.52, n.1, p.37-47, 1995.

BAYSAL, K. et al. Na<sup>+</sup> de Ca<sup>2+</sup> efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive Ca<sup>2+</sup>/2Na<sup>+</sup> exchanger. **American Journal of Physiology**, v.266, p.800-808, 1994.

BETTERIDGE, K. J. et al. Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.

BETTS, D. H.; KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.171-191, 2001.

BLONDIN, P. et al. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v.47, n.5, p.1061-1075, 1997.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in sheep oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.62, p.575-582, 1995.

BRACKETT, B. G. et al. *In vitro* fertilization of cow ova. **Theriogenology**, v.9, n.1, p.89-95, 1978.

BRACKETT, B. G. et al. Fertilization and early development of cow ova. **Biology of Reproduction**, v.23, p.189-205, 1980.

BRACKETT, B. G. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, n.1, p.147-158, 1982.

BRACKETT, B. G. et al. Bovine twins resulting from *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.224-229, 1984.

BRACKETT, B. G.; OLIPHANT, G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.12, n.2, p.260-274, 1975.

BRACKETT, B. G.; YOUNIS, A. I.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with light concentrations of luteinizing hormone. **Fertility and Sterility**, v.52, n.2, p.319-324, 1989.

BRACKETT, B. G.; ZUELKE, K. A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.9, n.1, p.43-64, 1993.

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

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.; EPPIG, J. Interactions between somatic cell and germ cell throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.43, p.543-547, 1990.

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

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

COGNIÉ Y. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171- 188, 2003.

CRAN, D. Cortical granules during oocytes maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.38, p.49-62, 1989. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREIDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. Cap. 10, p.195-226.

CRYNS, V.; YUAN, J. Protease to die for. **Genes and Development**, v.12, n.11, p.1551-1570, 1998.

CURTIS, S. E. **Environmental Manmegement in Animal Agriculture**. Ames: Iowa State University, 1983. 409p.

DEKEL, N. Spatial relationship of follicular cell in the control of meiosis. In: HESELTINE, F.; FIRST, N. L. **Progress in Clinical and Biological Research**. Meiotic inhibition: molecular control of meiosis. Alan R. Liss, Inc., New York, 1988, p.87-101.

DEKEL, N.; GALIANI, D.; BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. **Biology of Reproduction**, v.38, p.517-521, 1988.

DERIVAUX, J. O ciclo sexual dos mamíferos. **Reprodução dos animais domésticos**. Ed. Acribia,Zaragoza - Espanha, Trad. Dr. Renato Campanarut Barnabé, 446 p , 1980.

DE SOUZA, P. A. et al. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenic factors. **Theriogenology**, v.49, n.1, p.115-128, 1998.

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



- DOWNS, S. M. The maintenance of meiotic arrest in mammalian oocytes. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. **Fertilization in Mammals**. Noewell: Serono, p.5-16, 1990.
- DOWNS, S. M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.39, n.1, p.65-79, 1993.
- DUNLAP, S. E.; VINCENT, C. K. Influence of post breeding thermal stress on conception rate in beef cattle. **Journal Animal Science**, v.32, p.1216-1218, 1971.
- DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and fetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.39-44, 2000.
- DUTT, R. H. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. **Journal Animal Science**. v.22, p.713-719, 1963.
- EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal Dairy Science**. v.76, p.2899-2905, 1993.
- EALY, A. D. et al. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. **Journal Animal Science**, v.73, p.1401-1407, 1995.
- ECKERT, J. et al. Exogenous protein affects development competence and metabolic activity of bovine preimplantation embryo *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v.10, n.4, p.327-332, 1998.
- EDWARDS, R. G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v.208, n.8, p.349-351, 1965.
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.138-145, 1997.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**, v.55, p.340-346, 1996.

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

EPPIG, J. J. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.23, p.545-552, 1980.

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

EPPIG, J. J.; WARD-BAILEY, P.; COLEMAN, D. L. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. **Biology of Reproduction**, v.33, p.1041-1049, 1985.

EPPIG, J. J. et al. Differential action of sulfated glycosaminoglycans on follicle stimulating hormone-induced functions of *cumulus oophorus* isolated from mice. **Biology of Reproduction**, v.27, p.399-406, 1982.

FATEHI, A. N. et al. Presence of *cumulus* cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v.13, n.2, p.177-185, 2005.

FRAYRER-HOSKEN, R. A. et al. Laparoscopic oviductal transfer of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. **Theriogenology**, v.32, n.2, p.413-420, 1986.

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

FUKUI, Y. Effect of sera and the steroid hormone on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured oviduct epithelial cells. **Journal and Animal Science**, v.23, p.1318-1323, 1989.

FUKUI, Y.; FUKUSHIMA, M.; ONO, H. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedures. **Theriogenology**, v.20, n.3, p.651-660, 1983.

FUKUI, Y.; ONO, H. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocyte. **Veterinary Research**, v.122, p.282-286, 1988.

FUKUI, Y.; SAKUMA, Y. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of *cumulus* cells. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 669-673, 1980.

FULKA, J. JR.; PAVLOK, A.; FULKA, J. *In vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.64, n.2, p.495-499, 1982.

GANDHI, A. P. et al. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, v.15, n.2, p.395-401, 2000.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (2<sup>a</sup> ed.), **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, Editora Roca, São Paulo, p.261-292, 2008.

GORDO, A.C. et al. Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in *In vitro* aged mouse eggs. **Biology of Reproduction**, Champaing, n. 66, p. 1828-1837, 2002.

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

GRIMES, R. W.; IRELAND, J. J. Relationship of appearance of the surface of bovine ovarian follicles, concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.35, p.725-732, 1986.

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

GUERRINI, V. H. Food intake of sheep exposed to hot humid, hot dry and cool humid environments. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, p.658-61, 1981.

GUNTER, T. E. et al. The Ca<sup>2+</sup> transport mechanisms of mitochondria and Ca<sup>2+</sup> uptake physiological-type Ca<sup>2+</sup> transients. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1366, p.5-15, 1998.

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

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

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. (7<sup>o</sup> ed.) Lea and Febiger. Philadelphia: 2000. 509p.

HANSEN, P. J.; THATCHER, W. W.; EALY, A. D. In: Large Dairy Herd Management. In: Van H.H.; Wilcox, C. J. **Large Dairy Herd Management**. Champaign, p. 116, 1992.

HANSEN P. J. Effects of environment of bovine reproduction. In: current therapy in large animal. **Theriogenology**, v.5, n.2, p. 403-15, 1997.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction**, v.3, n.10, p.919-925, 1997.

HARDY, K. et al. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.4, p.1655-1660, 2001.

HASHIMOTO, S. et al. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine *cumulus*-oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v.57, n.4, p.353-360, 2000.

HEAD, H. H. Management of dairy cattle in tropical and subtropical environments. CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMETEOROLOGIA, 1., **Anais...**, Jaboticabal, 1995.

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

HENSLEIGH, H. C.; HUNTER, A. G. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.6, p.1456-1462, 1985.

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

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

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

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.35-47, 1989.

HYTTEL, P. Bovine *cumulus*-oocyte disconnection *in vitro*. **Anatomy and Embryology**, v.176, p.41-44, 1987.

HYTTEL, P. Oocyte maturation and fertilization in cattle – ultrastructural aspects. **Copenhagen; A/S Carl F. Moertensen**, 1988.

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

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/ Pesquisa Pecuária Municipal 2008, **Dados Estatísticos**. Brasília: IBGE/PPM Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>, acesso em: 20/11/2009

INGRAHAM, R. H.; STANLEY, R. W.; WAGNER, W. Relationship of temperature and humidity to conception rate of holstein cows in Hawaii. **Journal Dairy Science**, v.59, p.2086-90, 1976.

IKEDA, S.; IMAI, H.; YAMADA, M. Apoptosis in cumulus cells during *in vitro* maturation of bovine *cumulus*-enclosed oocytes. **Reproduction**, v.125, p.369-376, 2003.

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl., v.34, p.39-54, 1987.

IRITANI, A. et al. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, n.2, p.487-492, 1984.

IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M. T. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. **Theriogenology**, v.52, n.4, p.847-861, 1999.

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

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v.88, p.347-354, 1997.

JU, J. C.; TSENG J. K. Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine oocytes under hyperthermia. **Molecular Reproduction Development**, v.68, n.1, p.125-133, 2004.

JU, J. et al. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.64, p.1677-1689, 2005.

JURISICOVA, A. et al. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. **Molecular Reproduction Development**, v.51, n.3, p.243-253, 1996.

KROEMER, G. The proto-oncogene BCL-2 and its role in regulating apoptosis. **Nature Medicine**, v.3, p.614-620, 1997.

KIM, J. H. et al. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*, matured *in vivo* fertilized oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1320-1325, 1993.

KING, W. A. et al. Meiosis in bovine matures *in vitro* and *in vivo*. **ACTA Veterinaria Scandinavica**, v.27, p.267-279, 1986.

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

KOYA, R. C. et al. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.20, p.15343-15349, 2000.

KRISHER, R. L.; LANE, M.; BAVISTER, B. D. Development competence and metabolism of bovine embryos culture in semi-defined and culture media. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1345-1352, 1999.

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

LAMBERT, R. D. et al. *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vivo* and collected at laparoscopy. **Theriogenology**, v.25, n.1, p.117-133, 1986.

LANE, M. et al. Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. **Molecular Reproduction and Development**, v.64, n.1, p.70-78, 2003.

LAWITTS, J. A.; BIGGERS, J. D. Culture of preimplantation embryos. In: WASSAMAN, P. M.; DE PAPHILIS, M. L. Methods in enzymology – Guide do technique in mouse development. San Diego: **Academic Press**, 1993, p.153-164.

LEIBFRIED, L.; FRIST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.48, n.1, p.79-86, 1979.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRISTSER, E. S.; FIRST, N. L. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster *cumulus*-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, v.35, n.3, p.850-857, 1986.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. et al. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.36, n.2, p.376-383, 1987.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. et al. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocyte. **Theriogenology**, v.31, n.1, p.61-74, 1989.

