

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

**ALTERAÇÕES CELULARES EM OÓCITOS E EMBRIÕES
DA ESPÉCIE CAPRINA INDUZIDAS PELO ESTRESSE
TÉRMICO NAS ESTAÇÕES SECA E CHUVOSA**

RICARDO DE MACÊDO CHAVES

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

**Recife-PE
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

RICARDO DE MACÊDO CHAVES

**ALTERAÇÕES CELULARES EM OÓCITOS E EMBRIÕES
DA ESPÉCIE CAPRINA INDUZIDAS PELO ESTRESSE
TÉRMICO NAS ESTAÇÕES SECA E CHUVOSA**

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

C512a Chaves, Ricardo de Macedo
Alterações celulares em oócitos e embriões da espécie caprina induzidas pelo estresse térmico nas estações seca e chuvosa / Ricardo de Macedo Chaves – 2010.

146 f. : il.

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

Referências

1. Apoptose 2. Complexos *Cumulus oophorus* 3. Folículos 4. Caspases 5. Teste de TUNEL I. Oliveira, Marcos Antônio Lemos de, orientador II. Título

CDD 636.08926

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

**ALTERAÇÕES CELULARES EM OÓCITOS E EMBRIÕES DA
ESPÉCIE CAPRINA INDUZIDAS PELO ESTRESSE TÉRMICO
NAS ESTAÇÕES SECA E CHUVOSA**

Tese de Doutorado elaborada por

RICARDO DE MACÊDO CHAVES

Aprovada pela

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marcos Antonio Lemos de Oliveira

Prof. Dr. UFRPE - Orientador

Paulo Fernandes de Lima

Prof. Dr. UFRPE - Examinador

Adauto Chiamenti

Prof. Dr. 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

À minha esposa Izabel Cristina, pelo amor, incentivo e apoio constante durante a realização desse trabalho.

A meu querido pai Moisés (in memorium) pelo exemplo de amizade, carinho e sabedoria e minha mãe Terezinha pelo amor e compreensão que sempre me transmitiram.

A meu irmão Marcelo (in memorium) pela amizade e carinho que sempre tivemos.

A meus filhos Ricardo (filhão), Gabrielle (grandona), Izabella (filhinha) e minha netinha Layane a quem tanto amo e que sempre me apoiaram.

Amo todos vocês!

DEDICO

"Qualquer destino, por mais longo e complicado que seja, vale apenas por um único momento: aquele em que o homem compreende de uma vez por todas quem é"

Jorge Luís Borges

"Existem apenas duas maneiras de ver a vida: uma é pensar que não existem milagres e a outra é que tudo é um milagre"

Albert Einstein

"Há quem diga que todas as noites são de sonhos. O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado"

William Shakespeare

Agradecimento Especial

Ao professor *Dr. Marcos Antonio Lemos de Oliveira*, pela amizade e pela oportunidade na realização desse trabalho, pela orientação que dividiu seus ricos conhecimentos em favor do meu crescimento;

Ao professor *Dr. Paulo Fernandes de Lima*, pela amizade constante, apoio científico através de seus importantes ensinamentos e sugestões durante o curso.

Minha eterna gratidão, admiração e respeito!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre está comigo me impulsionando e nunca deixando desistir.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por permitir a minha presença e aquisição de conhecimentos.

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

À Universidade Estadual do Maranhão, pela confiança no investimento desta pesquisa.

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

Aos colegas professores do Departamento de Clínica Veterinária da UEMA.

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.

A todos professores da Pós-Graduação pelos ensinamentos, paciência e colaboração em meus estudos.

Aos amigos da Pós-Graduação, Aduino, Arthur, Doralice, Elielete, Edvaldo, Expedito, Érica e Leopoldo pelo apoio, companheirismo, amizade e companhia durante o curso.

Ao amigo Cristiano pela amizade, exemplo de humildade, convivência e apoio.

Ao amigo José Monteiro pela amizade, convivência e apoio.

Ao amigo Maico Henrique pela amizade, companheirismo e convivência.

Ao amigo Marcelo Rabelo pela amizade sincera, pelo exemplo de humildade e determinação.

Ao amigo Filipe pela amizade, apoio e companheirismo.

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

À médica veterinária, Joana D'arc pela amizade e apoio na pesquisa laboratorial.

À Edna Cherias, pela colaboração, amizade e apoio na pós-graduação durante o doutorado.

Aos funcionários da UFRPE, Dona Sônia, Guiomar e Alcir, pela ajuda e o apoio durante todos os momentos.

A banca examinadora pela atenção dispensada na correção deste trabalho.

A todas as pessoas que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

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

É com grande respeito a todos que agradeço.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	vii
SUMÁRIO.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTAS DE FIGURAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Oogênese.....	4
2.2. Maturação <i>in vitro</i> de oócitos.....	6
2.2.1. Princípios fundamentais para a maturação <i>in vitro</i>	8
2.2.2. Função das células do <i>cumulus oophorus</i> na maturação.....	15
2.3. Adaptação e aclimatação animal.....	16
2.3.1. Adaptação ao ambiente.....	17
2.3.2. Aclimatação e aclimatização.....	17
2.3.3. Homeotermia e regulação da temperatura corporal.....	18
2.3.4. Mecanismos de adaptação.....	21
2.3.5. Adaptação dos ruminantes.....	24
2.4. Morte celular.....	25

2.4.1. Morte celular programada / Apoptose.....	27
2.4.2. Mecanismo de Apoptose.....	29
2.4.3. Apoptose em tecidos gonodais.....	35
2.4.4. Apoptose nas células foliculares.....	35
2.4.5. Apoptose nos oócitos.....	37
2.4.6. Embriogênese e apoptose.....	39
2.5. Estresse térmico calórico na reprodução.....	41
2.5.1. Influências do estresse térmico na reprodução.....	42
2.5.2. Efeitos do estresse calórico no eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal..	44
2.5.3. Efeitos do estresse calórico na manifestação do estro.....	47
2.5.4. Estratégias utilizadas para amenizar os efeitos do estresse térmico.....	49
2.5.5. Efeitos da temperatura elevada em oócitos.....	51
2.5.6. Estresse térmico e sobrevivência embrionária.....	55
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
4. CAPÍTULO 1.....	90
5. CAPÍTULO 2.....	109

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

DAPI - 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DEPC – Dietil pirocarbonato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

E₂ – Estradiol

ETC – Estresse térmico calórico

FAS – Fator de necrose tumoral receptor

FD – Folículo dominante

FIV – Fecundação *in vitro*

FPM – Fator promotor de maturação

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

P₄ – Progesterona

pc – Picograma

PBS – *Phosphate-Buffered Saline*

PIV – Produção *in vitro*

PV – Peso vivo

PVA – Álcool polivinílico

PVP – Polivinilpirrolidona

RNA – Ácido ribonucléico

RNA_m – Ácido ribonucléico mensageiro

rpm – Rotações por minuto

RVG – Rompimento da vesícula germinativa

SFB – Soro fetal bovino

SRD - Sem raça definida

SOF – Fluido sintético de oviduto

TALP – *Pyruvate lactate albumin tyrodes*

TCM – Meio para cultura de tecido

T I – Telófase I

T3 – Triiodotironina

T4 – Tiroxina

TUNEL – *Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End labeling*

UI – Unidade Internacional

µg – Micrograma

µm – Micromolar

µL – Microlitro

VG – Vesícula germinativa

LISTA DE TABELAS

		Página
Capítulo 1		
Tabela 1	Média e desvio padrão da qualidade de complexo <i>cumulus oophorus</i> (CCOs) recuperados não maturados da espécie caprina abatidas na região Metropolitana do Recife em relação à estação do ano.....	97
Tabela 2	Média e desvio padrão da qualidade de complexo <i>cumulus oophorus</i> (CCOs) maturados <i>in vitro</i> (MIV) da espécie caprina abatidas na região Metropolitana do Recife em relação à estação do ano.....	97
Tabela 3	Média e desvio padrão do estágio de maturação nuclear dos oócitos de fêmeas caprinas abatidas na região Metropolitana do Recife em relação à estação do ano.....	98
Capítulo 2		
Tabela 1	Média e desvio padrão de oócitos recuperados, maturados <i>in vitro</i> (MIV) e fertilizados <i>in vitro</i> (FIV) da espécie caprina abatidas nas estações seca e chuvosa na região Metropolitana do Recife-PE.....	116
Tabela 2	Média e desvio padrão de embriões CIV (D-3), CIV (D-4), mórulas (D-4) e blastocistos (D-8) da espécie caprina abatidas nas estações seca e chuvosa na região Metropolitana do Recife-PE.....	116

LISTA DE FIGURAS

		Página
Capítulo 1		
Figura 1	Efeito das estações seca e chuvosa na atividade das enzimas Caspase do grupo II na porcentagem de oócitos recuperados (REC.) e maturados <i>in vitro</i> (MIV) da espécie caprina ($P < 0,05$) pelo teste <i>F</i>	99
Figura 2	Efeito das estações do ano seca e chuvosa na fragmentação de DNA (TUNEL) na porcentagem de oócitos recuperados (REC) e maturados <i>in vitro</i> (MIV) da espécie caprina ($P < 0,05$) pelo teste <i>F</i>	99
Figura 3	Frequência respiratória (FR) de fêmeas caprinas abatidas nas estações seca e chuvosa.....	100
Figura 4	Temperatura retal (TR) de fêmeas caprinas abatidas nas estações seca e chuvosa.....	100
Capítulo 2		
Figura 1	Porcentagem de blastocistos positivos para apoptose (Fragmentação do DNA) em caprinos ($P < 0,05$) pelo teste <i>F</i> , abatidos nas estações seca e chuvosa na região Metropolitana do Recife.....	117

Título: Alterações celulares em oócitos e embriões da espécie caprina induzidas pelo estresse térmico nas estações seca e chuvosa

Autor: Ricardo de Macêdo Chaves

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Lemos de Oliveira

RESUMO

Este estudo foi dividido em duas etapas e teve como objetivo determinar as alterações celulares induzidas pelo estresse térmico na maturação nuclear *in vitro* e na indução da morte celular por apoptose em oócitos e embriões caprinos. Os ovários de cabras nas estações seca e chuvosa, foram coletados em abatedouro e transportados ao Laboratório de Biotécnicas da Reprodução da UFRPE. Na primeira etapa, os complexos *cumulus oophorus* caprinos de 12 repetições foram colhidos pela técnica de “*slicing*” dos folículos entre 2 a 6 mm de diâmetro e selecionados com base na morfologia. Divididos em Grupo-1 (recuperado) e Grupo-2 (maturados *in vitro*), 25 oócitos foram colocados por gota em meio básico de maturação (MBM). Após a coleta dos oócitos, foi determinado a qualidade dos oócitos, atividade das enzimas Caspases do grupo II com reagente PhiPhiLux-G₁D₂ e fragmentação de DNA (TUNEL). O Grupo-2, após maturação, foi determinado o estágio de maturação nuclear, enzimas Caspases e fragmentação de DNA. Nos estádios de maturação nuclear as fases de Vesícula Germinativa, Rompimento da Vesícula Germinativa, Metáfase I e II não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$). Não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) na atividade das enzimas Caspases e na fragmentação do DNA dos oócitos recuperados e maturados *in vitro*. Na segunda etapa, os complexos *cumulus oophorus* caprinos foram submetidos à 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 fertilização. A qualidade dos blastocistos foi avaliada com o corante DAPI e a determinação de blastômeros positivos para apoptose através do ensaio de TUNEL. Foi encontrada diferença significativa ($P < 0,05$) nas fases de fertilização, cultivo no D-3 e mórula. Não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) às fases de maturação, cultivo

no D-4, blastocisto e no teste de TUNEL. Com base nos dados obtidos, podemos concluir que as estações seca e chuvosa não exercem influência na maturação nuclear *in vitro*, na apoptose de oócitos e embriões e na produção *in vitro* de embriões da espécie caprina.

PALAVRAS-CHAVE: Apoptose, complexos *cumulus oophorus*, folículos, Caspases, teste de TUNEL.

Title: Cellular changes in oocytes and embryos goats induced by heat stress in the dry season and rainy season

Author: Ricardo de Macêdo Chaves

Advisor: Prof. Dr. Marcos Antonio Lemos de Oliveira

ABSTRACT

This study was divided in three stages and aimed to determine the cellular changes induced by heat stress on nuclear maturation *in vitro* and induction of cell death by apoptosis in goat oocytes and embryos. The ovaries of goats in the dry season and rainy season were collected in a slaughterhouse and transported to the Laboratory of Biotechnical Reproduction of UFRPE. The first stage, the *cumulus oophorus* complexes in goat of 12 repetitions were collected by the technique of "slicing" of the follicles from 2 to 6 mm in diameter and selected based on morphology. Divided into Group-1 (recovered) and Group-2 (*in vitro* matured), 25 oocytes per drop were placed in basic medium maturity (MBM). After collection of oocytes, it was determined the quality of oocytes, the enzyme activity of group II caspases with reagent PhiPhiLux-G1D2 and DNA fragmentation (TUNEL). Group-2, after maturation, were determined the stage of nuclear maturation, enzymes caspases and DNA fragmentation. In the stages of nuclear maturation stages of germinal vesicle, disruption of the germinal vesicle, metaphase I and II showed no significant difference ($P > 0.05$). There was no significant difference ($P > 0.05$) in the activity of enzymes and caspases in DNA fragmentation of oocytes recovered and matured *in vitro*. The second stage, the *cumulus oophorus* complexes in goat were submitted to maturation, fertilization and *in vitro*. 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), morulae (D-5) and blastocyst (D-8) after fertilization. The quality of blastocysts was assessed with the pigment DAPI and the determination of blastomeric positive for apoptosis by TUNEL assay. Significant difference ($P < 0.05$) stages of fertilization, cultivation in D-3 and morulae. No significant difference ($P > 0.05$) phases of maturation, growing on D-4, blastocyst and the TUNEL test. Based on these results, we concluded that the dry and rainy seasons will not

influence the nuclear maturation *in vitro* apoptosis of oocytes and embryos and *in vitro* production of embryos in goats.

Keywords: Apoptosis, *cumulus oophorus* complexes, follicles, Caspases, test TUNEL.