LIU, H. C.; FOOTE, R. H. Effects of amino acids on the development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilization bovine in a simple protein-free medium. **Human Reproduction**, n.10, v.11, p.2985-2991, 1995.



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

LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M. P. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygote in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**, v.51, n.8, p.1565-1576, 1999.

LONERGAN, P. et al. Factors influencing oocytes and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, p.427-437, 2001.

LU, K. H. et al. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. **Veterinary Record**, v.121, n.11, p.259-260, 1987.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.437-443, 1996.

MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.27, p.1-11, 1992.

MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Developmental regulation of apoptosis in the early bovine embryo. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.185-189, 1999.

McDOWELL, R.E.; et al. Effect of heat stress on energy and water utilization of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.52, p.188-194, 1969.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, R.; MEIJER, L. High development competence of cattle oocytes maintained at the vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.89-95, 2000.

MERMILLOD, P. et al. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? **Reproduction of Domestic Animals**, v.43 (suppl. 2), p.393–400, 2008.

MIKICH, A. B. **Estudos histológicos e citogenéticos da oogênese e ovariogênese em gado mestiço**. Ribeirão Preto: SP, 1991, 165p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo.

MOCHLY-ROSEN, D. Localization of protein kinase by anchoring proteins: A theme in signal transduction. **Science**, v.268, p.247-251, 1995.

MOOR, R. M.; CROSBY, I. M.; OSBORN, J. C. Growth and maturation of mammalian oocytes. In: CROSIGNANI, P. G.; RUBIN, B. L. **In vitro fertilization and embryo transfer**. London: Academic Press, 1983, p.38-63.

MORITA, Y.; TILLY J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Development Biology**, v.213, p.1-17, 1999.

MOTLIK, J. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.38, p.17-25, 1989.

MOTLIK, J.; KUBELKA, M. Cell cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.27, p.366-375, 1990.

MUZIO, M. et al. An induced proximity model for caspase-8 activation. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.2926-2930, 1998.

NÂÃS, I. A. **Princípios de Conforto Térmico na Produção Animal**. São Paulo: SP. (ed.) Editora Ícone. 1989. 340p.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1291-1301, 2001.

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

OHMORI, T. et al. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by BCL-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.192, n.1, p.30-36, 1993.

OLIVEIRA, M. A. L. et al. Nova perspectiva da fertilização de embriões bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, VIII, 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991, v.2, p.303.

OLIVEIRA, M. A. L. et al. Co-culture of *Mus musculus* embryos with monolayers CO<sub>2</sub> flow. **Ciência Rural**, v.27, n.1, p.123-127, 1997.

OLIVEIRA, M. A. L. et al. Desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, IV., 1999, Recife. **Anais...** Recife, SPEMVE, 1999, p.295-296.

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

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

OZAWA, M. et al. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. **Reproduction**, v.129, p.621-630, 2005.

PARDO-VELEZ, C. et al. Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-KB and p53 activation in bovine embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, p.1285-1296, 2007.

PARRISH, J. J. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.25, n.1, p.591-600, 1986.

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

PAWSHE, C. H. et al. Comparison of various maturation treatments on *in vitro* maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. **Theriogenology**, v.46, n.4, p.971-982, 1996.

PAYTON, R. R. et al. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1303-1308, 2004.

PIRES, M. F. A. et al. Taxa de gestação em fêmeas da raça Holandesa confinadas em free stall, no verão e inverno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.43-52, 2002.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v.62, p.665-675, 1935.

PINYPUMMINTER, T.; BAVISTER, B. D. *In vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. **Biology of Reproduction**, v.45, p.736-742, 1991.

PINYPUMMINTER, T.; BAVISTER, B. D. Effects of amino acids on development *in vitro* of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, n.5, p.835-841, 1996.

PRATHER, R. S.; FIRST, N. L. A. A review of early mouse embryogenesis and its application to domestic species. **Journal of Animal Science**, v.66, p.2626-2635, 1988.

PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated temperatures between days 1 to 7 post insemination. **Theriogenology**, v.30, p.195-209, 1988.

PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenology**, v.31, p.765-778, 1989a.

PUTNEY, D. J. et al. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. **Animal Reproduction Science**, v.19, p.37-51, 1989b.

RIBEIRO, V. M. F. **Cultivo de embriões murinos em monocamadas celulares e em meio suplementado com soro fetal bovino**. Recife: PE, 1990. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco.

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

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

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

RIVERA, R. M. et al. Reorganization of microfilaments and microtubules by thermal stress in two-cell bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1852-1862, 2004a.

RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v.121, p.107-115, 2001.

- ROCHA, A. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 657-665, 1998.
- RODRIGUEZ, C. et al. Ovine oocytes metabolism depending on follicle size. **Theriogenology**, v.59, n.1, p.478, 2003.
- ROMAN-PONCE, H. et al. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **Journal Animal Science**, v. 46, p. 175-180, 1978.
- ROSE-HELLEKANT, T. A.; LIBERSKY-WILLIAMSON, E. A.; BAVISTER, B. D. Energy substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine oocytes alter acquisition of development competence. **Zygote**, v.6, n.4, p.285-294, 1998.
- ROSENKRANS, C. F.; FRIST, N. L. Effects of free amino acids and vitamins on cleavage and development rate of bovine zygotes *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.72, n.2, p.434-437, 1994.
- ROSENBERG, A. et al. Multicollision Model for Amplification by Stimulated Emission of Bremsstrahlung. **Physical Review Archive**, v.49, p.1917-1920, 1982.
- ROSENBERG, M. et al. Effect of climatic conditions on peripheral concentrations of LH, progesterone and oestradiol-17 in high milk-yielding cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 66, p.139-146, 1982.
- ROTH, Z. et al. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.120, p.83-90, 2000.
- ROTH, Z. et al. Improvement of quality of oocyte collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v.122, p.737-744, 2001.
- ROTH, Z. et al. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocyte aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1398-1405, 2002.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology Reproduction**, v.71, p.1898-1906, 2004a.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. **Biology Reproduction**, v.71, p. 2072-2078, 2004b.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v.129, p.235-244, 2005.

RUMPF, R. et al. Fecundação *in vitro* na espécie bovina: a experiência do CENARGEN. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, n.3-4, p.219-232, 1995.

RUTLEDGE, J. J. et al. Seasonality of cattle embryo production in a temperate region. **Theriogenology**, v. 51, n.2, p. 330, 1999.

RYAN, D. P.; BOLAND, M. P. Frequency of twin births among Holstein X Friesian cows in a warm dry climate. **Theriogenology**, v.36, n.1, p.1-10, 1991.

SARTORI, R. F. et al. Differences between lactating cows and nulliparous heifers in follicular dynamics, luteal growth, and serum steroid concentrations. **Journal Animal Science**, 78 (Suppl. 1): 212. (Abstr.), 2000.

SCHULTZ, R. M. Molecular aspects of mammalian oocyte growth and maturation. In: ROSSANT, J.; PEDERSEN, R. A. **Experimental approaches to mammalian embryonic development**. New York: Academic Press, 1986, p.195-237.

SHIOYA, Y. et al. *In vitro* fertilization and cleavage capacitibility of bovine follicular oocytes classified by *cumulus* cell and matured *in vitro*. **Theriogenology**, v.30, n.3, p.489-496, 1988.

SILVA, J. R. V. et al. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, v.12, n.2, p.105-117, 2002.

SILVA, R. G. **Introdução à Bioclimatologia Animal**. São Paulo:SP. (ed.) Editora Nobel. 2000, 256p.

SIRARD, M. A.; LAMBERT, R. D. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. **Biology of Reproduction**, v.33, n.2, p.487-494, 1985.

SIRARD, M. A. et al. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biology of Reproduction**, v.39, p.546-552, 1988.

SIRARD, M. A.; COENEN, K. The co-culture of *cumulus* enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effect on meiotic resumption. **Theriogenology**, v.40, n.4, p.933-942, 1993.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.49, n.2, p.483-497, 1998.

SIRISATHIEN, S. Development and application of bovine *in vitro* fertilization. Athens. 2002. **Dissertation** (Doctor of Philosophy) – Faculty of the University of Georgia.

SMAILI, S. S. et al. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.2, p.183-190, 2003.

SUM, Q. Y. et al. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, *cumulus* cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, n.2, p.192-198, 2001.

SUN, F. Z.; MOOR, R. M. Nuclear-citoplasmic interactions during ovine oocyte maturation. **Development**, v.111, p.171-180, 1991.

SUTOVSKY, P. et al. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* culture cattle oocyte *cumulus* complexes. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1277-1287, 1993.



- SZOLLOSI, D. Maturation de l'ovocyte. In: TRIBAUT, C. and LEVASSEUR, M. C.: La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris, **INRA/Ellipses**, 1991.
- TAKASE, K.; ISHIKAWA, A. M.; HOSHIAI, H. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. **Tohoko Journal of Experimental Medicine**, v.175, p.69-76, 1995.
- TATEMOTO, H.; TERADA, T. Involvement of cumulus cells stimulated by FSH in chromatin condensation and the activation of maturation – promoting factor in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.1007-1020, 1998.
- TEOTIA, A.; SHARMA, G. T.; MAJUMDAR, A. C. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulose cell monolayers. **Small Ruminant Research**, v.40, n.2, p.165-177, 2001.
- THOMPSON, C. B. Apoptosis. In: PAUL, W. E. (Ed.). **Fundamental Immunology**, (4<sup>o</sup> ed.) Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999, p.813-829.
- THOMPSON, J. G. et al. Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v.50, n.2, p.139-145, 1998.
- THOMPSON, J. G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.
- THORNBERRY, N. A. et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspases family and granzyme B. functional relationships for key mediators of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, 17907-17911, 1997.
- THIBAUT, C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent process? **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, p.1-15, 1977.

THIBAULT, C. *In vitro* maturation and fertilization of rabbit and cattle oocytes. In: SEGAL, S. J.; CROZIER, P. A.; CORFMAN, P. G.; CONDLIFFE, C. C. (eds.). **The Regulation of Mammalian Reproduction**. Michigan: Springfield, III, 1973, p.113-119.

THIBAULT, C.; SZOLLOSI, O.; GERARD, M. Mammalian oocytes maturation. **Reproduction Nutrition Development**, v.27, p.865-896, 1987.

TOMPKINS, E. C. et al. Effect of post-breeding thermal stress on embryonic mortality of swine. **Journal Animal Science**, v.26, p.377-380, 1967.

TILLY, J. L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.162-172, 1996.

TILLY, J. L. Commuting the death sentence: how oocyte strive to survive. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, p.838-848, 2001.

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

TSAFRIRI, A.; DEKEL, N.; BAR-AMI, S. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.64, p.541-551, 1982.

TSAFRIRI, A.; KRAICER, P. The time of ovum maturation in the rat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.29, p.387-393, 1972.

VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. From co-culture to defined medium: State of the art and practical considerations. **Reproduction of Domestic Animal**, v.36, p.25-28, 2001.

VAN INZEN, W. G. et al. Culture of embryos to the blastocyst stage using buffalo rat liver (BRL) cells. **Theriogenology**, v.43, n.4, p.723-738, 1995.

VASCONCELOS, J. L. M. **Manejo de vacas leiterias para melhoria do desempenho reprodutivo durante períodos de estresse calórico**, 2003. Disponível em: [www.milkpoint.com.br](http://www.milkpoint.com.br) Acesso em: 22 maio, 2008.

VASSENA, R. et al. Developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v.15, p.923-932, 2003.

WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. e NEIL, J. D. (Eds.). **The Physiology of Reproduction**, 2ª ed. New York: Raven Press, p.571-628, 1994.

WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. e NEIL, J. D. (eds.). **The Physiology of Reproduction**, 2ª ed. New York: Raven Press, p.79-122, 1994.

WILSON, S. J. et al. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. **Journal Dairy Science**, v.81, p.2132-2138, 1998.

WOLFESON, D. et al. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p. 9-19, 1997.

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

WOLFENSON, D.; BLUM, O. Embryonic-development, conception rate, ovarian-function and structure in pregnant rabbits heat-stressed before or during implantation. **Animal Reproduction Science**. v.17, p.259-270, 1988.

WOLFENSON, D. et al. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1106-1113, 1995.

WOLTER, K. G. et al. Movement of BAX from the cytosol to mitochondria during apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v.139, p.1281-1292, 1997.

- WYLLIE, A. H.; KEER, J. F. R.; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, v.5, p.97-104, 1980.
- WU, B. et al. Dynamics of maturation – promoting factor and its constituents proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.56, p.253-259, 1997.
- YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Involvement of apoptosis in the atresia nonovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1313-1321, 2000a.
- YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Morphological and biochemical identification of apoptosis in bovine follicular cells and effects of follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-1 on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1209-1217, 2000b.
- YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of BCL-2 and BAX proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.70, n.3-4, p.159-169, 2002.
- YANG, X. et al. Control of oocyte maturation in cows – biological factors. **Theriogenology**, v.49, n.2, p.471-482, 1998.
- YANG, X.; LU, K. H. The influence of bovine oocyte type on *in vitro* fertilization and subsequent development *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.355-362, 1990.
- YOSHIOKA, K. et al. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. **Theriogenology**, v.48, n.5, p.997-1006, 1997.
- YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Gamete Research**, v.23, p.189-201, 1989.

YIN, X. M.; OLTVAI, Z. N.; KORSMEYER, S. J. BH1 and BH2 domains of BCL-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with BAX. **Nature**, v.369, p.321-333, 1994.

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

## CAPÍTULO 1

---

### **Efeito das estações seca e chuvosa na capacidade de desenvolvimento de oócitos e produção *in vitro* de embriões na espécie ovina**

*(Effect of dry and wet seasons on the ability of oocytes developing and in vitro production of embryos in sheep)*

**RESUMO**

Este estudo teve como objetivo determinar o efeito das estações seca e chuvosa na capacidade de desenvolvimento de oócitos e produção in vitro de embriões da espécie ovina. Os ovários de ovelhas na estação seca (outubro a março) e chuvosa (abril a setembro) foram colhidos em abatedouro e transportados ao Laboratório de Biotécnicas da Reprodução da UFRPE. Os complexos cumulus oophorus (CCOs) foram colhidos pela técnica de “slicing” dos folículos entre 2 a 6 mm de diâmetro e selecionados com base na morfologia. Foram realizadas 12 repetições, onde os CCOs foram submetidos a maturação, fertilização e cultivo in vitro. A porcentagem de oócitos clivados foi determinada no dia 3 (D-3) e os oócitos que se desenvolveram aos estádios de 8-16 células (D-4), mórula (D-5) e blastocisto (D-8) após a fecundação. A qualidade dos blastocistos foi avaliada com o corante DAPI e a determinação de blastômeros positivos para apoptose e fragmentação de DNA através do teste de TUNEL. Foi encontrada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nas fases fertilização, D-3 e D-4. Não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) às fases de maturação in vitro, mórula e blastocisto e na fragmentação de DNA (TUNEL). Nas condições observadas neste estudo, os resultados permitem concluir que não houve efeito da estação do ano na capacidade de desenvolvimento de oócitos e na produção in vitro de embriões da espécie ovina.

**Palavras-chave:** Complexos cumulus oophorus, fertilização, blastocisto, apoptose.

**ABSTRACT**

This study aimed to determine the effect of dry and wet seasons on the ability of developing oocytes and in vitro production of sheep embryos. The ovaries of ewes during the dry season (October to March) and rainy season (April-September) were collected in a slaughterhouse and transported to the Laboratory of Biotechnical Reproduction of UFRPE. Oophorus cumulus complexes (COCs) were collected by the

technique of "slicing" of the follicles from 2 to 6 mm in diameter and selected based on morphology. 12 repetitions were made, where the COCs were subjected to maturation, fertilization and in vitro production. The percentage of cleaved oocytes was determined on day 3 (D-3) and the oocytes that developed to the stages of 8-16 cells, morulae and blastocyst after fertilization. The quality of blastocyst was assessed with the dye DAPI and the determination of blastomeric positive for apoptosis and DNA fragmentation by TUNEL test. Significant difference ( $P < 0.05$ ) stages fertilization, D-3 and D-4. No significant difference ( $P > 0.05$ ) phases of maturation in vitro, morulae and blastocyst and DNA fragmentation (TUNEL). Under the conditions observed in this study, the results indicate that there was no effect of season on the ability of developing oocytes and in vitro production of sheep embryos.

**Keywords:** Oophorus cumulus complexes, fertilization, blastomeric, apoptosis.

## INTRODUÇÃO

A produção in vitro (PIV) de embriões pode aumentar o número de descendentes de ovelhas vivas ou abatidas, aumentando assim o ganho genético em programas de melhoramento e possibilidades de aplicações comerciais (SIMPLÍCIO et al., 2007). O estresse térmico in vivo nos primeiros dias pode causar mortalidade embrionária e as altas temperaturas ambientais também podem atrasar o ciclo estral em 1 ou 2 dias, alterando o comportamento da fêmea com o macho e encurtar o período do cio (RIBEIRO et al., 2002).

Durante a última década, esforços significativos têm sido feito para melhorar a produtividade e a qualidade dos embriões PIV. O principal problema desta estratégia é a diferença de qualidade entre embriões produzidos in vivo e in vitro. Portanto, melhores maneiras para avaliar a qualidade embrionária são necessárias e a apoptose pode servir



como critério funcional para avaliar a qualidade dos oócitos e embriões PIV (BYRNE et al., 1999).

Ulberg e Burfening (1967) investigaram a relação entre a temperatura retal no momento do acasalamento e da sobrevivência embrionária ou a taxa de gestação em ovinos. Uma relação negativa foi encontrada entre a sobrevivência do embrião, o prazo da taxa de gravidez e o aumento da temperatura retal (37,5 a 40°C). Quando os embriões foram recuperados no 7º dia após inseminação, uma correlação positiva entre temperaturas retal e a porcentagem de embriões anormais foi encontrada (PUTNEY et al., 1988).

O oócito e o embrião no período de pré-implantação têm sido foco de estudos que tentaram elucidar o problema reprodutivo associado ao estresse térmico calórico (PUTNEY et al., 1988; EALY et al., 1993; ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI et al., 2002), mas pouco se conhece quando nos referimos à ovinos (DUTT, 1963; OZAWA et al., 2005). Alguns experimentos demonstraram que o embrião no início do desenvolvimento é severamente afetado pelo estresse térmico calórico e que o mesmo adquire resistência à temperatura elevada à medida que progride no desenvolvimento (EALY et al., 1993). Dessa forma, as caracterizações de apoptose embrionárias após o estresse térmico representam alternativas para minimizar os efeitos negativos da temperatura ambiental sobre a capacidade reprodutiva de fêmeas (WOLFENSON et al., 1995; ROTH et al., 2000), o que pode se repetir em outras espécies como a ovina.

Devido às recentes notícias que comprovam o aquecimento global e a necessidade de conhecer os efeitos do estresse térmico calórico no oócito e embrião, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das estações seca e chuvosa na capacidade de desenvolvimento de oócitos e produção in vitro de embriões da espécie ovina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ovários de ovelhas SRD com idade variando de 12 a 48 meses, abatidas no abatedouro Suimax, localizado na cidade de Igarassu, Região Metropolitana do Recife-PE (latitude 08° 03' 14" S, longitude 34° 52' 52" W). A temperatura ambiente mínima e máxima na estação seca (outubro/2007 a março/2008) foi de 23 a 33°C e na chuvosa (abril a setembro/2008) de 18 a 31°C, respectivamente. A umidade relativa média do ar foi de 71% na seca e 85% na chuva (INMET, 2009).