1. INTRODUÇÃO

Há mais de 2000 anos atrás o filósofo Aristóteles previu que as condições climáticas e do ambiente seriam determinantes na vida dos seres humanos e dos animais domésticos. A pertinência dessa antiga previsão torna-se evidente nos dias de hoje através do aparecimento de problemas relacionados ao aquecimento global e ao crescimento da população. Além disso, 75% da população mundial estão distribuídas fora da zona temperada, em áreas aonde a temperatura ambiente frequentemente ultrapassa os 38°C (100°F), temperatura acima da zona de conforto tanto para humanos como para a maioria dos animais. Nas regiões dos trópicos e do ártico a adaptação é difícil principalmente para o animal mais produtivo. Nestas regiões, a razão população/alimento é desfavorável para o bem estar nutricional humano, pois o aumento da população costuma ser maior do que o aumento na produção de alimentos (CAMPBELL e LASIEY, 1985).

O rebanho caprino no Brasil atinge a cifra de 9.355.220 cabeças, sendo destas 8.521.388 (91,1%) localizadas na região Nordeste do país (IBGE, 2008). Apesar de deter praticamente todo o rebanho caprino, 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.

As condições ambientais adversas encontradas na Região Nordeste do Brasil comprometem a produtividade e a eficiência reprodutiva dos animais de interesse zootécnico, resultando em perdas econômicas para região. O manejo do estresse térmico

calórico é comumente realizado pelo uso de ventiladores e aspersão de água. No entanto, essas medidas permitem apenas uma melhora parcial na eficiência reprodutiva do rebanho e torna-se inviável devido ao alto custo para propriedade (HANSEN et al., 1992).

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 caprino 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 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; 2005).

Alguns experimentos demonstraram que o embrião no início do desenvolvimento é severamente afetado pelo estresse calórico e que o mesmo adquire resistência à temperatura elevada à medida que progride no desenvolvimento (EALY et al., 1993). Recentemente um número considerável de evidências demonstra que o oócito pode ser danificado pelo estresse térmico calórico causando uma redução na capacidade de desenvolvimento oocitário (PUTNEY et al., 1989a; ROTH e HANSEN, 2004a). Em bovinos é um fator de grande impacto econômico na indústria da carne, leite e peles em regiões de clima quente do país e do mundo podendo-se admitir o mesmo aos caprinos. A diminuição drástica nas taxas de gestação (BADINGA et al., 1985; AL-KATANANI et al., 1999) e a grande incidência de morte embrionária no início da prenhez traduz a natureza do problema (DUNLAP e VINCENT, 1971; EALY et al., 1993).

Sabe-se hoje que o oócito e o embrião são os alvos principais dos efeitos deletérios induzidos pelo estresse calórico, provocando danos celulares que ativam a cascata de caspases produzindo apoptose. Não obstante à óbvia importância dos mecanismos celulares desencadeados pela temperatura elevada, pouco se sabe sobre os eventos moleculares que acionam a apoptose, bem como os mecanismos de sobrevivência celular em resposta ao estresse calórico em oócitos e embriões da espécie caprina. O conhecimento destes mecanismos possibilitará o desenvolvimento de estratégias aplicadas à sobrevivência celular frente aos vários tipos de estresses, minimizando efeitos deletérios.

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 caprina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Oogênese

Segundo Figueiredo et al. (2002) a formação dos folículos ovarianos e, conseqüentemente dos oócitos, notadamente dos ruminantes, tem início no período pré-natal onde o processo de liberação dos oócitos pelos folículos ovarianos é precedido pelos eventos da foliculogênese e oogênese.

A oogênese é o conjunto de processos envolvidos no desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais até a formação dos oócitos fecundados (RUSSI, 1983). Antes de ser incluída no folículo ovariano, a célula é precedida da evolução de dois tipos celulares sucessivos, as células germinativas primordiais (CGP) e as oogônias. As primeiras têm origem extragonadal com formação durante o período embrionário, onde após a fecundação do oócito pelo espermatozóide, ocorre à formação e evolução do zigoto até o estágio de blastocisto, o qual, constituídos pelo trofoblasto e embrioblasto. A partir do embrioblasto serão formados os tecidos embrionários ectoderma, o mesoderma e o endoderma. Do endoderma tem origem o saco vitelino e deste, as células germinativas primordiais, as quais, caracterizadas pela mobilidade e de serem altamente invasivas (HIRSFIELD, 1991).

Segundo Wassarman (1994), nos bovinos e ovinos, ainda durante a vida fetal, as células germinativas primordiais migram para o mesênquima da crista genital, ocupam a gônada indiferenciada, perdem a capacidade de mobilidade e multiplicam-se por mitose, podendo na espécie bovina, atingir dois milhões de células por indivíduo (ERICKSON, 1966). Em seguida a um marcante processo de crescimento celular e redistribuição de organelas citoplasmáticas, as células germinativas primordiais multiplicam-se de forma ativa e diferenciam-se em oogônias. Nestas, haverá sucessivas mitoses, em seguida,

ocorrerá o estágio de prófase I e, são denominadas de oócitos primários. Nos núcleos dos oócitos que se encontram na fase de meiose I, ocorrerá, sucessivamente os estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Neste último estágio, também denominado de vesícula germinativa (VG), ocorrerá à primeira parada da meiose que permanecerá pelo menos até que o animal alcance a puberdade (WASSARMAN, 1994).

No período em que o núcleo oocitário permanecer na fase de prófase I, o oócito, juntamente com as células somáticas inclusas no compartimento folicular empreenderá uma intensa fase de crescimento, caracterizada por um incremento na atividade transcripcional (síntese de RNA), acúmulo de lipídeos e absorção ativa e/ou passiva de diferentes nutrientes. Com o início da puberdade, algumas horas antes da ovulação, ocorrerão liberações pré-ovulatórias de hormônio luteinizante (LH), em decorrência, o estágio de meiose é retomado e o núcleo oocitário inicia a diacinese. Em seguida, ocorre à condensação da cromatina, tem início o processo de rompimento da VG, o desaparecimento do nucléolo compacto e do envelope nuclear e, após, sucessivamente as fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, com a expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário, o qual caracterizado por seu núcleo encontra-se na segunda divisão meiótica (TSFRIRI e KRAICER, 1982; DEKEL et al., 1988; BETTERIDGE et al., 1989; HYTTEL et al., 1989; SUN e MOOR, 1991; SUM et al., 2001; SILVA et al., 2002).

Na segunda divisão meiótica, a fase de prófase II, caracterizada por ocorrer de forma rápida e, às vezes inexistente, avança até a fase de metáfase II, culminando com a segunda parada da meiose, estando o oócito nuclear e citoplasmaticamente apto para reiniciar o processo. Para a retomada da meiose o oócito deverá ser fecundado pelo espermatozóide, então, no núcleo oocitário ocorrerá, sucessivamente, os estádios de anáfase II e telófase II, expulsão do segundo corpúsculo polar e formação do oócito haplóide

fecundado, determinando o encerramento do processo da oogênese (GONÇALVES et al., 2008; MILOVANOV e SIRARD, 1994; RUMPF et al., 1995).

2.2. Maturação *in vitro* de oócitos

A maturação *in vitro* (MIV) compreende um conjunto de eventos que ocorrem em oócitos oriundos de pequenos e médios folículos antrais, meioticamente interrompidos no estágio de prófase I ou fase de VG, cultivados em laboratório após adquirirem aptidão à fecundação, alcançam o estágio de metáfase II, com expulsão do primeiro corpúsculo polar, quando então, denominados de oócitos secundários (GONÇALVES et al., 2008).

No oócito de vacas, essa mudança têm duração média de 18 horas (GONÇALVES et al., 2008) e no de cabras, em média de 27 horas (MARTINO et al., 1994; RHO et al., 2001). Para que tal evento aconteça, o oócito deve ser competente para completar o processo de maturação nuclear (MOTLIK e KUBELKA, 1990; GALL et al., 1996). A aquisição da competência meiótica tem relação com o surgimento da cavidade antral no folículo e o tamanho do oócito, que se expande progressivamente durante o período de crescimento folicular, atingindo, em bovinos, um diâmetro de 150 μm (GRUNERT, 1989) e em caprinos 137 μm (RODRIGUEZ-GONZÁLES et al., 2002).

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 (BRACKETT et al., 1984; SIRARD e LAMBERT, 1985; SIRARD et al., 1988; LAMBERT et al., 1986; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987).

A baixa repetibilidade dos resultados iniciais da fertilização em oócitos de bovinos maturados *in vitro*, foi em virtude da não compreensão dos pesquisadores sobre o bloqueio do desenvolvimento do embrião no estágio pró-nuclear. Relatos de Iritani e Niwa (1977) mostraram taxas de 6 a 7% de formação pró-nuclear após a FIV de oócitos maturados *in vitro*. 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* 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 maturados *in vitro*.

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. Leibfried-Rutledge et al. (1986) e Parrish et al. (1986) adicionaram ao sêmen bovino e obtiveram porcentagem de 80% de formação pró-nuclear.

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

2.2.1. Princípios fundamentais para a maturação *in vitro*

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, apresentando função diferenciada daquelas localizadas na mural do folículo (GONÇALVES et al., 2008).

No oócito são produzidas substâncias 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, 1994). 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).

Existe 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 (CROZET, 1989).

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 vivo*, 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.

No início do processo de maturação oocitária, a transcrição de genes essenciais para a síntese protéica durante a maturação e o início do desenvolvimento embrionário é interrompida. Nesse período, importantes modificações ocorrem na síntese de proteína que afetam o complexo processo de maturação oocitária (GONÇALVES et al., 2002).

A maturação oocitária é alcançada em decorrência de alterações nas concentrações de proteínas e a outros fatores promotores da maturação, presentes no citoplasma (THIBAUT, 1977). A importância dessas substâncias no processo de maturação foi demonstrada por Milovanov e Sirard (1994) que, através do bloqueio da síntese de proteínas com cicloheximide em oócitos bovinos, não ocorreu o rompimento da VG e a configuração da metáfase II, evidenciando a existência da relação entre a ativação do fator intercelular promotor da fase-M (MPF) e a síntese protéica.

In vitro, utilizando-se substâncias químicas que interferem na concentração do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), (SIRARD et al., 1998) ou através de um inibidor do fator promotor de maturação (FPM), como o “roscovitine” (MERMILLOD et al., 2000; MARCHAL et al., 2001; MITALIPOV et al., 2001), os oócitos bovinos podem permanecer na meiose, no estágio de VG. A retomada da meiose dessa forma, também denominada de pré-maturação, induz a maturação citoplasmática, a competência do oócito para a maturação e para o desenvolvimento embrionário (FOULADI NASHTA et al., 1998).

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 hypoxantinas 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 (SANBUISSHO et al., 1992; 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 ácido ribonucléico (RNA) que é essencial na geração de proteínas relacionadas à maturação e ao desenvolvimento inicial do embrião (LEIBFRID-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).

O reinício da meiose ocorre mediante a ação das gonadotrofinas, liberando cálcio para atuar na dissolução do envelope nuclear (POWERS e PALEOS, 1982), elevando a concentração de ATP, provocando as reações de fosforilação (DOWNS, 1993), interrompendo a comunicação entre o oócito e as células do *cumulus* e impedindo o fluxo de substâncias inibidoras da meiose (DEKEL, 1988) com o OMI e o AMPc.

As células foliculares, mediante ação dos hormônios, podem liberar fatores que induzem os oócitos a estimular a fosfodiesterase, em consequência ocorre à redução da concentração de AMPc, a reação de proteínas quinases e a ativação do MPF, que coordena a retomada da meiose em oócitos caprinos (DE SMEDT et al., 1994) 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 aderidos a três ou mais camadas de células, dispostas de forma compacta, intactas e sem expansão, constituindo o 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 (LEIBFRID e FIRST, 1979), inviabilizando a fecundação (SHIOYA et al., 1988; YOUNIS et al., 1989).

Em bovinos, várias classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar oócitos de maior viabilidade. Leibfrid e First (1979) propõem para a espécie, uma classificação com escala de 1 a 4, considerando as características do *cumulus* e do *ooplasma*. Em caprinos, nota-se que o emprego de oócitos na maturação *in vitro* não obedece a critérios rígidos, variando desde aqueles com *cumulus* compacto, até os que apresentam apenas uma camada de célula do *cumulus* (MARTINO et al., 1994; IZQUIERDO et al., 1999).

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* pela maior disponibilidade no ovário e pela dificuldade de identificar oócitos capacitados antes da fecundação (GONÇALVES et al., 2008).

Nos caprinos, de acordo com De Smedt et al. (1994) e Gall et al. (1996), os oócitos competentes para a maturação estão dentro de folículos com diâmetro superior a 3 mm. Assim, os oócitos necessitam alcançar um diâmetro mínimo para reiniciar a meiose, que em bovinos é de 110 μm (HYTTEL et al., 1997) e caprinos 119 μm para Ariyaratna e Gunawardana (1997) e de 125 μm para Rodriguez-González et al. (2002).

2.2.2. Função das células do *cumulus oophorus* na maturação

As células do *cumulus oophorus* apresentam-se em policamadas compactas e, por ocasião da maturação, sob o estímulo dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) entram em processo de expansão, interrompendo as comunicações com o oócito (HYTTEL, 1987; 1988; SZOLLOSI, 1991). Essas células, assim como as 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).

In vitro, a expansão das células do *cumulus* 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).

As células íntegras do *cumulus* exercem maior influência no processo de maturação *in vitro* do que no grau de granulação citoplasmática, na atividade ovariana ou 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).

Segundo Vassena et al. (2003), a qualidade do oócito é de suma importância nas biotecnologias de reprodução assistida. A presença das células do *cumulus* é benéfica 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 (≤ 4 mm), possuíam qualidade superior aos de maior diâmetro (> 4 mm).

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.

2.3. Adaptação e aclimação animal

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).

2.3.1. Adaptação ao ambiente

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).

2.3.2. Aclimação e aclimatização

A aclimação refere-se a mudanças adaptativas (normalmente produzidas em câmaras climáticas) em resposta a uma única variável climática. A aclimatização é os ajustamentos fisiológicos adaptativos duradouros, que resultam em aumento de tolerância a contínuas ou repetitivas exposições a vários estressores climáticos (normalmente produzidos sob condições de campo), (SILVA, 2000).

Segundo Silva (2000) para melhor compreensão da adaptação e aclimatização 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.

2.3.3. Homeotermia e regulação da temperatura corporal

Fatores ambientais externos e o microclima 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).

O Brasil apresenta enorme área territorial e clima diversificado entre as regiões. Em grande parte do país verifica-se temperatura do ar elevada durante todo o ano associada à umidade relativa do ar também alta. Os principais animais de produção de carne, leite, lã, pele são homeotérmicos (SILVA, 2000).

Curtis (1983) e Nâãs (1989) observaram que os animais homeotérmicos mantêm a temperatura corporal dentro de certos limites relativamente estreitos, mesmo que a temperatura ambiente flutue e que sua atividade varie intensamente. Para os animais homeotérmicos manterem a temperatura corporal relativamente constante, eles necessitam, através de variações fisiológicas, comportamentais e metabólicas, produzirem calor (para aumentar a temperatura corporal quando a temperatura diminui) ou perderem calor para o meio (diminuir a temperatura corporal no estresse calórico) (CURTIS, 1983).

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 onde 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 ambiental encontra-se abaixo da temperatura de conforto, o animal precisa produzir calor corporal (termogênese), (NÂÃS, 1989). Já, quando a temperatura ambiente 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 e/ou 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 sudorese (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 emissividade é a razão entre a densidade de radiação de um corpo cinza e a de um corpo negro, para as mesmas condições determinantes do fluxo. Por exemplo: emissividade igual a 0,5 significa que ele somente emite metade da radiação que seria emitida por um corpo negro, em condições similares. Em climas tropicais, a temperatura do ar encontra-se frequentemente próxima da corporal ou a excede; além disso, a temperatura radiante média

do ambiente tende a ser muito mais elevada que a atmosférica. Conseqüentemente, a termólise por convecção e radiação é dificultada ou inibida. Em adição, se a região for também úmida, a perda de calor por evaporação será prejudicada, proporcionando um elevado estresse térmico calórico (SILVA, 2000).

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

2.3.4. Mecanismos de adaptação

A superfície cutânea, constituída pela epiderme e seus anexos (pêlos, lã, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas nos mamíferos; penas e penugem nas aves), representa a mais extensa linha de contato entre o organismo e o ambiente (CURTIS, 1983).

Os seguintes aspectos estão envolvidos sobre o tipo de pelame e adaptação: (1) isolamento térmico, efeito do pelame na termólise por perda de calor sensível (condução, convecção e radiação); (2) eficiência da termólise evaporativa, efeito do pelame sobre a transferência de calor latente de evaporação da epiderme para a atmosfera e (3) atributos termorreguladores correlacionados, características do pelame que são associados a mecanismos termorreguladores, como por exemplo dimensões e nível de atividade das glândulas sudoríparas (SILVA, 2000).

Segundo Curtis (1983), em relação aos pêlos dos animais, as propriedades que irão influenciar as trocas térmicas são: o comprimento, espessura da capa, ângulo de inclinação, diâmetro, densidade de massa, densidade numérica e pigmentação. O calor conduzido através das fibras é maior do que o conduzido pelo ar, assim, quanto maior o número de

fibras por unidade de área e quanto mais grossas forem essas fibras, tanto maior será a quantidade de energia conduzida através da capa. Por outro lado, fibras mais finas, compridas e menos numerosas, formando uma trama mais fechada, resultam em passagem mais limitada de calor devido à maior resistência térmica das fibras. A posição inclinada das fibras resulta em contato mais frequente entre elas, reduzindo o volume de ar no interior da capa e sua espessura, aumentando a condução térmica. Finalmente, a resistência térmica pode ser aumentada pela presença de fibras finas e lanosas entremeadas com as mais grossas e compridas (SILVA, 2000).

A pigmentação da capa externa do animal também influencia as trocas térmicas entre animais e o meio ambiente. A pigmentação da epiderme 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).

Segundo Nâãs (1989) as raças bovinas tropicais apresentam sempre epiderme mais pigmentada que as de origem européia. Mas a diferença não está no número de melanócitos por unidade de área, mas na atividade destes. Os animais com pigmentação da epiderme branca são mais sujeitos a sofrer os efeitos da radiação ultravioleta. Embora uma capa de coloração clara seja mais reflectante, para que essa vantagem seja efetiva, os elementos da capa (pêlos) devem ser densamente distribuídos e posicionados em ângulo baixo sobre a epiderme, de modo a minimizar a transmissão de ondas curtas através da capa. E a epiderme deve ser pigmentada, o que não é imperativo se a capa for de cor escura (NÂÃS, 1989).

Em um ambiente tropical, o mecanismo físico de termólise considerado mais eficaz é o evaporativo, por não depender do diferencial de temperatura entre o organismo e a atmosfera. Porém, em ambientes muito úmidos, a evaporação pode tornar-se muito lenta ou nula. A perda de calor latente evaporativo, através das glândulas sudoríparas, é um dos mecanismos de adaptação ao estresse calórico em bovinos, ovinos, equinos, caprinos e bubalinos, enquanto que as aves não possuem glândulas sudoríparas e nos suínos são queratinizadas, essa forma de perda de calor corporal para o meio ambiente é praticamente nula (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 (NÂÃS, 1989).

Para avaliar a adaptação dos animais a um determinado ambiente, deve-se considerar os seguintes fatores: (1) o ambiente como temperatura do ar, temperatura radiante, radiação solar, umidade relativa do ar, vento e pressão atmosférica; (2) a capa

externa como espessura, estrutura, isolamento térmico, penetração do vento, ventilação, permeabilidade do vapor, transmissividade, emissividade, absorvidade e refletividade; (3) as características corporais como forma corporal, tamanho e movimentos, área de superfície radiante, área exposta à radiação solar direta, emissividade da epiderme, absorvidade da epiderme e (4) as respostas fisiológicas como temperatura (epiderme, retal), taxa de sudorese, trocas respiratórias, produção, taxa de crescimento e desenvolvimento, níveis hormonais (T3, T4, cortisol), (SILVA, 2000).

2.3.5. Adaptação dos ruminantes

A energia térmica presente no organismo de animais homeotérmicos, como os ruminantes, é sua maior parte gerada pelos processos metabólicos, e o resto é procedente do meio ambiente, por meio da radiação (COSTA, 1989).

As características morfológicas e a cor do pelame em bovinos são fatores importantes que afetam diretamente as trocas térmicas de calor sensível (convecção cutânea e radiação) e as perdas de calor latente (evaporação cutânea). Em geral é aceito que o pelame escuro apresenta maior absorção e menor reflexão da radiação térmica, resultando em maior estresse térmico para os animais. Entretanto, os pelames claros apresentam maior penetração da radiação solar que os escuros (NÃÃS, 1989).

Segundo Nããs (1989) a quantidade de radiação transmitida através da capa de pelame depende não somente da cor, mas em alto grau de sua estrutura física, principalmente do número de pêlos por unidade de área. Ovinos e caprinos com pelames mais espessos e densos apresentam maior dificuldade para eliminar calor latente via evaporação cutânea, sendo mais adaptados ao clima frio.

A epiderme pigmentada, apesar de oferecer uma proteção contra a radiação ultravioleta, absorve maior quantidade de radiação térmica. Então, sobre essa epiderme, os pêlos devem ser mais curtos, grossos e menos numerosos para oferecer menor resistência a termólise por convecção e evaporação cutânea. Entretanto, em epiderme despigmentada, a densidade de pêlos e seu comprimento devem ser maiores, para servir de barreira à penetração dos raios solares até a epiderme. Segundo Silva (2000), os bovinos, caprinos e ovinos mais adaptados para serem criados a campo aberto em regiões tropicais devem apresentar um pelame (conjunto de pêlos) de cor clara com pêlos curtos, grossos, medulados e bem assentados sobre a epiderme bem pigmentada. Estas características físicas do pelame favorecem a convecção e a evaporação cutânea, ao passo que altos níveis de melanina na epiderme protegem contra a radiação (SILVA, 2000).

2.4. Morte celular

A morte celular é definida como a perda irreversível da estrutura e das funções vitais. Ela pode ocorrer por dois processos morfológicos distintos: necrose ou anose e apoptose. Sabe-se atualmente que os dois fenômenos podem contribuir para a morte celular em CCOs e embriões, no entanto a morte celular por apoptose aparece com maior frequência, principalmente nos blastômeros embrionários (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a). A opção da célula por uma dessas formas de morte pode ser influenciada pelo seu estado energético (reserva de ATP). Como processo ativo, a apoptose requer reservas de ATP (pelo menos nas fases iniciais), ao passo que a necrose se instala na ausência de ATP (WYLLIE et al., 1980).

A necrose se caracteriza pela perda da integridade da membrana plasmática. Com a perda de integridade ocorre à liberação dos constituintes intracelular para o meio

extracelular, o que estimula a resposta inflamatória e amplia a lesão tecidual (BETTS e KING, 2001; TRUMPT et al., 1965; WYLLIE et al., 1980).

A apoptose, conhecida também como a morte celular programada (MCP) da célula, é um processo ativo caracterizado pela autodigestão controlada dos constituintes celulares, devido à ativação de proteases intracelulares. A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular sem que haja extravasamento do conteúdo celular interno para o meio externo e em consequência estimule uma resposta inflamatória ampliando a lesão até às células vizinhas (BETTS e KING, 2001; MATWEE et al., 2000; PAROLIN e REASON, 2001).

Este processo de morte celular possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e é importante em certas condições patológicas, incluindo o câncer. Após o reconhecimento do processo apoptótico como um mecanismo celular fundamental, a biologia da apoptose continuou a ser investigada avaliando-se as alterações morfológicas e bioquímicas características (WYLLIE, 1985), a natureza das vias intracelulares (HALE et al., 1996), a complexa biologia molecular de genes e elementos efetores (BAKER e REDDY, 1996; FRASER e EVAN, 1996), a sua relação no desenvolvimento embrionário (BRILL et al., 1999), o seu papel na homeostase celular e o seu envolvimento na patogênese de várias doenças (THOMPSON, 1995), tais como doenças auto imunes, infecções parasitárias, doenças neurodegenerativas, lesões isquêmicas e o câncer (MARTIN e GREEN, 1995; GREEN e MARTIN, 1995; LEE e BERNSTEIN, 1995; RAFFRAY e COHEN, 1997; JOHNSTONE et al., 2002; MAKIN, 2002; REED, 2003). Com o surgimento de novos conhecimentos na biologia do câncer e, conseqüentemente, na indução química da apoptose, os tratamentos tornam-se mais eficazes, pois terapias

utilizando drogas anti-tumorais convencionais são pouco seletivas e efetivas (HENGARTNER, 2000; HICKMAN, 1996).

2.4.1. Morte celular programada/Apoptose

Na metade do século XX, muitas observações indicam que a morte celular tinha um papel importante durante os processos fisiológicos dos organismos multicelulares, principalmente na embriogênese e nas metamorfoses (GEWIES, 2003; LOCKSHIN e ZACHERI, 2001). O termo MCP foi introduzido no mundo científico a partir de 1964, propondo que a morte celular durante o desenvolvimento não é de natureza acidental, mas uma sequência de etapas controladas que conduzem a autodestruição (LOCKSHIN e WILLIAMS, 1964).

A palavra apoptose (do grego *apo* = separação, *ptôsis* = queda), adotado pela primeira vez na década de 70, designa a forma fisiológica de morte celular (KERR et al., 1972; TILLY, 1996). Este termo foi designado em analogia ao fenômeno natural das folhas caírem das árvores ou das pétalas caírem das flores. Há controvérsias na utilização da apoptose e de MCP como sinônimos ou termos permutáveis (MAJNO e JORIS, 1995). O termo apoptose define os mecanismos e processos envolvidos antes, durante e depois da morte celular: (1) indução da morte celular – estímulos externos; (2) morte celular propriamente dita – desencadeamento de mecanismos morfológicos e bioquímicos; e (3) absorção dos corpos apoptóticos por células vizinhas. Já o uso da terminologia MCP envolve apenas os mecanismos morfológicos e bioquímicos específicos que a célula desencadeia para induzir a sua morte (LOCKSHIN e WILLIAMS, 1964; TILLY, 1996; SAUNDERS, 1966).

O processo de apoptose ocorre pela transcrição de genes e ativação de enzimas específicas que desencadeiam um processo de autodigestão controlada por proteases endógenas. Esta forma de morte celular ocorre com intuito de remover células lesadas, infectadas, senescentes ou que simplesmente perderam a função para o organismo, sem alteração do microambiente celular e livre de inflamação (TILLY, 1996).

A apoptose é um processo de morte ativa das células integras de organismos multicelulares e pode ser comparada metaforicamente a um “suicídio celular”. As células que iniciam esse processo diminuem o volume citoplasmático mantendo suas organelas intactas. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma vesículas, denominadas corpúsculos apoptóticos, que contem fragmentos do núcleo e algumas organelas. Esses corpúsculos apoptóticos são rapidamente reconhecidos e englobados por fagócitos e/ou células adjacentes, onde são degradados e reciclados (BETTS e KING, 2001; KERR et al., 1994; MATWEE et al., 2000).

Em células indenes, a distribuição de fosfatidilserina (PS) se faz primariamente na porção interna da bicamada lipídica da membrana celular. Durante o processo da apoptose, esse lipídio se expõe na porção externa da membrana. O novo posicionamento da PS serve como sinalizador para que as células fagocitárias das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de apoptose (FADOK et al., 1992; REUTELINGSPERGER e HEERDE, 1997). Martin et al. (1995), constataram que a exteriorização da PS em algumas variedades de células murinas e humanas é um evento adiantado e difuso no processo de apoptose e que outros eventos do processo de MCP antecedem a translocação da PS, um fosfolipídio da membrana.

As células apoptóticas podem ser reconhecidas por mudanças morfológicas estereotípicas. No início, o núcleo torna-se picnótico e a cromatina vai se condensando nas

porções adjacentes à membrana nuclear (microscopia eletrônica). Finalmente, o núcleo entra em colapso e a cromatina se fragmenta. O aspecto bioquímico mais associado com apoptose é a quebra do DNA cromossômico catalisada por endoenzimas Ca^+/Mg^+ dependentes (WYLLIE et al., 1980; KERR et al., 1994). Essa quebra do DNA nuclear ocorre em consequência aos eventos moleculares e bioquímicos que resultam na ativação de enzimas proteolíticas, que por sua vez, ativam as DNAses mediadoras da fragmentação internucleossomal do DNA, bem como a lise de substratos específicos de proteínas que determinam a integridade e a forma do citoplasma (SARASTE e PULKKI, 2000). Estas DNAses endógenas cortam as regiões internucleossomais em fragmentos de 180 à 200 pares de bases (pb) expondo a extremidade 3' da fita de DNA (ALNEMRI e LITWACK, 1990; DIDENKO e HORNSBY, 1996; WYLLIE et al., 1980).