Imediatamente após a coleta, os ovários foram colocados em garrafa térmica contendo solução fisiológica acrescida de 30 µg/mL de sulfato de gentamicina (meio de transporte) em temperatura de 30°C e transportados ao Laboratório de Biotécnicas da Reprodução da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE um período máximo de uma hora.

Os complexos cumulus oophorus (CCOs) foram colhidos de folículos ovarianos que mediam entre 2 a 6 mm de diâmetro pela técnica de fatiamento “slicing” (produção de pequenas incisões simultâneas múltiplas na superfície do ovário com auxílio de um escarificador). O líquido folicular foi depositado em placa de Petri contendo o meio de colheita (MC) constituído por 8,0 mg de bicarbonato de sódio, 45,0 mg de glucose, 5,6 mg de piruvato de sódio, 11,9 mg de HEPES, 2,5 mg de sulfato de gentamicina e 20,0 mg de álcool polivinílico em 50 mL de TALP.

Os CCOs depositados em placa de Petri foram levados para seleção e recuperação dos oócitos. Uma vez selecionados com base na classificação morfológica descrita por Gonçalves et al. (2008), os oócitos foram lavados por 3 vezes no meio MC. Em seguida foram colocados, 25 oócitos em gotas de 100 µL sob óleo de parafina esterilizada, no meio básico de maturação (MBM) constituído por TCM 199 suplementado com 50 µg/mL de piruvato de sódio, 2,6 mg/mL de bicarbonato de sódio,

10% de soro fetal bovino (SFB), 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 20 µg/mL de FSH/LH (Pluset®) e 1 mg/mL de álcool polivinílico. Imediatamente após, os oócitos foram colocados em estufa a 39° C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Após 24 horas de incubação, os oócitos foram submetidos ao processo de fecundação *in vitro*, utilizado sêmen fresco, conforme Cavalcanti Neto (2004). Cuidadosamente, 0,1 mL de sêmen foi depositado em tubos cônicos de centrifuga contendo 1,5 mL de meio definido modificado (mDM) de acordo com Keskinetepe et al. (1998), o qual foi constituído de 0,1250 g de glucose, 0,1552 g de bicarbonato de sódio, 0,0069 g de piruvato de sódio, 0,0500 g de álcool polivinílico, 0,0500 g de cafeína e 50 µg/mL de gentamicina em 50 mL de mDM. Logo após, foram inclinados em ângulo de 45° com a finalidade de se obter a migração espermática ascendente. Decorridos 45 minutos do “Swim-Up”, 0,8 mL da parte superior de cada tubo foram aspiradas e centrifugadas a 350 G por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, 200 µL do meio mDM contendo 10 µg/mL de heparina foi acrescentado a 200 µL do pellet resultante da centrifugação.

Antes da exposição aos espermatozóides, os oócitos foram avaliados quanto à morfologia e somente aqueles que apresentaram boa expansão das células do cumulus foram lavados em mDM. Posteriormente, 25 oócitos foram transferidos para as gotas de 100 µL do meio mDM sob óleo de parafina esterilizada, local onde foi depositada a suspensão espermática na concentração final de  $2 \times 10^6$  espermatozóides/mL. Os gametas foram incubados em condições idênticas as de maturação durante o período de 18 horas.

Os zigotos foram mecanicamente desnudados no agitador mecânico Vortex® em meio “Synthetic oviduct fluid” modificado (SOFm) durante dois minutos e 25 estruturas

foram transferidas para as gotas de 100  $\mu$ L do meio SOFm suplementados com 10% de SFB, sob óleo de parafina esterilizada. Essas estruturas foram incubadas à 39°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> e depois de sete dias de cultura, avaliou-se o número de células, taxa de clivagem e quais alcançaram estádios de blastocisto.

A fragmentação de DNA característica de apoptose foi analisada com o ensaio de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling). Neste ensaio, o grupo 3'-OH do DNA fragmentado foi marcado com fluoresceína (FITC) através da reação enzimática mediada pela enzima deoxinucleotidil transferase (Tdt), a qual catalisa a polimerização de nucleotídeos modificados no terminal 3'-OH (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a; ROTH e HANSEN, 2004). A identificação de embriões positivos para apoptose e a morfologia nuclear embrionária foram acessados com microscópio de fluorescência, com objetiva de 1000x.

Os blastocistos foram fixados em 100  $\mu$ L da solução de 4% de paraformaldeído por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em 100  $\mu$ L de solução de 1 mg/mL de Polivinilpirrolidona (PVP) + 100  $\mu$ L Phosphate-Buffered Saline (PBS) e incubados em 100  $\mu$ L de meio de permeabilização (0,5% de Triton X-100 contendo 0,1% de citrato de sódio) por uma hora. Após a permeabilização as amostras foram armazenadas a 4°C até a realização do ensaio de TUNEL. No dia do ensaio de TUNEL, as amostras foram lavadas três vezes em gotas de 100  $\mu$ L PBS-PVP e incubadas em 15  $\mu$ L da mistura de TUNEL por uma hora a 37°C. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS-PVP, incubadas com o corante de DNA DAPI por 15 minutos, lavadas em gotas de 100  $\mu$ L de PBS-PVP, transferidas para lâminas e cobertas com lamínula (ROTH e HANSEN, 2004).

Para determinar o efeito das estações seca e chuvosa, na capacidade de desenvolvimento de oócitos e embriões na espécie ovina, foram realizadas 12 repetições, sendo o número de oócitos na estação na seca ( $n = 1231$ ) e na chuvosa ( $n = 1252$ ). Em cada repetição, os CCOs foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). A porcentagem de oócitos clivados foi determinada no dia 3 (D-3) e a que se desenvolveram aos estádios de 8-16 células, mórula e blastocisto foi determinada nos dias 4 (D-4), 5 (D-5) e 8 (D-8) após a fecundação, respectivamente.

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

## **RESULTADOS**

Não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as médias do número de oócitos recuperados em ambas as estações, levando-se em conta o total de estruturas recuperadas. As médias dos oócitos maturados *in vitro* na estação chuvosa foi superior a obtida na seca, não sendo observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ). Os oócitos fertilizados *in vitro* apresentaram médias muito semelhantes, mas com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparada as estações seca e chuvosa (Tabela 1).

Nas etapas de produção *in vitro* de embriões, as médias dos embriões após clivagem (D-3) e os embriões D-4 apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Já

nas etapas de mórula (D-5) e blastocistos (D-8) não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre as estações seca e chuvosa (Tabela 2).

**Tabela 1:** Média e desvio padrão de oócitos recuperados, maturados *in vitro* (MIV) e fertilizados *in vitro* (FIV) da espécie ovina abatidas nas estações seca e chuvosa na Região Metropolitana do Recife-PE.

Etapas da Produção <i>in vitro</i> (PIV)	Estações do ano	
	Seca ( $\bar{x} \pm s$ )	Chuvosa ( $\bar{x} \pm s$ )
Número de oócitos recuperados	102,58 $\pm$ 4,46a	107,08 $\pm$ 6,22a
Maturação <i>in vitro</i> (24h)	55,16 $\pm$ 5,60a	57,16 $\pm$ 7,38a
Fertilização <i>in vitro</i> (18h)	29,33 $\pm$ 3,96a	30,91 $\pm$ 4,31b

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

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

**Tabela 2:** Média e desvio padrão de embriões CIV (D-3), CIV (D-4), mórula (D-5) e blastocistos (D-8) da espécie ovina abatidas nas estações seca e chuvosa na Região Metropolitana do Recife-PE.

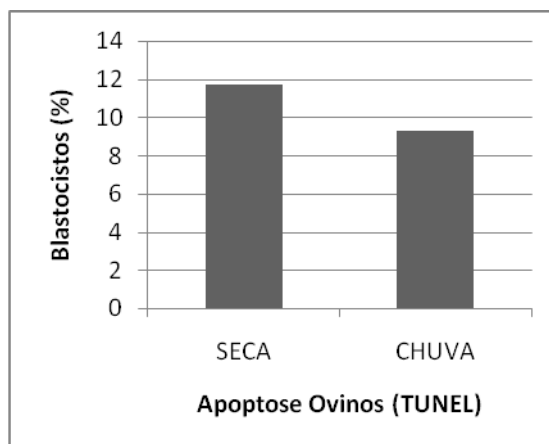
Etapas da Produção <i>in vitro</i> (PIV)	Estações do ano	
	Seca ( $\bar{x} \pm s$ )	Chuvosa ( $\bar{x} \pm s$ )
Embrião CIV (D-3)	24,91 $\pm$ 1,72a	25,83 $\pm$ 1,52b
Embrião CIV (D-4)	22,58 $\pm$ 1,44a	23,25 $\pm$ 1,13b
Mórula (D-5)	21,08 $\pm$ 1,24a	21,25 $\pm$ 1,42a
Blastocisto (D-8)	9,16 $\pm$ 1,40a	9,91 $\pm$ 1,31a

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

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

A porcentagem de blastocistos positivos para apoptose (fragmentação do DNA) na estação seca foi 11,76% e na chuvosa 9,33%. No entanto, o choque térmico produzido pelo ambiente não aumentou a apoptose nos blastocistos cultivados até o D-8. A apoptose foi quantificada e submetida à análise de variância, não sendo encontrado

diferença significativa ( $P > 0,05$ ) no teste de TUNEL realizado nos blastocistos (Figura 1).



**Figura 1:** Porcentagem de blastocistos positivos para Apoptose (Fragmentação do DNA) em fêmeas ovinas ( $P < 0,05$ ) pelo teste F, abatidos nas estações seca e chuvosa na Região Metropolitana do Recife.