2.4.2. Mecanismo de Apoptose

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 caspases (CRYNS e YUAN, 1998; VAN LOO et al., 2002).

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_L, BCL-W, MVL-1) e agonistas da morte (BAX, BKA, BAD, BID, BIK, BCL-X_S) 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 MCP. 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 Ca^{2+} citosólico (SMAILI et al., 2003). Não se sabe se uma elevação de 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 Ca^{2+} entre células pode indicar que os aumentos de 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).

O nome caspase originou-se de duas características estruturais das proteases: o “c” é uma referência a cisteíno-protease e o “aspase” refere-se à habilidade da molécula clivar logo após o ácido aspártico, o que confere a característica catalítica dessa família de proteases. Com isso foi possível a identificação de 7 tipos de caspases nas drosófilas e 14 tipos diferentes nos mamíferos, sendo que a caspase-11 e caspase-14 foram identificadas

apenas nos ratos (DENAULT e SALVESEN, 2002). A primeira enzima dessa família descrita em mamíferos foi a ICE (*interleukin-1 β converting enzyme*), hoje caspase-1. A sua identificação foi possível por uma de suas funções: ativar a interleucina-1 β , proteína importante no sistema imune, mas depois ela atraiu atenção pelo seu papel na apoptose (DENAULT e SALVESEN, 2002).

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).

Um dos mecanismos pelos quais a apoptose pode ser deflagrada é por meio dos receptores da morte presentes na superfície celular, que são ativados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. 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), (GREN e EVAN, 2002; 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 caspase 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).

2.4.3. Apoptose em tecidos gonodais

O tempo de via funcional das gônadas femininas, na maioria das espécies, incluindo a caprina, é inversamente proporcional à taxa de depleção dos oócitos inclusos nos folículos ovarianos. Esta perda contínua de oócitos, que ocorre durante a vida fértil das fêmeas, parece ser orientada por um programa genético de morte celular composto por mecanismos e vias altamente conservadas entre as espécies (WYLLIE, 1995; TILLY, 1996).

Tilly (1996), propôs o papel fundamental da apoptose e três processos básicos relacionados ao desenvolvimento ovariano e sua ciclicidade: (1) desgaste perinatal das oogônias e dos oócitos, (2) atresia folicular e (3) luteólise.

O início do processo de apoptose, na maioria das linhagens de células ovarianas, provavelmente depende de estímulos célula específico (sinais hormonais: ausência ou presença) que ativa uma cascata intracelular de eventos. Muitos dos estudos demonstram que os efetores nucleares e citoplasmáticos das vias apoptóticas ovarianas vêm de genes reguladores da apoptose não específicos de tecidos reprodutivos, estando presentes na maioria das células dos mamíferos (KORSMEYER, 1995; WYLLIE, 1995; TILLY, 1996).

2.4.4. Apoptose nas células foliculares

Os CCOs são controlados por vários mecanismos apoptóticos (TILLY, 1996). Atualmente, vem sendo estudadas as possibilidades de células apoptóticas do *cumulus*, influenciarem a maturação nuclear, citoplasmática e o desenvolvimento durante a pré-

implantação do embrião (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2000a). Em trabalho realizado com fêmeas de camundongo idosas, foi demonstrado um incremento apoptótico em oócitos maturados com a presença do *cumulus* em relação aos oócitos maturados sem as células do *cumulus* (CC) (desnudos), evidenciando a possibilidade de indução de apoptose pelas CC de camundongo (PERES e TILLY, 1997). Em bovinos, há poucos relatos descritos sobre a relação dos mecanismos de MCP entre CC e oócitos. Um estudo em bovinos demonstrou a ocorrência da apoptose em células da granulosa (CG) e células da teca (CT), em folículos antrais em atresia, no entanto, contrariamente ao encontrado em camundongos, não foi observado apoptose nas CC (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2000b).

A presença de alterações apoptóticas encontradas nos compartimentos foliculares (CT e CG mural, CG e CC) são altamente variáveis, mesmo em folículos morfológicamente semelhantes, este podem apresentar grande variação nos níveis de apoptose de suas células. A ocorrência de fragmentação apoptótica do DNA em CT e CG murais não estão correlacionadas com a morfologia dos CCOs ou a morfologia do próprio folículo, já o aparecimento de fragmentação das CG e das CC está relacionada com a morfologia dos CCOs (ZEUNER et al., 2003).

Trabalhos recentes enfocam o papel crucial das células foliculares (CT e CG murais) em sinalizar a apoptose no folículo. Porter et al. (2001), constataram que a presença da proteína FAS do sistema FAS-ligante/FAS-receptor em CG e CT dependia do estágio folicular. A CT podem secretar sinais indutores de apoptose sem exteriorizar em sua superfície de membrana moléculas receptoras indutoras de apoptose, evitando assim sua própria apoptose. Estudos em cortes ovarianos de ratos revelaram uma fragmentação do DNA mais pronunciada em CG comparando as CT de folículos atrésicos (KIM et al.,

1998). Yang e Rajamahendran (2000a) encontraram em folículos atrésicos maior fragmentação nas CC do que nas CG murais.

Estudos em folículos de diferentes tamanhos demonstraram que em folículos pequenos, a relação BAX e BCL-2 foi similar, já os folículos médios e grandes apresentaram níveis mais elevados de proteína BAX. Estes dados sugerem que folículos de menor tamanho tendem a serem mais “saudáveis” e que boa parte dos folículos grandes podem estar submetido ao início do processo de degeneração ou ainda que existam mecanismos diferentes de apoptose (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2000a).

2.4.5. Apoptose nos oócitos

Durante a vida reprodutiva da fêmea, a maioria dos folículos ovarianos torna-se atrésico 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 (suínos: 8-10h; bovinos: 20-24h; caprinos: 12-18h; humanos: 6-24h), 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 (LEIBFRIED e FIRST, 1979; LONERGAN e GORDON, 1992; MADISON et al., 1992; BRACKETT e ZUELKE, 1993). 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).

Um 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).

2.4.6. Embriogênese e apoptose

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 (TELFORD et al., 1990). Neste sentido, espera-se que a qualidade dos CCOs tenha efeito sobre o potencial de escapar do bloqueio embrionário.

Nas espécies mamíferas, 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). As características apoptóticas, incluindo fragmentação do DNA nuclear, são raramente observadas antes da fase de compactação celular, já na fase de blastocisto, a presença de apoptose é frequente em mamíferos como humanos (HARDY et al., 2001),

camundongos (BRISON e SCHULTZ, 1997) e bovinos (MATWEE et al., 2000). Durante o desenvolvimento do embrião, muitas das células embrionárias que se encontram em processo de apoptose já cumpriram a sua função e precisam ser excluídas ou substituídas por células da mesma linhagem ou diferentes (SANDERS et al., 1997). Embriões de camundongos coletados no estágio de blastocisto desenvolveram-se normalmente mesmo apresentando boa parte de suas células em apoptose, reforçando a idéia de que o processo de MCP é importante para manutenção do desenvolvimento desses embriões (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., 1998). 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).

Em embriões de camundongo e humanos, cerca de 15 a 50% das células morrem durante o período de pré-implantação por mecanismos ainda pouco elucidados. A sobrevivência dos embriões no período de pré-implantação depende da avaliação de

parâmetros como a taxa de desenvolvimento e grau de fragmentação nuclear. Um rápido crescimento e um baixo grau de fragmentação nuclear proporcionam maiores chances de sobrevivência embrionária (WARNER et al., 1998).

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). Yang et al. (1998), com o objetivo de elucidar as ações do OR, determinaram a reação existente entre a concentração de H_2O_2 no embrião e as modificações morfológicas em suas células, concluindo que existe uma relação direta entre o aumento da concentração de H_2O_2 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 (YANG et al., 1998).

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., 1998).

2.5. Estresse térmico calórico na reprodução

Os processos de maturação do oócito, fertilização e desenvolvimento do embrião podem ser interrompidos por alterações no microambiente do trato reprodutivo. Este fenômeno vem sendo caracterizado especialmente durante o estresse térmico (AL-KATANAN1 et al., 2002). Devido ao intenso metabolismo associado com a lactação e dietas ricas em calorias as vacas leiteiras são particularmente sensíveis a temperaturas elevadas (BERMAN et al., 1985) que podem

alterar a foliculogênese (WOLFENSON et al., 2000), comprometer a função do oócito (ZERON et al., 2001; AL-KATANANI et al., 2002) e interromper o desenvolvimento embrionário (PUTNEY et al., 1988; EALY et al., 2000). Tendo ainda como consequência diminuição na detecção do estro, redução na taxa de concepção e aumento da perda embrionária, mesmo em locais onde a temperatura se mantém uniforme. Em vacas Holandesas confinadas em *Free stall* a taxa de gestação caiu de 71% durante o inverno para 45% durante o verão, o que representa uma perda considerável para a indústria de leite e derivados (PIRES et al., 2002).

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 (BARINGA et al., 1993; 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). 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).

2.5.1. Influências do estresse térmico na reprodução

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.,

1998ab). 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 (DUTT, 1963; WOLFENSON e BLUM, 1988; EALY et al., 1993; ROTH e HANSEN, 2004a; 2005).

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; ROTH e HANSEN, 2004a; 2005).

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

Balazs (2004) em um estudo realizado em Petrolina, região semiárida do estado de Pernambuco demonstrou que vacas da raça Holandesa-Friesian após o parto apresentaram

problemas reprodutivos, tais como disordem no ciclo estral, infertilidade e baixos resultados na produção de embriões. No ano seguinte do mesmo estudo, o autor observou que os mesmos animais quando superovulados não demonstraram nenhuma diferença em relação ao grupo controle quando analisados em termos de número de embriões e qualidade dos embriões produzidos. Entretanto, durante um atípico período, em que as temperaturas alcançaram 6°C a mais do que a média observada no verão dos prévios 30 anos, a sobrevivência embrionária apresentou um decréscimo de $59,2 \pm 37,4\%$ versus $38,2 \pm 38,5\%$, demonstrando que elevadas temperaturas diminuem a sobrevivência embrionária. A partir deste estudo pode-se concluir que vacas doadoras apresentam uma mudança na produção de embrião durante o período de aclimatização à região semi-árida e que os animais necessitam de aproximadamente 1,5 ano para uma completa adaptação (BALAZS, 2004).

2.5.2. Efeitos do estresse calórico no eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal

Visto que a atividade do ovário é regulada pelo hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), liberado pelo hipotálamo, e pelas gonadotrofinas, hormônio FSH e hormônio LH, liberadas pela glândula pituitária anterior (hipófise), muitos autores têm estudado os efeitos do estresse térmico na secreção destes hormônios (HAFEZ, 1994).

Altas temperaturas ambientais podem diminuir a concentração de LH no plasma, que é necessário para o completo desenvolvimento do folículo dominante. Os folículos dominantes desenvolvidos em um ambiente com baixo nível de LH possivelmente terão seu desenvolvimento final e sua diferenciação afetados negativamente (GUZELOGLU et al., (2001). Existem discrepâncias na literatura a respeito da secreção hormonal durante um estresse térmico agudo. Concentrações de estradiol (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 afetados pelo calor (BADINGA et al., 1993).

Realmente, o ETC parece ter um efeito de retardar as funções ovarianas, caracterizado por alterações na genese e na dinâmica folicular, alterando as concentrações de FSH (BADINGA et al., 1993). Guzeloglu et al. (2001) demonstraram que os folículos ovarianos são suscetíveis ao ETC. 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 gonadotrofina e subsequente desenvolvimento do corpo lúteo (CL) comprometendo o 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).

Este estresse também inibe o desenvolvimento folicular através da diminuição no número de receptores para o FSH nas células da granulosa (CG), resultando na diminuição da atividade do estrogênio nos folículos (SHIMIZU et al., 2005). O ETC é responsável ainda pela supressão na atividade da aromatase nestas células, resultando em uma baixa capacidade de produção de E_2 pelos folículos (WOLFESON et al., 1997; SHIMIZU et al., 2005). Essa redução na aromatase tem como consequências um aumento nos níveis de prolactina e glicocorticóides (BADINGA et al., 1993; SHIMIZU et al., 2005). Através deste estudo os autores sugerem como potencial terapia para suprimir os efeitos do estresse térmico, intervenções na expressão dos receptores para o FSH, como um substituto às terapias que utilizam estrogênio (SHIMIZU et al., 2005).

Os folículos que estão se desenvolvendo nos ovários das vacas com 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., 1998ab; ROTH et al., 2000).

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

A influência ou não do 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 CL. De outro modo, alterações na taxa do metabolismo associadas ao ETC podem afetar o metabolismo da progesterona (VASCONCELOS, 2003). Já 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.

2.5.3. Efeitos do estresse calórico na manifestação do estro

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 altera o padrão de desenvolvimento folicular em bovinos (ROTH et al., 2000) e diminui o tamanho do folículo dominante da primeira e segunda ondas foliculares do ciclo estral (BADINGA et al., 1993; WILSON et al., 1998ab). Além disso, o ETC 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 gemelares ocorridos em determinados períodos do ano em vacas de alta produção leiteira (RYAN e BOLAND, 1991; SARTORI et al., 2000).

O ETC durante os meses quentes do ano resulta em grande diminuição nas taxas de concepção em bovinos. Na criação de bovinos leiteiros no Estado da Flórida, por exemplo, observa-se uma redução nas taxas de concepção, variando de 40-50% durante o inverno para menos de 10% durante o verão (BADINGA et al., 1985), representando uma perda considerável para a indústria de leite do estado. Estimativas baseadas em extrapolação dos dados da USDA (BADINGA et al., 1985) indicam que a diminuição na média do intervalo entre partos de 14,75 meses para 13,75 meses resultaria em uma economia anual de \$ 7 milhões de dólares para o Estado da Flórida.

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 ETC. Um aumento nos níveis de P4 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.

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

Não há dúvidas de que o ETC compromete o desempenho sexual e as funções reprodutivas, caracterizando um quadro de redução da libido, alterações hormonais e dificuldade de ovular (JU et al., 2005). A maioria dos componentes do sistema reprodutivo são susceptíveis ao estresse térmico. Entre os quais incluem-se oócitos, células da teca e da granulosa, embrião durante o período de pré-implantação, CL, endométrio uterino e hipófise anterior. Estudos nos efeitos do ETC têm mostrados que as vacas necessitam ser resfriadas durante todo o verão, da forma mais eficiente possível, na esperança de se alcançarem melhores taxas de fertilidade. Atualmente, essas taxas se mantêm baixas durante o verão e os tratamentos hormonais são limitados (ROTH e HANSEN, 2005; JU et al., 2005).

2.5.4. Estratégias utilizadas para amenizar os efeitos do estresse térmico

Tratamentos hormonais também estão sendo implementados como tentativa de amenizar os efeitos do ETC em vacas em lactação. Aplicações de bST e FSH apresentam-se como potenciais alternativas para a melhoria da fertilidade. Uma simples injeção de bST em um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo aumenta as taxas de prenhez em vacas que foram submetidas ao ETC (THATCHER et al., 2001). Uma melhoria na qualidade dos oócitos foi reportada por Kuehner et al. (1993) e Gong et al. (1996) em vacas tratadas com bST. Semelhantes resultados foram obtidos quando FSH era aplicado a vacas submetidas a protocolos de punção folicular, apresentando ainda uma melhora na qualidade dos embriões transferíveis (GOODHAND et al., 2000).

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

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

Transferência de embrião e produção de embrião *in vitro* também são técnicas que podem ser utilizadas para eliminar os efeitos deletérios do estresse térmico no oócito. Visto que estresse térmico reduz a viabilidade do embrião quando este é exposto no dia 1, porém não no dia 3, 5 e 7 (EALY et al., 1993). Embriões de melhor qualidade podem estar sendo transferidos para receptoras adaptadas as condições climáticas da região.

Um dos efeitos negativos descritos a respeito do ETC são as baixas taxas de prenhez, devido não só as perdas embrionárias, mas à dificuldade em si na detecção do cio, levando a um número reduzido de animais inseminados artificialmente. Alguns equipamentos mais modernos, como o sistema Heatwatch, e podômetros podem aumentar a detecção do estro e contribuir para aumentar o número de animais inseminados. Em outros países, como na Itália, alguns produtores de leite estão usando touros em monta natural durante o verão para melhorar os índices de fertilidade. No entanto o benefício do aumento na detecção do cio é paliativo, uma vez que pode ocorrer deterioração na fertilidade dos touros provocados pelo calor (ARMSTRONG, 1994).

Muitas estratégias para diminuir o calor nos sistemas de criação de vacas leiteiras têm sido utilizadas. Produtores investem em sistemas de resfriamento como ventiladores, nebulizadores e telas de sombreamento, mas sem muito sucesso no que concerne à uma melhora na reprodução (BERMAN et al, 1985).

Vários outros artifícios têm sido testados, como o uso do sistema de ar condicionado, entre outros durante o verão (HANSEN, 1997). Igono et al. (1987) relataram que vacas submetidas a sistemas de resfriamento compostos de ventiladores e nebulizadores produziram em média 2kgs de leite a mais por dia em relação aos animais que se encontravam apenas à sombra. Mesmo assim, o uso destes equipamentos pode

ajudar a melhorar os níveis de fertilidade dos animais embora não seja restabelecida totalmente, quando comparado com os meses de inverno (ARMSTRONG, 1994).

2.5.5. Efeitos da temperatura elevada em oócitos

A exposição de vacas leiteiras ao estresse térmico durante o verão reduz os índices de concepção desde o verão até o início do outono (BARINGA et al., 1985). Uma das consequências do estresse térmico materno é a redução na competência oocitária (WOLFENSON et al, 2000), a qual só é recuperada dois a três ciclos estrais após o final do verão (ROTH et al., 2001), indicando que o estresse térmico pode danificar o estoque de folículos e oócitos que iniciaram seu crescimento ainda no período submetido ao estresse (ZERON et al, 2001).

A susceptibilidade de oócitos bovinos à temperatura elevada pode ser constatada durante a fase de VG como durante o período de maturação oocitária. Quando oócitos na fase de VG foram colhidos de vacas Holandesas expostas ao estresse térmico e submetidos à FIV, houve redução no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI et al., 2002). O estresse térmico entre o estro e a inseminação artificial (IA) de novilhas (período de maturação oocitária) aumentou a proporção de embriões com desenvolvimento retardado (PUTNEY et al., 1989a).

Estudos *in vitro* demonstraram a susceptibilidade oocitária aos efeitos diretos da temperatura elevada. O estresse térmico durante a maturação *in vitro* reduziu a maturação nuclear, a fecundação (ROTH e HANSEN, 2005) e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (EDWARDS e HANSEN, 1997; 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 de MIV (0-12h) 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 capacidade de desenvolvimento do oócito (PUTNEY et al., 1989a; ROTH e HANSEN, 2004). O choque térmico pode danificar oócitos antes da maturação (estádio de VG), (PAYTON et al., 2004), durante a maturação (ROTH e HANSEN, 2004) 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 (PAYTON et al., 2004) e durante este tempo o animal exposto ao ETC pode sofrer oscilações de temperatura corporal acima de 41°C (TURNER, 1982; 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 é possível que esta forma de morte celular seja induzida em oócitos expostos às condições de estresse (MORITA e TILLY, 1999; TILLY, 2001).

A apoptose é um 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 (JACOBSON et al., 1997; 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 (IKEDA et al., 2003; KOLLE et al., 2003) e embriões bovinos (BYRNE et al., 1999; MATWEE et al., 2000; NEUBER et al., 2000; PAULA-LOPES e HANSEN, 2002ab).

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

Recentemente, Roth e Hansen (2004a; 2005) demonstraram o papel da apoptose oocitária induzida pelo ETC. A exposição de oócitos a este estresse térmico durante as primeiras 12 horas de MIV aumentou a proporção de oócitos positivos para apoptose. O bloqueio da apoptose oocitária com inibidor de caspases (z-DEVD-fmk) (ROTH e HANSEN, 2004a) ou com esfingolípido (esfingosina-1-fosfato) (ROTH e HANSEN, 2004b) resgatou os índices de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto de oócitos expostos ao estresse térmico.

A apoptose é o processo de MCP 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, protrusões 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). Bioquimicamente a apoptose caracteriza-se pela desorganização da camada bilipídica, ativação da cascata das enzimas caspases, o que desencadeia a ativação da DNase CAD (*caspase-activated DNase*) e a clivagem do DNA entre nucleossomos, gerando fragmentos de DNA entre 180-200 pb (WYLLIE, 1997; HERGARTNER, 2000).

A apoptose pode ser ativada via mitocondrial ou via receptores de morte na membrana plasmática (BUDIARDJO et al., 1999; SCHMITZ et al., 2000). Em geral, o estresse celular ativa o caminho mitocondrial, alterando a razão entre as proteínas pró-apoptóticas e as anti-apoptóticas (MOTYL, 1999). O estímulo pró-apoptótico aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, resultando na liberação de moléculas apoptogênicas (citocromo c, fator-indutor de apoptose) para o citosol (DU, 2000; PATTERSON et al., 2000). Uma vez no citosol, o citocromo c se liga à molécula adaptadora Apaf-1 (fator ativador de apoptose) (LI et al., 1997), induzindo a formação do apoptosomo e ativação das caspases-9 e -3. A caspase-3 executora ativa a endonuclease citosólica CAD que migra para o núcleo e degrada o DNA, gerando fragmentos internucleossomais (ENARI et al., 1998; SAKAHIRA et al., 1998). A apoptose também induz a perda da assimetria da membrana plasmática, causando a translocação da fosfatidilserina (FS) para o folheto externo da membrana. Esta localização da FS marca a célula apoptótica, sinalizando a fagocitose por células vizinhas ou fagócitos (MARTIN et al., 1995).

Outra alteração celular induzida pelo estresse térmico durante a maturação oocitária é a redução da capacidade de síntese protéica do oócito (EDWARDS e HANSEN, 1996) e desorganização do fuso meiótico devido às alterações no citoesqueleto (ROTH e HANSEN, 2005; JU et al., 2005). A exposição de oócitos ao estresse térmico durante as primeiras 12

horas de MIV desorganizou os microtúbulos e microfilamentos de actina (ROTH e HANSEN, 2005). Estudos com microscopia eletrônica demonstraram que o estresse térmico em embriões de 2-células causa o movimento de organelas para o centro do blastômero e o aumento da proporção de mitocôndrias edemaciadas (RIVERA et al., 2004b). Essa reorganização do citoesqueleto, induzida pelo estresse térmico, foi minimizada com o uso de inibidores de microfilamentos e microtúbulos. No entanto, apenas o inibidor de microtúbulos preveniu o edema mitocondrial, sugerindo o papel dos microtúbulos na alteração do potencial da membrana mitocondrial (PMM) e consequente apoptose (RIVERA et al., 2004a).

2.5.6. Estresse térmico e sobrevivência embrionária

O embrião bovino no período de pré-implantação tem sido foco de estudos que tentaram elucidar o problema reprodutivo associado ao ETC. Alguns experimentos demonstraram que o embrião no início do desenvolvimento é severamente afetado pelo ETC e que o mesmo adquire resistência à temperatura elevada à medida que progride no desenvolvimento (EALY et al., 1993; EALY et al., 2000).

A mortalidade embrionária nas espécies aumenta quando ocorre exposição da mãe a elevadas temperaturas do ambiente, especialmente em áreas tropicais (JAINUDEEN E HAFEZ, 2000). Vacas submetidas ao estresse térmico após a inseminação apresentam uma menor taxa de prenhez (PUTNEY et al., 1988; EALY et al., 2000). Os efeitos do estresse térmico sobre os embriões não são aparentes até os estádios tardios de desenvolvimento. Oócitos fertilizados de ovelhas e vacas, quando colocados em altas temperaturas, tanto *in vitro* como *in vivo* são prejudicados porém, continuam a se desenvolver, somente morrendo durante os 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 no dia 1 (D-1), porém não no dia 3, 5 e 7 (EALY et al., 1995). 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., 1982a; 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 prostaglandina $PGF2\alpha$ (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 ETC reduz o fluxo sanguíneo no útero (ROMAN-PONCE, 1978) e, como resultado, o envio de nutrientes e hormônios a este órgão também é comprometido (ROSENBERG et al., 1982b; HOWELL et al., 1994).

As consequências celulares do ETC têm sido descritas para embriões bovinos no estágio de duas 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 cultivo *in vitro* (EALY et al., 1995) ou ainda reduzindo a quantidade de oxigênio contida na incubadora (RIVERA et al., 2004b).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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.

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

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.

ARMSTRONG, D. V. Heat estress interaction with shade and cooling. **Journal Dairy Science**, v.77, p.2044-2050, 1994.

BAÊTA, F. C.; SOUZA, C. F. **Ambiência em Edificações Rurais**. (1 ed.) Viçosa: UFV. 1997.

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.

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.

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.

BAKER, S. J.; REDDY, E. P. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. **Oncogene**, v.12, p.1-9, 1996.

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.

BAYSAL, K. et al. Na⁺ de Ca²⁺ efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive Ca²⁺/2Na⁺ exchanger. **American Journal of Physiology**, v.266, p.800-808, 1994.

BERMAN, A. et al. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in subtropical climate. **Journal Dairy Science**, v.68, p.1488-1495, 1985.

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.

BRILL, A. et al. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.16, p.512-519, 1999.

BRISON, D. R.; SCHULTZ, R. M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biology of Reproduction**, v.56, n.5, p.1088-1096, 1997.

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.

BUDIHardJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Rev Cell Development Biology**, v.15, p.269-290, 1999.

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

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

CAMPBELL, J. R.; LASIEY, J. F. **The science of animals that serve humanity**. In: HILL M. G. (ed.), 1985.

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

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

COSTA, M. P. **Primeiro Ciclo de Palestras Sobre Bioclimatologia Animal**. Botucatu: FUNESP. 1989.

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.

CROZET, N. Nucleolar structure and RNA synthesis in mammalian oocytes. ***Journal of Reproduction and Fertility***, v.38, p.9-16, 1989.

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

CURTIS, S. E. ***Environmental Manmagement 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.

DENAULT, J. B.; SALVESEN, G. S. Caspases: keys in the ignition of cell death. ***Chemical Reviews***, v.102, n.2, p.4489-4500, 2002.

DE SMEDT, V.; CROZET, N.; GALL, L. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. ***Journal Experimental Zoology***, v.269, p.128-139, 1994.

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.

DIDENKO, V. V.; HORNSBY, P. J. Presence of double-strand breaks with single-base 3'overhangs in cell undergoing apoptosis but nor necrosis. ***Journal of Cell Biology***, v.135, p.1369-1996.

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.

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

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.

EALY, A. D. et al. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.535-47, 2000.

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. 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 embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.138-145, 1997.

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).

ENARI, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v.391, p.43-50, 1998.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of animal Science*, v.25, p.800-805, 1966. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. Cap. 10, p.195-226.

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

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.

FADOK, V. A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of Immunology**, v.148, n.7, p.2207-2216, 1992.

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.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais-MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. Cap. 11, p.227-260.

FOULADI NASHTA, A. A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K. H. S. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biology of Reproduction**, v.59, p.255-262, 1998.

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.

FRASER, A.; EVAN, G. A license to kill. **Cell**, v.85, p.781-784, 1996.

FUJINO, Y. et al. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. **Human Reproduction**, v.11, n.7, p.1480-14-83, 1996.

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.

GALL, L. et al. Meiotically incompetent and competent goat oocytes: timing of nuclear events and protein phosphorylation. **Theriogenology**, v.46, n.4, p.825-835, 1996.

GEWIES, A. Introduction to apoptosis. **ApoReview**, p.1-26, 2003. Disponível em: <<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>>. Acessado em 14 de outubro de 2009.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J, V. F. (ed.), **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, Livraria Varela, São Paulo, p.195-226, 2002.