## DISCUSSÃO

Freitas et al. (2007), utilizando meio de maturação composto de TCM-199 suplementado com cisteamina, fator de crescimento epidermal e gentamicina, obtiveram uma taxa de maturação nuclear para oócitos ovinos de 33,3%, inferior aos  $55,16 \pm 5,60$  na estação seca e  $57,16 \pm 7,38$  na chuvosa obtidos neste experimento. Segundo Mermillod et al. (1999), a aquisição da competência dos oócitos para o desenvolvimento ocorre durante a foliculogênese e é influenciada pela idade da doadora, o tamanho e a atresia dos folículos. Contudo, independente da natureza heterogênea dos oócitos imaturos usados para a PIV, a maturação deles pode ser influenciada pelos componentes do meio e as condições de cultivo (SIMPLÍCIO et al., 2007).

Independente do sistema de cultivo, as taxas de maturação de oócitos são similares (HOLM et al., 1994). Contudo, após transferência para receptoras sincronizadas, o CIV de zigotos em meio SOF, reduziu a viabilidade do embrião para 15,0% a 25,0% em comparação ao co-cultivo (RANILLA et al., 1998) e ao desenvolvimento no oviduto (HOLM et al., 1996). Neste estudo, as taxas de mórula ( $21,08 \pm 1,24$  e  $21,25 \pm 1,42$ ) e blastocistos ( $9,16 \pm 1,40$  e  $9,91 \pm 1,31$ ) independentes das estações seca e chuvosa, respectivamente, foram baixas em comparação as encontradas por Bernardi (2005) em estudos com PIV, mesmo utilizando a adição de SFB ao meio de cultivo que, segundo Gardner et al. (1994) tem um efeito sobre a morfologia do embrião, e quando o número total de células diminuiu, a incidência da apoptose pode ser aumentada na presença do soro (BYRNE et al., 1999).

A estação das chuvas com melhores taxas de maturação ( $57,16 \pm 7,38$ ), fertilização ( $30,91 \pm 4,31$ ) e desenvolvimento embrionário, representado pela taxa de clivagem (D-3) e (D-4), foram aqueles em que as temperaturas estavam mais baixas com maior oferta de alimento nas pastagens, período em que os animais estão menos sujeitos ao estresse calórico, conferindo-lhes maior sucesso reprodutivo (WOLFESON et al., 2001). No entanto, o período compreendido entre outubro a março (seca) é também a época de maior estiagem do ano, sendo crítico em algumas regiões do Nordeste o cultivo de pastagens pobres em nutrientes, resultando em menor oferta de alimento para os animais criados nessas condições (SIMPLÍCIO et al., 2007).

A baixa disponibilidade de melhores pastagens na época seca proporciona um aporte nutricional inadequado, refletindo na redução gradativa de peso, tendo influência negativa nas taxas de crescimento e tamanho do folículo ovulatório, resultando em alterações na competência e desenvolvimento dos oócitos, conforme demonstrado por Webb et al. (2004). Os animais estavam provavelmente submetidos a essas condições



de pastagens, contudo o efeito nutricional sobre a qualidade dos oócitos pode não ser imediato. Tal efeito retardado pode provavelmente ser devido à capacidade biológica de armazenar recursos durante a época de abundância de pastagens para a manutenção das atividades fisiológicas em condições adversas. Com isso, o efeito sobre o potencial de desenvolvimento dos oócitos surge posteriormente, quando as reservas do animal se reduzem (WEBB et al., 2004). Dessa maneira, a manutenção das taxas de cultivo *in vitro* no período da seca pode ser devido a essa capacidade do animal de utilizar suas reservas, apesar da menor disponibilidade de pastagem (GONZALES-BULNES et al., 2004).

Vários estudos demonstram que as temperaturas ambientais podem produzir um estresse térmico celular associado com perdas embrionárias *in vitro* (EALY et al., 1995; EDWARDS e HANSEN, 1997; JU et al., 1999), podendo induzir apoptose, conforme determinado por reação do teste de TUNEL. Devido características próprias, os ovinos SRD estão bem adaptados as condições ambientais, mas 9,33% a 11,76% (chuva e seca, respectivamente) dos blastômeros foram positivos para marcação TUNEL após exposição a estas condições. É possível que nas fases iniciais de cultivo, logo após fertilização, como aconteceu neste estudo, apoptoses mais extensas pudessem comprometer o desenvolvimento embrionário nestas condições (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002ab).

Paula-Lopes e Hansen (2002a) estudando a exposição dos embriões a um ambiente adverso na pré-implantação observaram que, pode aumentar o número de células apoptóticas. O efeito deletério do choque térmico em células embrionárias dependeu da magnitude do choque térmico e do estágio de desenvolvimento embrionário (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002b). A apoptose é um fenômeno adquirido que ocorre em embriões expostos a estresse térmico, e pode ser prevenida

pela indução de termotolerância. A maior sensibilidade nas fases iniciais do CIV observada neste estudo pode justificar as porcentagens de apoptose, pois segundo Paula-Lopes e Hansen (2002b) o choque térmico, nos estádios de 2-4 célula provocou uma maior redução no número de células embrionárias apoptóticas do que o choque térmico em fases posteriores de cultivo.

Dada a importância da apoptose na determinação da sobrevivência embrionária em resposta as condições ambientais, podendo levar a novos métodos para melhorar os sistemas destinados à produção *in vitro* de embriões ou a redução da mortalidade embrionária em fêmeas ovinas. Outros estudos avaliando índices de desenvolvimento, bem como os efeitos das estações seca e chuvosa deverão adicionar subsídios sobre as implicações da apoptose induzida por estresse térmico na sobrevivência embrionária da espécie.

## CONCLUSÃO

Nas condições observadas neste estudo, os resultados permitem concluir que não houve efeito da estação do ano na capacidade de desenvolvimento dos oócitos e na produção *in vitro* de embriões na espécie ovina.

## REFERÊNCIAS

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.

BERNARDI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.1-16, 2005.

BYRNE, A. T.; et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.97-105, 1999.

CAVALCANTI NETO, C. C. Uso do retinol na produção *in vitro* de embriões caprinos. 113p. 2004. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais.

DUTT, R. H. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. **Journal Animal Science**, v.22, p.713–719, 1963.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction Development**. v.46, p.138–145, 1997.

EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal Dairy Science**. v.76, p.2899-2905, 1993.

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

JU, J-C.; PARKS, J. E.; YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.336–340, 1999.

FREITAS, V. J. F.; et al.. Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no nordeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 (Supl. 3), p.781-786, 2007.

GARDNER, D. K.; et al. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. **Biology of Reproduction**, v.50, p.390-100, 1994.

GONÇALVES, P. B. D.; et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (2ª ed.), **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, Editora Roca, São Paulo, p.261-292, 2008.

GONZALES-BULNES, A.; et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, n.14, p.421-435, 2004.

HOLM, P.; et al. *In vitro* vs *in vivo* culture of ovine IVM/IVF ova: effect on lambing. **Theriogenology**, v.41, n.2, p.217-221, 1994.

HOLM, P.; WALKER, W. H.; SEAMARK, R. F. Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized zygotes cultured *in vitro* or *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.107, p.175-181, 1996.

INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/html/prev\\_climatica\\_tempo/prognostico](http://www.inmet.gov.br/html/prev_climatica_tempo/prognostico)>. Acesso em: 23 abr. 2009.

KESKINTEPE, L.; SIMPLICIO, A. A.; BRACKETT, B.G. Caprine blastocyst development after *in vitro* fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. **Theriogenology**, v.49, n.7, p.1265-1274, 1998.

MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIÉ, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.449-460, 1999.

OZAWA, M.; et al. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. **Reproduction**, v.129, p.621-630, 2005.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communicator**. v.295, p.37-42, 2002a.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Heat Shock-Induced Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos. Is a Developmentally Regulated Phenomenon. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1169–1177, 2002b.

PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated temperatures between days 1 to 7 post insemination. **Theriogenology**, v.30, n.2, p.195-209, 1988.

RANILLA, M. J.; et al. The incidence of embryo and fetal loss following the transfer of in vitro-cultured sheep embryos. **Theriogenology**, v.49, n.2, p.248-253, 1998.

RIBEIRO, L. A. O.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Prenhez em rebanhos ovinos do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Ciência Rural**, v.32, n.4, p.121-129, 2002.

ROCHA, A.; et al.. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.49, n.4, p.657-665, 1998.

ROTH, Z.; et al.. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.120, p.83-90, 2000.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1898-1906, 2004.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**, 3ª Ed.. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2007. 264 p.

SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.234-246, 2007.

ULBERG, L.C.; BURFENING, P.J. Embryo death resulting from adverse environment on spermatozoa or ova. **Journal Animal Science**, v.26, p.571-577, 1967.

WEBB, R.; et al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal Animal Science**, v.82, Suppl.: E63-74, 2004.

WOLFENSON, D.; et al. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**. v.52, p.1106-1113, 1995.

WOLFESON, Y. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.121, p.447-454, 2001.

## CAPÍTULO 2

---

**Efeito da estação do ano sobre a maturação nuclear *in vitro* e a indução da morte celular por apoptose em oócitos da espécie caprina**

*(Effect of season on in vitro nuclear maturation and induction of cell death through apoptosis in goat oocytes)*

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar o efeito da estação do ano na maturação nuclear *in vitro* e na indução da morte celular por apoptose em oócitos ovino. Os ovários de ovelhas nas estações seca (outubro a março) e chuvosa (abril a setembro), foram coletados em abatedouro e transportados ao Laboratório de Biotécnicas da Reprodução da UFRPE. Os complexos *cumulus oophorus* de 12 repetições foram colhidos pela técnica de “*slicing*” dos folículos entre 2 a 6 mm de diâmetro e selecionados com base na classificação morfológica, 25 oócitos foram colocados em meio básico de maturação (MBM). Após a maturação, foi determinado o estágio de maturação nuclear com o corante DAPI, a atividade das enzimas Caspases do grupo II com reagente PhiPhiLux-G<sub>1</sub>D<sub>2</sub> e fragmentação de DNA (TUNEL). Com relação a estação do ano os estádios de maturação nuclear as fases de Vesícula Germinativa, Metáfase I, Telófase I e Metáfase II não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Foi encontrada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na atividade das enzimas Caspases dos oócitos maturados *in vitro*. Entretanto a fragmentação do DNA não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Com base nos dados obtidos, podemos concluir que as estações do ano não exercem influência na maturação nuclear *in vitro* e na apoptose de oócitos da espécie ovina.