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.

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

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

GOODHAND, K. L. et al. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine treated with progesterone, estradiol and FSH. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.145-158, 2000.

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

GREEN, D. R.; MARTIN, S. J. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. **Current Opinion in Immunology**, n. 7, p. 694-703, 1995.

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.

GRUNERT, E. **Infertilidad en la vaca**. Montevideo, Uruguay. (10ª ed.) Hemisferio Sur, 1989, 475p.

GUNTER, T. E. et al. The Ca^{2+} transport mechanisms of mitochondria and Ca^{2+} uptake physiological-type Ca^{2+} 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. S. **Adaptación de los Animales Domésticos**. (ed.) Editora Labor, Barcelona: Espanha, 1973, 365p.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. (6ª ed.) Editora Manole. São Paulo: SP, 1994, 654p.

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

HALE, A. J. et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. **Biochemical Journal**, n.236, p.1-26, 1996.

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.

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.

HICKMAN, J. A. Apoptosis and chemotherapy resistance. **European Journal of Cancer**, v.324, p.921-926, 1996.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovarian. International review of cytology, v.124, p.43-101, 1991. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. Cap. 11, p.227-260.

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.

IBGE - 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.

IGONO, M. O. et al. Physiological, productive, and economic benefits of shade, spray, and fan system versus shade for Holstein cows during summer heat. **Journal Dairy Science**, v.70, p.1069-1079, 1987.

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.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.50, n.1, p.119-121, 1977.

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^a 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.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; LOWE, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v.108, p.153-164, 2002.

JU, J. C.; TSENG J. K. Nuclear and cytoskeletal alterations of *in vitro* matured porcine oocytes under hyperthermia. **Molecular Reproduction and 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 and Development**, v.51, n.3, p.243-253, 1998.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. R.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with ranging implication in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26, p.239-257, 1972.

KERR, J. F. R.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v.73, p.2013-2026, 1994.

KIM, J. M. et al. Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is associated with increased levels of FAS and FAS ligand in the rat ovary. **Biology of Reproduction**, v.58, p.1170-1179, 1998.

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

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.

KORSMEYER, S. J. Regulator of cell death. **Trends in Genetics**, v.11, n.3, p.101-105, 1995.

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.

KRININGER, C. E. et al. Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.63, p.335-340, 2002.

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

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

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.

LEE, J. M.; BERNSTEIN, A. Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.14, p.149-161, 1995.

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.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegment muscles of silkworms. **Journal of Insect Physiology**, v.10, p.643-649, 1964.

LOCKSHIN, R. A.; ZACHERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, n.7, p.545-550, 2001.

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. 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.

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

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.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v.146, n.1, p.3-15, 1995.

MAKIN, G. Targeting apoptosis in cancer chemotherapy. **Expert Opinion Therapeutic Targets**, v. 6, p.73-84, 2002.

MARCHAL, R. et al. Effects of cell cycle dependent kinase inhibitor on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, p.65-75, 2001.

MARTIN, S. J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **Journal Experiment Medicine**. v.182, p.1545-1556, 1995.

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

MARTINO, A. et al. Meiotic competence prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v.41, n.4, p.969-980, 1994.

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.

MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v.8, p.57-68, 2000.

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.

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.

MILOVANOV, C.; SIRARD, M. A. Manipulation of chromosome condensation by protein synthesis inhibitors and cyclic maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.41, n.4, p.819-827, 1994.

MITALIPOV, S. M. NUSSER, K. F.; WOLF, D. P. Parthenogenetic activation of *rhesus monkey* oocytes and reconstructed embryos. **Biology of Reproduction**, v.65, p.253-259, 2001.

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.

MOTYL, T. Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2-related proteins. **Reproduction Nutrition Development**, v.39, p.49-59, 1999.

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

NÃÃS, 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.

NEUBER, E. et al. Analysis of apoptosis *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Biology of Reproduction**, v.61, p.202-203, 2000.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochemical Science**, v. 8, p.299-306, 1997.

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.

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.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases. **Aquiver Gastroenterology**, v.38, n.2, p.38-44, 2001.

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.

PATTERSON, S. et al. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. **Cell Death Differ**, v.7, p.137-144, 2000.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochem Biophys 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.

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.

PEREZ, G. I.; TILLY, J. L. *Cumullus* cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. **Human Reproduction**, v.12, p.2781-2783, 1997.

PORTER, D. A. et al. Relationship of FAS ligand expression and atresia during bovine follicle development. **Reproduction**, v.121, p.561-566, 2001.

POWERS, R.; PALEOS, G. A. Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.66, p.1-8, 1982.

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.

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.

RAFFRAY, M.; COHEN, G. M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct models of cell death. **Pharmacology and Therapeutics**, v.75, p.153-177, 1997.

REED, J. C. Apoptosis-targeted therapies for cancer. **Cancer Cell**, v.3, p.17-22, 2003.

REUTELINGSPERGER, C. P.; VAN HEERDE, W. L. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. **Cell Molecular Life Science**, v.53, n.6, p.527-532, 1997.

RHO, G. J.; HAHNEL, C.; BETTERIDGE, K. J. Comparatons of oocytes maturation tims and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryon *in vitro*. **Theriogenology**, v.56, n.3, p.503-516, 2001.

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, 2004a.

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, 2004b.

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.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E. et al. Selection of prepubertal goats' oocytes using the brilliant cresyl blue test. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1397-1509, 2002.

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.

ROSENBERG, A. et al. Multicollision Model for Amplification by Stimulated Emission of Bremsstrahlung. **Physical Review Archive**, v.49, p.1917-1920, 1982a.

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, 1982b.

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.

RUSSI, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Biblie Anatomic*. v.24, p.77-92, 1983. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. Cap. 11, p.227-260.

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.

SAKAHIRA, H.; ENARI, M.; NAGATA, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**, v.391, p.96-99, 1998.

SANBUISHO, A.; COSKUN, S.; LIN, Y. C. Role of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) *in vitro* on bovine oocytes maturation. **Theriogenology**, v.38, n.1, p.153-163, 1992.

SANDERS, E. J.; TORKKELI, P. H.; FRENCH, A. S. Patterns of cell death during gastrulation in chick and mouse embryos. **Anatomy and Embryology**, v.195, n.2, p.147-154, 1997.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v.45, n.3, p.528-537, 2000.

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.

SAUNDERS JR., J. W. Death in embryonic systems. **Science**, v.154, n.749, p.604-612, 1966.

SCHMITZ, I.; KIRCHHOFF, S.; KRAMMER, P. H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. **Institute of Biochemistry and Cell Biology**. v.32, p.1123-1136, 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.

SHIMIZU, T. et al. Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. **Reproduction**, v.129, n.4, p.463-72, 2005.

SHIOYA, Y. et al. *In vitro* fertilization and cleavage capacity 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.

SMALL, 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* of 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.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v.26, n.1, p.90-100, 1990.

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

THOMPSON, C. B. Apoptosis. In: PAUL, W. E. (Ed.). **Fundamental Immunology**, (4^o ed.) Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999, p.813-829.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, p.1456-1462, 1995.

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.

THIBAULT, 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.

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.

TRUMPT, B. F.; GOLDBLATT, P. J.; STOWELL, R. E. Studies of necrosis *in vitro* of mouse hepatic parenchyma cells. Ultrastructural alterations in endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, plasma membrane and lipid droplets. **Laboratory Investigation**, v.14, p.2000-2028, 1965.

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.

VAN LOO, G. et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. **Cell Death and Differentiation**, v.9, p.20-26, 2002.

VASCONCELOS, J. L. M. **Manejo de vacas leiteiras para melhoria do desempenho reprodutivo durante períodos de estresse calórico**, 2003. Disponível em: <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**, 2^a 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: 1. Lactating cows. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 2124-2131, 1998b.

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, 1998a.

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.

WYLLIE, A. H. The biology of cell death in tumors. **Anticancer Research**, v.5, p.131-142, 1985.

WYLLIE, A. H. The genetic regulation of apoptosis. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.5, n.1, p.97-104, 1995.

WYLLIE, A. H. Apoptosis: an overview. **British Medical Bulletin**, v.53, p.451-465, 1997.

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, 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.

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.

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

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

ZEUNER, A. et al. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v.59, n.5, p.1421-1433, 2003.

CAPÍTULO 1

**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)*

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

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)

RM Chaves^{A,B}; FQG Bezerra^B; CR Aguiar Filho^B; ER Santos Junior^B; JDR Alves^B; MC Rabelo^B; FF Paula-Lopes^{B,D}; CH Dezotti^C; PF Lima^B; MAL Oliveira^{B(*)}

^ALaboratório de Reprodução Animal – UEMA, Cidade Universitária Paulo VI, Bairro Tirirical, Caixa Postal nº 9, São Luis – MA, Brasil

^BLaboratório de Biotécnicas da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária/

^CDepartamento de Estatística e Informática da UFRPE/

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos s/n, Recife-PE,

^DDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, Rua Prof. Artur Riedel, 275, Diadema- SP. Brasil.

* Autor para correspondência maloufrpe@uol.com.br

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 caprino. Os ovários de cabras 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 morfologia. Divididos em Grupo-1 (recuperado), avaliados logo após a colheita e Grupo-2 (maturados *in vitro*) avaliados logo após maturação, 25 oócitos foram colocados em meio básico de maturação (MBM). Após a coleta dos oócitos, foi determinado a qualidade, atividade das enzimas Caspases do grupo II com reagente PhiPhiLux-G₁D₂ e fragmentação de DNA (TUNEL). Após maturação, foi determinado o estágio de maturação nuclear, enzimas Caspases e fragmentação de DNA. Nos estádios de maturação nuclear as fases de Vesícula Germinativa, Rompimento da Vesícula Germinativa, Metáfase I e II não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$). Não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) na atividade das enzimas Caspases e na fragmentação do DNA dos oócitos recuperados e maturados *in vitro*. Com base nos dados obtidos, podemos concluir que as estações seca e chuvosa não exercem influência na maturação nuclear *in vitro* e na apoptose de oócitos da espécie caprina.

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

ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of season on nuclear maturation *in vitro* and induction of cell death by apoptosis in goat oocytes. The ovaries of goats 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* complexes in 12 replicates were harvested by the technique of "slicing" of the follicles from 2 to 6 mm in diameter and selected based on morphology. Divided into Group-1 (recovered), evaluated immediately after harvest and Group-2 (*in vitro* matured) evaluated immediately after maturation, 25 oocytes were placed in basic medium maturity (MBM). After collection of oocytes was determined the quality, the enzyme activity of group II caspases with reagent PhiPhiLux-G1D2 and DNA fragmentation (TUNEL). After maturation, was given the stage of nuclear maturation, enzymes caspases and DNA fragmentation. In the stages of nuclear maturation stages of Germinative Vesicle, Germinative Vesicle Break-Down, Metaphase I and II showed no significant difference ($P > 0.05$). There was significant difference ($P > 0.05$) in activity of enzymes and Caspases in DNA fragmentation of oocytes recovered and *in vitro* matured. Based on data obtained, we conclude that in the dry and rainy seasons do not influence *in vitro* nuclear maturation and apoptosis of goat oocytes.

Keywords: Apoptosis, *cumulus oophorus* complexes, follicles, Caspases, test TUNEL.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura é hoje uma atividade do setor primário com expressivo potencial sócio-econômico em todas as regiões do Brasil, estimulando o desenvolvimento e criando novas possibilidades de agronegócio e de inclusão social. No entanto, a baixa produtividade e a falta de organização do sistema de produção limitam o aproveitamento dessa atividade no país (COSTA et al., 2008). A baixa produtividade dos rebanhos 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 (JORDAN, 2003).

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

A susceptibilidade dos oócitos aos efeitos diretos da temperatura elevada 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 (ROTH e HANSEN, 2004a). 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 durante as primeiras 12 horas de MIV bloqueou ou reduziu o desenvolvimento embrionário (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004a).

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

Recentemente, Roth e Hansen (2004a; 2005) demonstraram o papel da apoptose oocitária induzida pelo estresse térmico. A exposição de oócitos ao estresse térmico durante as primeiras 12 horas de MIV aumentou a proporção de oócitos positivos para apoptose. O

bloqueio da apoptose oocitária com inibidor de caspases (z-DEVD-fmk) (ROTH e HANSEN, 2004a) ou com esfingolípido (esfingosina-1-fosfato) resgatou os índices de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (ROTH e HANSEN, 2004b; MORITA et al., 2000).

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 (ROTH e HANSEN, 2004ab), o que pode se repetir em outra espécie como caprina. Diante do exposto, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da estação do ano na maturação nuclear *in vitro* e na indução da morte celular por apoptose em oócitos da espécie caprina.

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. Os ovários foram colhidos de cabras na estação seca (outubro a março) e chuvosa (abril a setembro). Os índices de temperatura e umidade do ar de cada mês foram obtidos com base nos dados climáticos das estações meteorológicas estaduais (INMET). A temperatura retal e frequência respiratória dos animais foram aferidas no dia do abate.

Foram utilizados 1116 ovários de cabras SRD com idade variando de 12 a 46 meses, adquiridas na região do semi-árido pernambucano e 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 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, os ovários foram transportados para o Laboratório de Biotécnicas da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em garrafa térmica contendo solução fisiológica em temperatura de 30°C acrescida de 30 µg/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 20-25 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 CO₂ durante 24 horas.

Foram realizadas 12 repetições em cada estação, na estação seca foram colhidos 2914 oócitos e na chuvosa 2831 oócitos de 554 e 562 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* (MIV).

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[®]). 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 maturação, 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 estatística foi realizada análise de variância. 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

No Grupo-1 não houve efeito das estações seca ou chuvosa na qualidade dos CCOs recuperados (Tabela 1). Quando estes oócitos foram MIV não houve efeito da estação do ano na porcentagem de oócitos de qualidade I ou II. No entanto, a proporção de oócitos

com qualidade III foi maior ($P < 0,05$) na estação seca, enquanto que a média e desvio padrão de oócitos qualidade IV foi maior ($P < 0,05$) na estação chuvosa (Tabela 2). Não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparados a média e desvio padrão da maturação de oócitos de fêmeas abatidas na estação seca ($64,08 \pm 6,88$) e chuvosa ($66,75 \pm 9,22$) (Tabela 2).