**Palavras-chave:** Apoptose, complexos *cumulus oophorus*, folículos, caspases, TUNEL.

## ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of season on nuclear maturation *in vitro* and induction of cell death by apoptosis in sheep oocytes. The ovaries of sheep in the dry season (October to March) and rainy season (April to September) were collected in a slaughterhouse and transported to the Laboratory of Biotechnical Reproduction of



UFRPE. The *cumulus oophorus* in 12 repetitions were harvested by the technique of "slicing" of the follicles from 2 to 6 mm in diameter and selected based on morphologic classification, 25 oocytes were placed in basic medium of maturity (MBM). After maturation, we determined the maturity stage with the nuclear dye DAPI, the activity of enzymes of group II caspases with reagent PhiPhiLux-G1D2 and DNA fragmentation (TUNEL). In the stages of nuclear maturation stages of Germinal Vesicle, Metaphase I, Telophase I and Metaphase II showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). Significant difference ( $P < 0.05$ ) in enzyme activity of caspases *in vitro* matured oocytes. The fragmentation of DNA showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). Based on data obtained, we conclude that the seasons do not influence nuclear maturation *in vitro* and in apoptosis of oocytes of sheep.

**Keywords:** Apoptosis, *cumulus oophorus* complexes, follicles, caspases, TUNEL.

## INTRODUÇÃO

A baixa produtividade dos rebanhos ovinos locais tem sido contornada através da importação de raças exóticas. Neste contexto, o fator climático deve ser levado em consideração, devido ao estresse causado pela alta temperatura e umidade do ar. No entanto, a baixa produtividade e a alta relação custo/benefício do sistema de produção limitam o aproveitamento dessa atividade no país (COSTA et al., 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram a susceptibilidade dos oócitos aos efeitos diretos da temperatura elevada reduzindo a maturação nuclear, a fecundação (ROTH e HANSEN, 2005) e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (JU et al., 2005). A exposição de oócitos bovinos à temperatura severa de 42-43°C (ROTH e HANSEN, 2004b) ou à temperatura moderada de 40-41°C (ROTH e HANSEN, 2004a) durante as primeiras 12 horas de MIV bloqueou ou reduziu o desenvolvimento

embrionário. Existe na literatura apenas um relato em que o estresse térmico *in vitro* foi aplicado durante a fase de VG. A exposição de oócitos na fase VG ao estresse térmico de 41°C reduziu o desenvolvimento embrionário (PAYTON et al., 2004).

A apoptose é o processo de morte celular programada em que ocorre autodigestão controlada da célula. Morfologicamente a apoptose caracteriza-se por agregação e condensação da cromatina (forma de meia-lua ou ferradura), condensação e fragmentação do núcleo, contração e condensação do citoplasma, protruções na membrana plasmática, contração das organelas, formação de vacúolos citoplasmáticos, colapso da estrutura da célula, fragmentação celular sem extravasamento do conteúdo intracelular e formação de corpos apoptóticos (BROKER et al., 2005). Fenômeno comum no desenvolvimento de mamíferos e funciona como um mecanismo de “controle de qualidade” para eliminação de células danificadas, anormais ou células que perderam a função (MEIER et al., 2000). Essa forma de morte celular já foi identificada em muitos tipos de células incluindo oócitos (ROTH e HANSEN, 2004a), células do *cumulus* (KOLLE et al., 2003) e embriões bovinos (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a; PAULA-LOPES e HANSEN, 2002b).

Os mecanismos pelo qual o estresse térmico afeta a capacidade de desenvolvimento oocitário ainda não foram completamente esclarecidos. No entanto, tendo em vista que a apoptose é a principal responsável pela redução do número de oócitos durante a vida reprodutiva de fêmeas mamíferas (TILLY, 2001), é possível que esta forma de morte celular seja induzida em oócitos expostos às condições de estresse (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002b).

Dessa forma, a caracterização e a manipulação dos mecanismos envolvidos na indução de apoptose oocitária após o estresse térmico representam alternativas para minimizar os efeitos negativos da temperatura elevada sobre a capacidade reprodutiva

de fêmeas bovinas o que pode se repetir em outras espécies como a ovina. (TILLY, 2001),

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito das estações do ano (seca e chuvosa) na maturação nuclear *in vitro* e na indução da morte celular por apoptose em oócitos da espécie ovina.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foi utilizado o modelo de estresse térmico calórico descrito por Al-Katanani et al. (2002) para demonstrar o efeito da estação do ano na capacidade de desenvolvimento dos oócitos. Neste modelo, os ovários foram colhidos de ovelhas na estação seca (outubro a março) e chuvosa (abril a setembro). O índice de temperatura e umidade de cada mês foi calculado com base nos dados climáticos obtidos das estações meteorológicas (INMET) estaduais. A temperatura retal e frequência respiratória dos animais foram aferidas no dia do abate. Os ovários foram classificados de acordo com o número de folículos e os oócitos foram processados separadamente em todos os experimentos.

Foram utilizados ovários de ovelhas SRD com idade variando de 12 a 46 meses, abatidas no abatedouro Suimax, localizado na cidade de Igarassu, Região Metropolitana do Recife (latitude 08° 03' 14" S, longitude 34° 52' 52" W). A temperatura ambiente mínima e máxima e na seca (outubro/2007 a março/2008) foi de 23 e 33°C e na chuvosa (abril a setembro/2008) de 18 e 31°C, respectivamente. A umidade relativa média do ar foi de 71% no verão (período seco) e 85% no inverno (período chuvoso) (INMET, 2009).

Em um período máximo de uma hora, foram transportados para o Laboratório de Biotécnica da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da

Universidade Federal Rural de Pernambuco, imediatamente após o abate os ovários foram colhidos e colocados em garrafa térmica contendo solução fisiológica em temperatura de 30°C acrescida de 30µg/mL de sulfato de gentamicina (meio de transporte).

Os complexos cumulus oophorus (CCOs) foram colhidos pela técnica de fatiamento “slicing” (produção de pequenas incisões simultâneas múltiplas na superfície do ovário com auxílio de um escarificador) dos folículos ovarianos que mediam de 2 a 6 mm de diâmetro. O líquido folicular foi depositado em placa de Petri contendo o meio de coleta (MC) constituído por 8,0 mg de bicarbonato de sódio, 45,0 mg de glucose, 5,6 mg de piruvato de sódio, 11,9 mg de HEPES, 2,5 mg de sulfato de gentamicina e 20,0 mg de álcool polivinílico em 50 mL de TALP.

Os CCOs foram selecionados morfológicamente de acordo com a classificação descrita por Gonçalves et al. (2008) e lavados três vezes no meio de coleta. Em seguida, grupos de CCOs foram maturados em gotas de 100 µL, no meio básico de maturação [MBM: TCM 199 suplementado com 50 µg/mL de piruvato de sódio, 2,6 mg/mL de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 20 µg/mL de FSH/LH (Pluset®) e 1 mg/mL de álcool polivinílico] sob óleo de parafina esterilizada em estufa a 39°C, com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Foram realizadas 12 repetições em cada estação, na estação seca (n = 1158) oócitos e na chuvosa (n = 1151) de 240 e 286 ovários, respectivamente. Em cada repetição os CCOs foram divididos em dois grupos: no Grupo-1 os CCOs foram avaliados imediatamente após a coleta e no Grupo 2 os CCOs foram avaliados após a maturação *in vitro*.

No Grupo-1 os CCOs recém coletados foram desnudados e inicialmente processados para determinação da atividade das enzimas Caspases do grupo II com reagente PhiPhiLux-G1D2 (Oncoimmunin®). Este reagente contém a sequência de aminoácidos DEVDGI que é o substrato específico para enzimas caspases do grupo II (caspases-3, -7 e -2), reconhecida por este grupo de enzimas. Após a avaliação das caspases, os oócitos foram fixados em uma solução de 4% de paraformaldeído por uma hora e armazenados em solução de 100 µL de Phosphate-Buffered Saline (PBS) + 1 mg/mL de polivinilpirrolidona (PVP) a 4°C até a realização do ensaio de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling). Neste ensaio, o grupo 3'-OH do DNA fragmentado foi marcado com fluoresceína (FITC) através da reação enzimática mediada pela enzima deoxinucleotidil transferase (Tdt), a qual catalisa a polimerização de nucleotídeos modificados no terminal 3'-OH, como preconizaram Paula-Lopes e Hansen (2002a) e Roth e Hansen (2004a).

No Grupo-2 os CCOs foram submetidos a MIV. Após a maturação, os oócitos foram desnudos individualmente para determinação da atividade das enzimas Caspases do grupo II (PhiPhiLux-G1D2) e fragmentação de DNA (TUNEL) como descritos para o Grupo-1. Após a MIV, partes dos oócitos foram desnudados no agitador mecânico Vortex®, em meio mDM durante três minutos a velocidade “7” (escala 1-10), colocados entre lâmina e lamínula e fixados em etanol e ácido acético (3:1) por 12 horas e, posteriormente corados com orceína acética a 1%, observando-se sob microscopia óptica de imersão (1000x). Imediatamente após a coloração foram classificados como não definido (N.D.), oócitos onde não era possível identificar a fase da meiose devido à presença de células do cumulus ou da corona radiata (falha no processo de desnudamento); degenerado (Deg.), oócitos que se apresentavam vacuolizados, não sendo possível a visualização dos cromossomos; vesícula germinativa (V.G.), núcleo

definido, com ou sem nucléolo, sem condensação da cromatina; rompimento da vesícula germinativa (G.V.B.D. - Germinative Vesicle Break-Down), final da Prófase I com condensação da cromatina (Diacinese); metáfase I (MI), cromossomos já condensados formando a placa equatorial ou início da formação da mesma; anáfase I (AI), início da migração dos cromossomos para os pólos da célula com fibras do fuso aparentes; telófase I (TI), cromossomos já nos pólos, com fibras do fuso aparentes e metáfase II (MII), cromossomos formando a placa equatorial com o primeiro corpúsculo polar exteriorizado.