Nos oócitos do Grupo-2, as médias e desvio padrão dos oócitos Deg., ND, VG, GVBD, MI, AI e MII não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) em relação à estação do ano. No entanto, as médias e desvio padrão dos oócito na TI foi maior ($P < 0,05$) na estação chuvosa em relação à estação seca (Tabela 3).

Tabela 1: Média e desvio padrão da qualidade de complexo *cumulus oophorus* (CCOs) avaliados após colheita da espécie caprina abatidas na região Metropolitana do Recife em relação à estação do ano.

Qualidade dos CCOs avaliados após colheita	Estações do ano	
	Seca n / ($\bar{x} \pm s$)	Chuvosa n / ($\bar{x} \pm s$)
Qualidade I (QI)	199 / 16,58 \pm 3,28	207 / 17,25 \pm 3,46
Qualidade II (QII)	316 / 26,33 \pm 5,22	325 / 27,08 \pm 4,81
Qualidade III (QIII)	380 / 31,66 \pm 5,21	339 / 28,25 \pm 5,95
Qualidade IV (QIV)	577 / 46,08 \pm 9,65	494 / 43,16 \pm 7,35
Total	1472	1365

n = número de oócitos, \bar{x} = média, s = desvio padrão.

Tabela 2: Média e desvio padrão da qualidade de complexo *cumulus oophorus* (CCOs) maturados *in vitro* (MIV) da espécie caprina abatidas na região Metropolitana do Recife em relação à estação do ano.

Qualidade dos CCOs maturados <i>in vitro</i> (MIV)	Estações do ano	
	Seca n / ($\bar{x} \pm s$)	Chuvosa n / ($\bar{x} \pm s$)
Qualidade I (QI)	196 / 16,33 \pm 3,08	173 / 14,41 \pm 3,28
Qualidade II (QII)	288 / 24,00 \pm 4,32	256 / 21,33 \pm 3,62
Qualidade III (QIII)	412 / 34,33 \pm 4,03 ^a	327 / 27,25 \pm 5,80 ^b
Qualidade IV (QIV)	546 / 45,50 \pm 9,92 ^a	710 / 59,16 \pm 9,59 ^b
Maturação <i>in vitro</i>	841 / 64,08 \pm 6,88	874 / 66,75 \pm 9,22
Total	1442	1466

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

n = numero de oócitos, \bar{x} = média, s = desvio padrão.

Tabela 3: Média e desvio padrão do estágio de maturação nuclear dos oócitos de fêmeas caprinas abatidas na região Metropolitana do Recife em relação à estação do ano.

Estádio de maturação nuclear	Estações do ano	
	Seca n / ($\bar{x} \pm s$)	Chuvosa n / ($\bar{x} \pm s$)
Degenerados (Deg)	56 / 7,57 ± 0,12	50 / 6,68 ± 0,32
Não Definido (ND)	47 / 6,32 ± 0,21	36 / 5,45 ± 0,14
Vesícula Germinativa (VG)	27 / 3,53 ± 0,11	33 / 4,12 ± 0,22
Rompimento da Vesícula Germinativa (GVBD)	89 / 12,24 ± 1,43	84 / 11,65 ± 1,37
Metáfase I (MI)	63 / 8,86 ± 0,98	52 / 7,88 ± 1,05
Anáfase I (AI)	34 / 5,32 ± 0,37	36 / 5,45 ± 0,41
Telófase I (TI)	32 / 4,92 ± 0,45 ^a	55 / 7,55 ± 0,49 ^b
Metáfase II (MII)	421 / 62,43 ± 5,98	455 / 64,41 ± 6,76
Total	769	801

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 ($P > 0,05$) tanto nos oócitos do Grupo-1 quanto do Grupo-2 (Figura 1). Nos oócitos recuperados antes da MIV (Grupo-1) a atividade de caspases foi 9,44% na estação seca e 8,57% na chuvosa. Quando a atividade enzimática foi avaliada após a MIV foi 11,57% na seca e 8,73% na chuva (Figura 1).

Da mesma forma, a porcentagem dos oócitos com fragmentação do DNA positivos para o teste de TUNEL não foi afetada pela estação do ano ($P > 0,05$), tanto em oócito do Grupo-1 quanto do Grupo-2 (Figura 2). No Grupo-1 a proporção dos oócitos TUNEL-positivo foi 10,86% na estação seca e 9,08% na chuvosa. Quando os oócitos foram submetidos a MIV (Grupo-2) a porcentagem dos oócitos TUNEL-positivo foi 11,31% na seca e 9,86% na chuva (Figura 2).

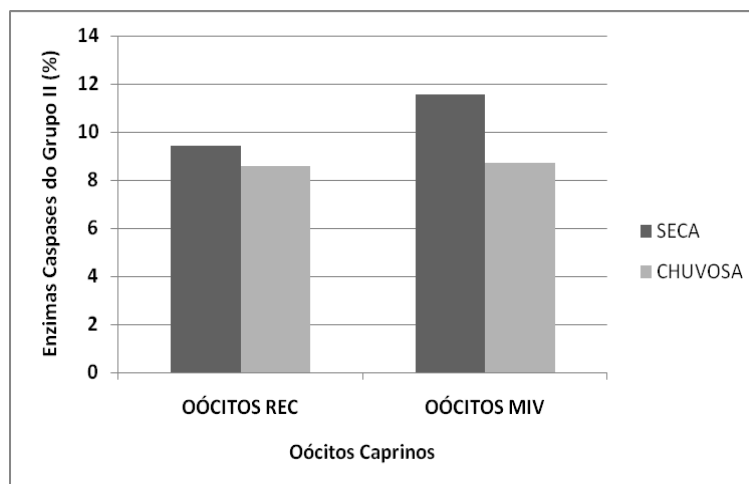


Figura 1: Efeito das estações seca e chuvosa na atividade das enzimas Caspase do grupo II na porcentagem de oócitos recuperados (REC.) e maturados *in vitro* (MIV) da espécie caprina ($P < 0,05$) pelo teste *T*.

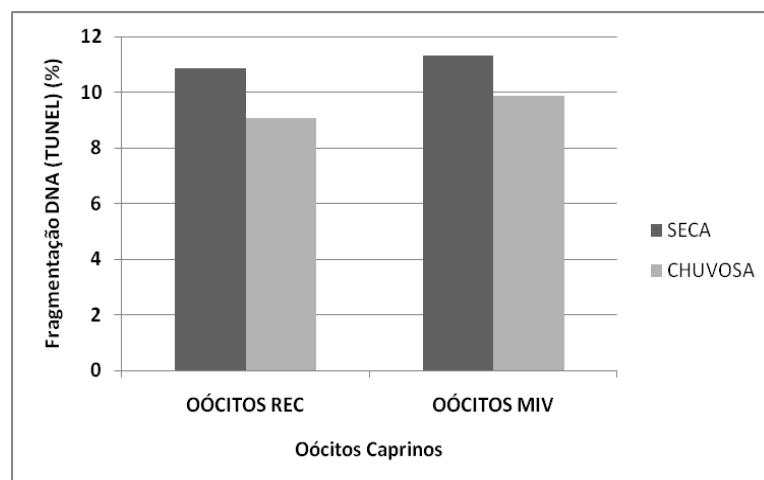
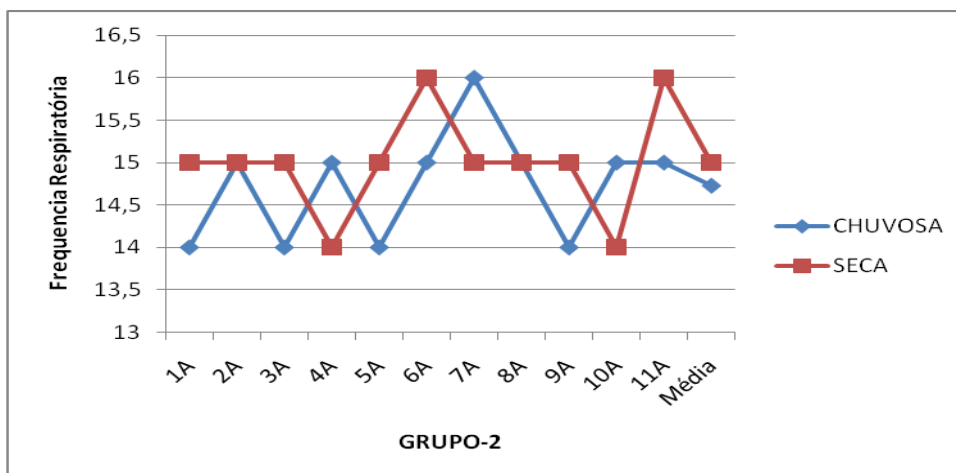


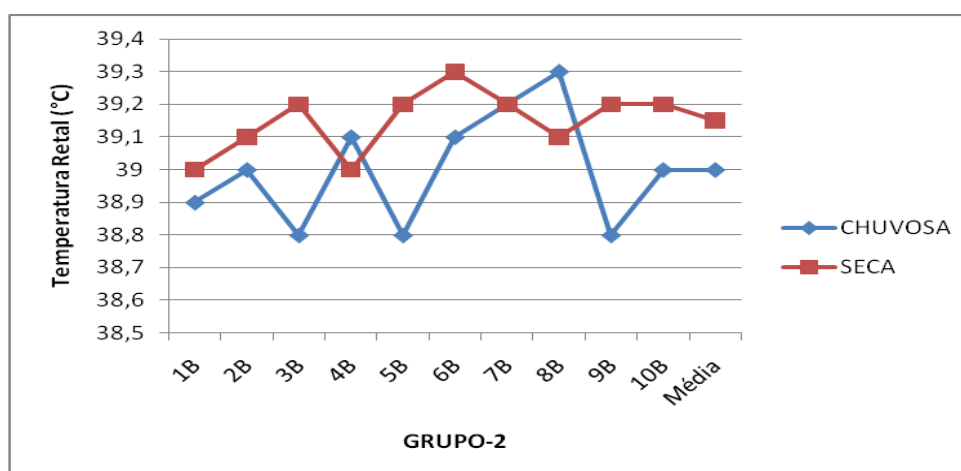
Figura 2: Efeito das estações do ano seca e chuvosa na fragmentação de DNA (TUNEL) na porcentagem de oócitos recuperados (REC) e maturados *in vitro* (MIV) da espécie caprina ($P < 0,05$) pelo teste *T*.

A média e desvio padrão da frequência respiratória das fêmeas do grupo-2 abatidas foi de $15,1 \pm 0,90$ e $14,7 \pm 1,10$ p/minuto na estação seca e na chuvosa, respectivamente, apresentando variações entre 14 e 16 movimentos respiratórios por minuto em ambas as estações (Figura 3).

A média e desvio padrão da temperatura retal na estação seca foi de $39,15 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$, apresentando uma variação de 39 a $39,3^{\circ}\text{C}$ e na chuvosa apresentou média e desvio padrão de $39,02 \pm 0,30^{\circ}\text{C}$ com variações mais amplas (38,8 a $39,3^{\circ}\text{C}$) em ambas estações (Figura 4).



Figuras 3: Frequência respiratória (FR) de fêmeas caprinas abatidas nas estações seca e chuvosa.



Figuras 4: Temperatura retal (TR) de fêmeas caprinas abatidas nas estações seca e chuvosa.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise da maturação nuclear *in vitro* dos oócitos coletados nas estações seca e chuvosa estão próximos aos obtidos por Paula et al. (2008) e Carneiro (2008), quanto as médias de maturação *in vitro*. As taxas de metáfase II obtidas neste estudo, explicam-se pelo fato de que, em cultivo *in vitro* ocorre uma menor média de oócitos que completam a maturação nuclear devido à pouca quantidade ou ausência de células do *cumulus*, oócitos com qualidade III e IV, apresentando maiores médias de oócitos nas fases intermediárias da meiose como a fase de telófase I, o que não favorece a maturação oocitária *in vitro*, mas não interferindo nos resultados da maturação (CECCONI et al., 2007).

Baldassarre et al. (2002) estudaram as particularidades do ciclo sexual e observaram que em qualquer fase do ciclo estral de cabras, 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), podendo explicar que durante as estações seca e chuvosa foi encontrado diferença na qualidade III e IV dos oócitos maturados *in vitro*, onde a presença das células do *cumulus* foi um fator importante na classificação da qualidade dos CCOs, pois os oócitos desnudos têm qualidade inferior e baixas porcentagem de clivagem (FATEHI et al., 2005) estando presente em maior número em caprinos (RUBIANES e MENCHACA, 2003). Já Blondin e Sirard (1995) observaram em bovinos que a competência para o desenvolvimento embrionário *in vitro* somente foi afetada por altos níveis de atresia das células do *cumulus*.

As médias dos CCOs com qualidade QI e QII apresentando *cumulus* compacto com mais de três camadas de células foi pequena quando comparado com os de qualidade QIII e QIV, como encontrado por Chaves et al. (2009) onde concluíram que o diâmetro folicular não exerce influência sobre a qualidade dos CCOs recuperados de fêmeas caprinas, no que aumenta a importância das células do *cumulus*. Já Cecconi et al. (2007) observaram que esta ausência de qualidade acaba diminuindo a capacidade de maturação nuclear *in vitro* devido também a fatores internos da célula, como a integridade do *ooplasma* que deve ser esférico com granulações finas e homogêneas, preenchendo regularmente o interior da zona pelúcida.

A adequada seleção dos CCOs permite aumentar as taxas de maturação nuclear *in vitro*, diminuindo variações nos resultados (CECCONI et al., 2007). Com oócitos cobertos com três ou mais camadas completas e aderidas de células do *cumulus* ou com *cumulus* intacto, com *ooplasma* homogêneo, de coloração marrom e sem grânulos rugosos é possível conseguir melhores resultados do que com oócitos com *cumulus* incompleto ou expandido (YANG et al., 1990; HAZAKEGER e STUBBINGS, 1992). Todavia, em caprinos, o emprego dos CCOs na maturação, não obedece a um critério rígido, variando desde aqueles com *cumulus* compacto até os que apresentam apenas uma camada de células do *cumulus* (MARTINO et al., 1994; IZQUIERDO et al., 1999). *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 do choque térmico que protegem os oócitos durante a maturação *in vivo* e *in vitro* (EDWARDS e HANSEN, 1997).