Para a análise estatística foi realizada análise de variância pelo método dos quadrados mínimos. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão (análise de variância entre grupos). Considerando as medidas tratadas em percentuais procedemos ao seguinte teste, uma comparação de variâncias, pelo *teste F* para variâncias ao nível de significância 5% ( $P < 0,05$ ), para variâncias equivalentes ou variâncias distintas (SAMPAIO, 2007).

## **RESULTADOS**

No Grupo-1 houve efeito das estações seca ou chuvosa na qualidade dos CCOs recuperados apresentando diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na média e desvio padrão dos oócitos qualidade QI, II e IV sendo superior a QI na seca e QIV na chuvosa (Tabela 3).

No Grupo-2, quando estes oócitos foram MIV não houve efeito da estação ( $P > 0,05$ ) do ano na média e desvio padrão dos oócitos em todas as qualidades estudadas. Também não foi verificada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) quando comparados a maturação *in vitro* de oócitos de fêmeas abatidas na estação seca e chuvosa (Tabela 4).

**Tabela 3:** Média e desvio padrão da qualidade de complexo *cumulus oophorus* (CCOs) recuperados não maturados de fêmeas ovinas abatidas na região Metropolitana do Recife.

CCOs Recuperados não maturados	Estações do ano	
	Seca n / ( $\bar{x} \pm s$ )	Chuvosa n / ( $\bar{x} \pm s$ )
Qualidade I (QI)	175 / 14,58±3,44 <sup>a</sup>	145 / 12,08±2,84 <sup>b</sup>
Qualidade II (QII)	232 / 19,33±3,47 <sup>a</sup>	250 / 20,83±3,53 <sup>b</sup>
Qualidade III (QIII)	302 / 25,16±5,18 <sup>a</sup>	371 / 30,91±4,07 <sup>a</sup>
Qualidade IV (QIV)	265 / 22,08±6,40 <sup>a</sup>	479 / 39,91±9,78 <sup>b</sup>
Total	974 / 100	1245 / 100

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) pelo teste *F*. n = número de oócitos,  $\bar{x}$  = média, s = desvio padrão.

**Tabela 4:** Média e desvio padrão da qualidade de complexo *cumulus oophorus* (CCOs) maturados *in vitro* (MIV) da espécie ovina abatidas na região Metropolitana do Recife.

CCOs maturados <i>in vitro</i>	Estações do ano	
	Seca n / ( $\bar{x} \pm s$ )	Chuvosa n / ( $\bar{x} \pm s$ )
Qualidade I (QI)	144 / 12,00±2,37 <sup>a</sup>	154 / 12,83±2,44 <sup>a</sup>
Qualidade II (QII)	252 / 21,00±2,59 <sup>a</sup>	238 / 19,83±3,37 <sup>a</sup>
Qualidade III (QIII)	299 / 24,91±3,42 <sup>a</sup>	337 / 28,08±2,06 <sup>a</sup>
Qualidade IV (QIV)	463 / 38,58±6,82 <sup>a</sup>	422 / 35,16±10,14 <sup>a</sup>
Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	763 / 59,66±7,60 <sup>a</sup>	801 / 63,83±8,00 <sup>a</sup>
Total	1158 / 100	1151 / 100

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) pelo teste *F*. n = número de oócitos,  $\bar{x}$  = média, s = desvio padrão.

Em oócitos do Grupo-2 a média e desvio padrão dos oócitos Deg, ND, VG, MI, TI e MII não foram afetadas pela estação do ano ( $P > 0,05$ ). No entanto, a média e desvio padrão dos oócito em VGBD foi maior na estação seca e AI foi maior na estação chuvosa ( $P < 0,05$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Média e desvio padrão do estágio da maturação nuclear de oócitos da espécie ovina abatida na região Metropolitana do Recife.

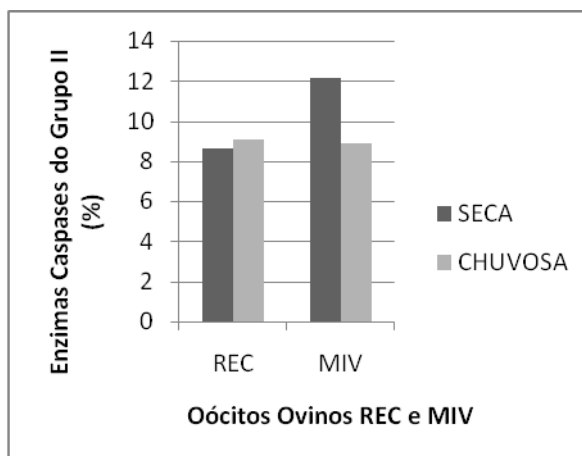
Estádio de maturação nuclear	Estações do ano	
	Seca n / ( $\bar{x} \pm s$ )	Chuvosa n / ( $\bar{x} \pm s$ )
Degenerados (Deg.)	59 / 8,75±1,04 <sup>a</sup>	73 / 9,12±1,32 <sup>a</sup>
Não Definido (ND)	39 / 4,97±2,32 <sup>a</sup>	50 / 5,08±2,46 <sup>a</sup>
Vesícula Germinativa (VG)	23 / 3,55±1,93 <sup>a</sup>	16 / 3,08±2,14 <sup>a</sup>
Rompimento da Vesícula Germinativa (GVBD)	58 / 8,93±2,52 <sup>a</sup>	23 / 2,25±2,57 <sup>b</sup>
Metáfase I (MI)	29 / 5,08±1,41 <sup>a</sup>	19 / 3,85±2,95 <sup>a</sup>
Anáfase I (AI)	15 / 2,96±3,05 <sup>a</sup>	34 / 5,25±3,53 <sup>b</sup>
Telófase I (TI)	24 / 4,02±2,25 <sup>a</sup>	19 / 3,89±2,76 <sup>a</sup>
Metáfase II (MII)	469 / 63,44±5,38 <sup>a</sup>	532 / 65,35±4,64 <sup>a</sup>
Total	716 / 100	766 / 100

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) pelo teste *F*. n = número de oócitos,  $\bar{x}$  = média, s = desvio padrão.

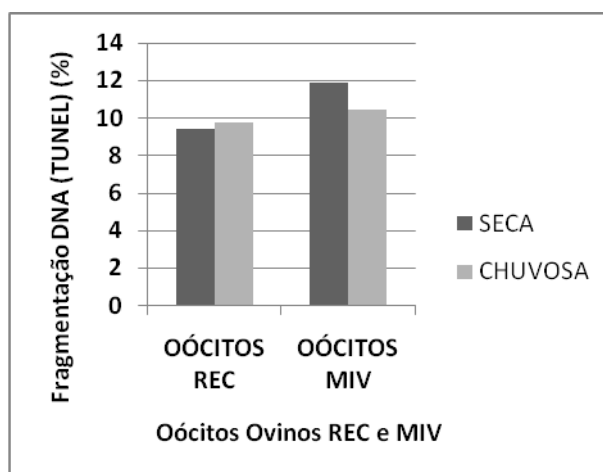
A atividade das enzimas caspases não foi afetada pela estação do ano em oócito do Grupo-1 não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Já em oócito do Grupo-2 a atividade das enzimas caspases foi afetada pela estação do ano e os resultados foram significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ), (Figura 2). Em oócitos recuperados antes da MIV (Grupo-1) a atividade de caspases foi 8,62% na estação seca e 9,08% na chuvosa. Quando a atividade enzimática foi avaliada após a MIV (Grupo-2) foi 12,15% na estação seca e 8,73% na chuvosa (Figura 2).

A porcentagem de oócitos com fragmentação do DNA positivos para o teste de TUNEL não foi afetada pela estação do ano tanto em oócito dos Grupo-1 como do Grupo-2, não apresentando diferença significativa ( $P > 0,05$ ), (Figura 3). No Grupo-1 a proporção de oócitos TUNEL-positivo foi 9,44% na estação seca e 9,80% na chuvosa. Quando os oócitos foram submetidos a MIV a porcentagem de oócitos TUNEL-positivo foi 11,87% na estação seca e 10,44% na chuvosa (Figura 3).



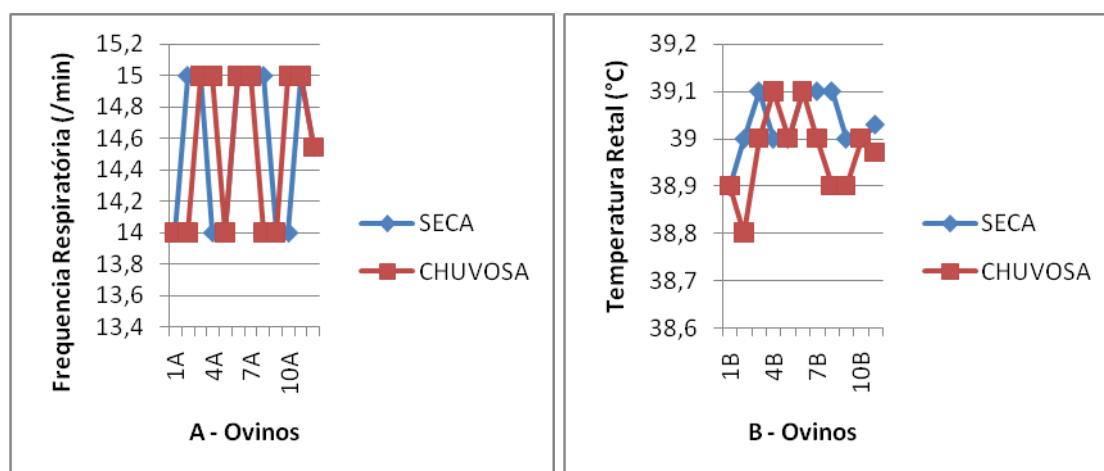


**Figura 2:** Efeito das estações seca e chuvosa na atividade das enzimas Caspase do grupo II de oócitos recuperados (REC.) e maturados *in vitro* (MIV) da espécie ovina ( $P < 0,05$ ) pelo teste *F*.



**Figura 3:** Efeito das estações seca e chuvosa na fragmentação de DNA (Tunel) de oócitos recuperados (REC) e maturados *in vitro* (MIV) da espécie ovina ( $P < 0,05$ ) pelo teste *F*.

A média da frequência respiratória foi de 14,5 p/minuto, idêntica em ambas as estações, apresentando variações de 14 a 15 movimentos respiratórios por minuto. A média da temperatura retal na estação seca foi 39,03°C com variações de 38,9 a 39,1°C e na estação chuvosa a média foi 38,97°C com variações 38,8 a 39,1°C (Figura 4).



**Figuras 4 ( a e b):** Frequência respiratória (FR) e Temperatura retal (TR) de ovinos nas estações seca e chuvosa.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise da maturação nuclear *in vitro* de oócitos logo após a MIV nas estações seca e chuvosa diferem dos resultados encontrados por Shirazi e Sadeghi (2007), mostrando que pode ocorrer uma grande variação na espécie, podendo sofrer influências genéticas, nutricionais e estacionais. As taxas de MII obtidas foram inferiores aos resultados obtidos por Shirazi e Sadeghi (2007) que obtiveram baixos percentuais de oócitos desnudos e Carneiro (2008) pesquisando diferentes concentrações de IGF-1 nos meios de maturação. As maiores taxas de MII obtidas explicam-se, segundo Ledda et al. (2001) e Cecconi et al. (2007), pelo fato de que, em cultivo ocorre uma maior porcentagem de oócitos que completam a maturação devido à presença de células do *cumulus*, apresentando menores porcentagens de oócitos nas fases intermediárias da meiose, o que favorece a maturação oocitária na espécie.

Esta diferença pode ser atribuída à dinâmica folicular característica dos pequenos ruminantes, como citado por Vinales et al. (2002), quando estudaram as particularidades do ciclo sexual de ovelhas. Desta forma, em qualquer fase do ciclo estral existem folículos em crescimento ou sofrendo atresia. A atresia dos folículos recrutados ocorre em função da diminuição da concentração plasmática de FSH

(ADAMS et al., 1992), induzindo no folículo atrésico baixos níveis de estradiol intra-folicular (KRUIP e BONI, 1994).

A presença das células do *cumulus* é um fator importante na qualidade dos CCOs e benéfica para a obtenção de embriões após a FIV, pois oócitos desnudos têm uma taxa de clivagem baixa e qualidade inferior (FATEHI et al., 2005). Blondin e Sirard (1995) observaram em bovinos que a competência para o desenvolvimento embrionário *in vitro* somente foi afetada por altos níveis de atresia nas células do *cumulus*. Os oócitos com células do *cumulus* exibindo sinais médios de atresia tiveram taxas maiores de desenvolvimento embrionário que oócitos sem sinais de atresia. *In vitro*, a expansão do *cumulus* é visível a partir de 12 horas de maturação (SUTOVSKY et al., 1993). A presença considerável de glicosaminoglicanos nas células do *cumulus* impede a ação do estresse oxidativo dos radicais livres sobre os oócitos, evitando a redução na taxa de maturação e clivagem (LUVONI et al., 1996), e o choque térmico que bloqueia a síntese de proteínas (EDWARDS e HANSEN, 1997).

A condição fisiológica da doadora, como peso, raça, idade e variação individual, têm merecido atenção em diversos estudos (VINOLES et al., 2002; FATEHI et al., 2005; CECCONI et al., 2007). Na avaliação da qualidade dos oócitos maturados, obtivemos uma taxa proporcional independente da estação, corroborando com Shirazi e Sadeghi (2007) e Cecconi et al. (2007), que obtiveram altas taxas de maturação em condições especiais de cultivo. Os CCOs de todas as classificações não diferiram na espécie independente da estação. A porcentagem de CCOs QI e QII obtidos foi pequena quando comparado com QIII e QIV, como encontrado por Chaves et al. (2009) onde concluíram que o diâmetro folicular não exerce influência sobre a qualidade do complexo *cumulus oophorus* recuperado de fêmeas ovinas no que aumenta a importância das células do *cumulus*.

As mudanças apoptóticas desenvolvidas por alguns oócitos expostos a altas temperaturas ambientais evidenciam que alguns destes oócitos apresentam melhores condições de sobrevivência a estas alterações. Estas agressões do ambiente desenvolvem componentes inter e intra-celulares que definem se um oócito pode reagir (ROTH e HANSEN, 2004b). Tatemoto et al. (2000) estudando oócitos suínos observaram que as células do *cumulus* parecem ter um papel fundamental na proteção contra apoptose induzida por estresse oxidativo. Edwards e Hansen (1996) concluíram que estas células fornecem termo-proteção para oócitos bovinos e, talvez, a integridade e a função dos complexos *cumulus oophorus* possam afetar a capacidade de sobreviver a uma maturação oocitária após choque térmico o que justifica que oócitos não maturados apresentam menos alterações que os maturados *in vitro*.

Estes achados evidenciam que a temperatura ambiente dentro de intervalos fisiológicos pode ser um estímulo para a morte celular programada em oócitos mamíferos, corroborando com Roth e Hansen (2004b), que pesquisaram a competência do desenvolvimento de oócitos bovinos. Uma variedade de outras condições adversas também pode induzir a apoptose oocitária, incluindo a exposição às drogas quimioterápicas (PEREZ et al., 1997), radiações ionizantes (MORITA et al., 2000), estresse oxidativo (TATEMOTO et al., 2000) e criopreservação (MEN et al., 2003).

No presente estudo, não foram observadas fortes mudanças morfológicas em associação com o aumento da atividade caspase. A fragmentação celular nos oócitos observadas por Van Blerkom e Davis (1998) não é sempre um resultado da ativação da caspase e, portanto, é possível que o choque térmico produzido pelo ambiente induza a atividade caspase e a fragmentação nuclear sem induzir o complemento total de mudanças associadas com a apoptose celular independente da estação do ano.

Entretanto, pesquisas adicionais com maior número de repetições em outras regiões são necessárias para validar estes resultados.

## CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos, podemos concluir que as estações do ano não exercem influência na maturação nuclear *in vitro* e na apoptose de oócitos da espécie ovina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P.; et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.177-188, 1992.

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.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in sheep oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.62, p.575-582, 1995.

BROKER, L.E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clinic Cancer Research**. v.11, p.3155-3162, 2005.

CARNEIRO, G. F. Biotécnicas da reprodução assistida em pequenos ruminantes. **Tecnologias e Ciência Agropecuária**, v.2, p.23-28, 2008.

CECCONI, S.; et al.. Meiotic Maturation of Incompetent Prepubertal Sheep Oocytes Is Induced by Paracrine Factor(s) Released by Gonadotropin-Stimulated Oocyte-Cumulus

Cell Complexes and Involves Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. **Endocrinology**, v.149, n.1, p.100-107, 2007.

CHAVES, R. M.; et al.. Efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de ovelhas (*Ovis aries*) e cabras (*Capra hircus*). Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, p.468, 2009.

COSTA, R. G.; et al. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v.57, n.218, p.196-205. 2008.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**. v.55, p.340-346, 1996.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.138-145, 1997.

FATEHI, A. N.; et al. Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v.13, n.2, p.177-185, 2005.

GONÇALVES, P. B. D.; et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (2ª ed.), **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, Editora Roca, São Paulo, p.261-292, 2008.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/html/prev\\_climatica\\_tempo/prognostico](http://www.inmet.gov.br/html/prev_climatica_tempo/prognostico)>. Acesso em: 23 abr. 2009.

JU, J. C.; et al. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.64, p.1677-1689, 2005.

KOLLE, S.; et al.. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**. v.68, p.1584-589, 2003.

KRUIP, T. A.; BONI, R. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v.42, n.4, p.675-684, 1994.

LEDDA, S.; et al. Cell Coupling and Maturation-Promoting Factor Activity in In Vitro-Matured Prepubertal and Adult Sheep Oocytes. **Biology of Reproduction**, v.65, p.247-252, 2001.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.437-443, 1996.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v.407, p.796-801, 2000.

MEN H.; et al. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**, v.47, p.73–81, 2003.

MORITA, Y.; et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. **Nature Medical**, v.6, p.1109-1114, 2000.

PAYTON, R. R.; et al.. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v.71, p.1303-1308, 2004.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communicator**, v.295, p.37-42, 2002a.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1169-1177, 2002b.

PEREZ, G. I.; et al. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. **Natural Medical**, v.3, p.1228-1332, 1997.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1898-1906, 2004a.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, v.71, p.2072-2078, 2004b.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v.129, p.235-244, 2005.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**, 3ª Ed.. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2007. 264 p.

SHIRAZI, A.; SADEGHI, N. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. **Small Ruminant Research**, v.69, p.103–107, 2007.

SUTOVSKY, P.; et al. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* of culture of cattle oocyte *cumulus* complexes. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1277-1287, 1993.

TATEMOTO, H.; SAKURI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptosis cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.63, p.805-810, 2000.



TILLY, J. L. Commuting the death sentence: how oocyte strive to survive. **Nature Reviews Molecular Cellular Biology**, v.2, p.838-848, 2001.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. W. DNA strand break and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and culture mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. **Humana Reproduction**. v.13, p.1317-1324, 1998.

VINOLES, C.; et al.. Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. **Animal Science**, v.74, p.539-545, 2002.