A condição fisiológica da doadora, como peso, raça, idade e variação individual, têm merecido atenção em diversos estudos, pois interferem diretamente na qualidade dos CCOs recuperados (VINOLES et al., 2002; FATEHI et al., 2005; CECCONI et al., 2007). Rubianes e Menchaca (2003), trabalhando com ovários de cabras de matadouro, não encontraram diferenças na qualidade dos CCOs entre animais jovens (a partir de 18 meses) e senis (até 17 anos), embora tenham notado redução na produção de gametas nos animais mais velhos. Neste estudo, a idade, a raça e o peso das fêmeas foram variados, mas principalmente fatores individuais das doadoras podem ter interferido na qualidade dos CCOs recuperados e maturados, já que a temperatura ambiental não teve grandes variações e não alteraram a temperatura retal e frequência respiratória em ambas as estações.

Apenas uma fração dos oócitos expostos a altas temperaturas do ambiente desenvolvem mudanças apoptóticas, existem componentes inter e intra-celulares que definem se um oócito pode reagir a estas agressões do ambiente (ROTH e HANSEN, 2004b). Tatemoto et al. (2000) estudando suínos, observaram que as células do *cumulus* parecem ter um papel fundamental na proteção dos oócitos contra apoptose induzida por estresse oxidativo. Edwards e Hansen (1996) e Kolle et al. (2003) concluíram que células do *cumulus* fornecem termo-proteção para oócitos bovinos e, talvez, a integridade e a função dos CCOs 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*, o que pode justificar as taxas de maturação *in vitro* que são obtidas em caprinos, levando-se em conta que a maior quantidade dos CCOs da espécie recuperados neste estudo apresentaram baixa qualidade.

Roth e Hansen (2004b), pesquisando a competência do desenvolvimento e resistência de oócitos bovinos sob condições de estresse térmico, evidenciaram que as altas temperaturas do ambiente, mesmo que dentro de intervalos fisiológicos, podem ser um estímulo para a morte celular programada em oócitos mamíferos. No presente estudo,

mudanças morfológicas não foram observadas em associação com o aumento da atividade caspase. A fragmentação do DNA celular nos oócitos observadas por Vam Blerkom e Davis (1998) não é sempre um resultado da ativação da caspase e, portanto, é possível que o choque térmico produzido pelas altas temperaturas ambientais 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.

Levando-se em conta a importância do impacto ambiental para a produção e reprodução das espécies domésticas e para melhorar a qualidade oocitária e a eficiência reprodutiva de fêmeas caprinas, mas pesquisas em outras regiões são necessárias para melhor entender os efeitos das estações do ano na maturação nuclear *in vitro*.

CONCLUSÃO

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. 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.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using

laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. **Theriogenology**, v.57, n.2, p.275-284, 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.; MAURO, A.; CAPACCHIETTI, G.; BERARDINELLI, P.; BERNABÒ, N.; DI VINCENZO, A. R.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. 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.; AGUIAR FILHO, C. R.; SANTOS JUNIOR, E. R.; ALMEIDA-IRMÃO, J. M.; PAULA, J. T.; SACRAMENTO, L. R.; MELO, R. E.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. 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.; ALMEIDA, C.C.; PIMENTA, FILHO, E. C.; HOLANDA JUNIOR, E. V.; SANTOS, N. M. 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.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E. J.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. 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.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. 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.

HAZAKEGER, N. L.; STUBBINGS, R. B. Developmental potential of selected bovine oocyte *cumulus* complexes. **Theriogenology**, v. 37, n.2, p. 219, 1992.

INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/html/prev_climatica_tempo/prognostico>. Acesso em: 23 abr. 2009.

IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M.T. Effect of cultura media on embryo development from prepubertad gota IVM-IVF oocytes. **Theriogenology**, v.52, n.5, p. 847-861, 1999.

JORDAN E. R. Effects of heat stress on reproduction. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.104-114, 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.

KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation *cumulus oophorus* complexes. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1584-589, 2003.

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.

MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J. Meiotic competence prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 41, n.5, p. 969-980, 1994.

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

MORITA, Y.; PEREZ, G. I.; PARIS, F.; MIRANDA, S. R.; EHLEITER, D.; HAIMOVITZ-FRIDMAN, A.; FUX, Z.; XIE, Z.; REED, J. C.; SCHUCHMAN, E. H.; KOLESNICK, R. N.; TILLY, J. L. 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.

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

PAULA, N. R. O.; CARDOSO, J. F. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; FREITAS, V. J. F. Embriões caprinos produzidos *in vivo* ou *in vitro*: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.21-35, 2008.

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

PEREZ, G. I.; KNUDSON, C. M.; LEYKIN, L.; KORSMEYER, S. J.; TILLY, J. L. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. **Natural Medical**, v.3, p.1228-1332, 1997.

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, n.4, p.765-778, 1989.

ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEL, J. D.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. 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.; 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.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animals Reproduction Science**, v. 78, p. 271-287, 2003.

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

SUTOVSKY, P.; FLECHON, J.E.; FLECHON, B.; MOTLIK, J.; PEYNOT, N.; CHESNE, P.; HEYMAN, Y. 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.

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.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. **Animal Science**, v.74, p.539-545, 2002.

YANG, N. S.; LU, K. H.; GORDON, I. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. **Theriogenology**, v. 33, n.2, p. 352-359, 1990.

CAPÍTULO 2

**Influência das estações seca e chuvosa na capacidade de desenvolvimento
de oócitos e produção *in vitro* de embriões na espécie caprina**

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

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

Influência das estações seca e chuvosa na capacidade de desenvolvimento de oócitos e produção *in vitro* de embriões na espécie caprina

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

RM Chaves^{A,B}; FQG Bezerra^B; CR Aguiar Filho^B; ER Santos Junior^B; FF Paula-Lopes^{B,D}; MC Rabelo^B; JDR Alves^B; CH Dezotti^C; PF Lima^B; MAL Oliveira^{B(*)}

^ALaboratório de Reprodução Animal – UEMA, Cidade Universitária Paulo VI, Bairro Tirirical, Caixa Postal nº 9, São Luis – MA, Brasil

^BLaboratório de Biotécnicas da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária

^CDepartamento de Estatística e Informática da UFRPE/

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos s/n, Recife-PE, Brasil.

^DDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, Rua Prof. Artur Riedel, 275, Diadema- SP. Brasil.

* Autor para correspondência maloufrpe@uol.com.br

RESUMO

Objetivou-se com este estudo determinar a influência das estações seca e chuvosa na capacidade de desenvolvimento de oócitos e produção *in vitro* de embriões da espécie caprina. Os ovários das cabras nas estações 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 classificação morfológica. Foram realizadas 12 repetições, onde os CCOs foram submetidos à maturação, fertilização e cultivo. A média e desvio padrão dos oócitos clivados foi determinada no dia 3 (D-3) e dos oócitos 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. A qualidade dos blastocistos foi avaliada com o corante DAPI e a determinação de blastômeros positivos para apoptose através do teste de TUNEL. Foi encontrada diferença significativa ($P < 0,05$) nas fases de fertilização, cultivo no D-3 e mórula. Não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) às fases de maturação, cultivo no D-4, blastocisto e no teste de TUNEL. Nas condições deste estudo, os resultados permitem concluir que não houve influência das estações seca e chuvosa na capacidade de desenvolvimento de oócitos e na produção *in vitro* de embriões da espécie caprina.

Palavras-chave: Apoptose, complexos *cumulus oophorus*, fertilização, desenvolvimento oocitário, teste TUNEL.

ABSTRACT

This study aimed to determine the influence of dry and wet seasons on the ability of developing oocytes and *in vitro* production of embryos in goats. The ovaries of goats in 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 morphologic classification. 12 repetitions were made, where the COCs were submitted to maturation, fertilization and cultivation. The mean and standard deviation of the cleaved oocytes was determined on day 3 (D-3) and the oocytes that developed to the stages of 8-16 cells, morulae and blastocyst was determined at 4 days (D-4), 5 (D - 5) and 8 (D-8) after fertilization, respectively. The quality of blastocysts was assessed with the dye DAPI and the determination of blastomeric positive for apoptosis by TUNEL assay. Significant difference ($P < 0.05$) stages of fertilization, cultivation in D-3 and morulae. No significant difference ($P > 0.05$) phases of maturation, growing on D-4, blastocyst and the TUNEL test. Under the conditions observed in this study, the results indicate that there was no influence of season on the ability of developing oocytes and *in vitro* production of embryos in goats.

Keywords: Apoptosis, *cumulus oophorus* complexes, fertilization, oocyte development, TUNEL test.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento, os quais são detentores dos maiores rebanhos, principalmente devido à introdução comercial de biotecnologias como a IA, TE e produção *in vitro* de embriões (COGNIÉ e BARIL, 2002), vem apresentando um notório crescimento nos aspectos qualitativos e quantitativos.

De acordo com Fonseca (2005) estima-se um crescimento da ordem de 5 vezes o rebanho atual nos próximos 20 anos, multiplicando-o em mais de 50 milhões de cabeças.

Todavia, em função das condições adversas próprias do ambiente com estresse térmico, que causa grande impacto na eficiência reprodutiva dos rebanhos (ROTH e HANSEN, 2004).

A infertilidade causada pelo estresse térmico é um problema de ordem multifatorial, pois afeta as funções fisiológicas e celulares. No que diz respeito à função reprodutiva, o estresse térmico compromete o crescimento folicular (BADINGA et al., 1993; WOLFENSON et al., 1995), a secreção hormonal (WOLFENSON et al., 1995; ROTH et al., 2000), a função do endométrio (MALAYER et al., 1988), o fluxo sanguíneo para o útero (ROMAN-PONCE et al., 1978) e a capacidade de desenvolvimento do oócito (ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI et al., 2002) e do embrião (EALY et al., 1993; PUTNEY et al., 1988).

O efeito deletério multifatorial causado pelo estresse térmico compromete a fertilidade em ovinos (DUTT, 1963; OZAWA et al., 2005), suínos (TOMPKINS et al., 1967), coelhos (WOLFENSON e BLUM, 1988) e bovinos (EALY et al., 1993). O embrião bovino no período de pré-implantação tem sido o foco de estudos visando elucidar o problema reprodutivo associado ao estresse calórico, mas pouco se conhece quando se refere aos caprinos. Alguns experimentos demonstraram que o embrião bovino no início do desenvolvimento é severamente afetado pelo estresse calórico e que o mesmo adquire resistência à temperatura elevada, à medida que progride no desenvolvimento (EALY et al., 1993).

O estresse térmico causa no oócito e no embrião o processo de morte celular programada conhecida como apoptose, em que ocorre autodigestão controlada das células (ROTH e HANSEN, 2004). 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).

A manipulação dos mecanismos envolvidos na indução de apoptose embrionária após o estresse térmico representa alternativas para minimizar os efeitos negativos da temperatura elevada sobre a capacidade reprodutiva das fêmeas (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002b).

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

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ovários de cabras SRD com idade variando de 12 a 46 meses, adquiridas na região do semi-árido pernambucano e 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 oscilou entre de 23 a 33°C na estação seca (outubro/2007 a março/2008) e de 18 a 31°C na chuvosa (abril a setembro/2008). A umidade relativa média do ar foi de 71% no período seco e 85% no período chuvoso (INMET, 2009).

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

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 (3 vezes) no meio MC. Em seguida foram colocados 25 oócitos em gotas de 100 µL sob óleo de parafina esterilizada, em 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

$\mu\text{g/mL}$ de sulfato de gentamicina, $20 \mu\text{g/mL}$ de FSH/LH (Pluset[®]) e 1 mg/mL de álcool polivinílico. Imediatamente após, os oócitos foram colocados em estufa a 39°C , com atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , durante 24 horas.

Após 24 horas de incubação, os oócitos foram submetidos ao processo de fecundação *in vitro*, utilizando sêmen fresco, conforme Cavalcanti Neto (2004). Cuidadosamente, $0,1 \text{ mL}$ de sêmen foi depositado em tubos cônicos de centrífuga contendo $1,5 \text{ mL}$ de meio definido modificado (mDM), de acordo com Keskinetepe et al. (1998), o qual foi constituído de $0,1250 \text{ g}$ de glucose, $0,1552 \text{ g}$ de bicarbonato de sódio, $0,0069 \text{ g}$ de piruvato de sódio, $0,0500 \text{ g}$ de álcool polivinílico, $0,0500 \text{ g}$ de cafeína e $50 \mu\text{g/mL}$ de gentamicina em 50 mL de mDM. Posteriormente, foram inclinados em ângulo de 45° com a finalidade de se obter a migração espermática ascendente. Decorridos 45 minutos do “Swim-Up”, $0,8 \text{ mL}$ da parte superior de cada tubo foram aspirados e centrifugados a 350 G por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, $200 \mu\text{L}$ do meio mDM contendo $10 \mu\text{g/mL}$ de heparina foi acrescentado a $200 \mu\text{L}$ 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 $100 \mu\text{L}$ do mesmo meio sob óleo de parafina esterilizada, local onde foi depositada a suspensão espermática na concentração final de 2×10^6 espermatozóides/mL. Os gametas foram incubados em condições idênticas as de maturação durante o período de 18 horas.

Foram realizadas 12 repetições, sendo utilizados 1249 oócitos na estação na seca e 1235 na chuvosa. Em cada repetição, os CCOs foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). A media e desvio padrão dos oócitos clivados foi determinada no dia 3 (D-3) e dos oócitos 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.

Os zigotos foram mecanicamente desnudados no agitador mecânico Vortex[®] em meio “Synthetic oviduct fluid” modificado (SOFm) durante dois minutos a velocidade “7” (escala 1-10), e 25 estruturas foram transferidas para as gotas de $100 \mu\text{L}$ do meio SOFm suplementados com 10% de SFB, sob óleo de parafina esterilizada. Essas estruturas foram incubadas a 39°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , 5% O_2 , e 90% N_2 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 µL da solução de 4% de paraformaldeído por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em 100 µL da solução de 1 mg/mL de *Polivinilpirrolidona* (PVP) + 100 µL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) e incubados em 100 µL 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 em solução de PBS-PVP até a realização do ensaio de TUNEL. No dia do ensaio de TUNEL, as amostras foram lavadas três vezes em gotas de 100 µL PBS-PVP e incubadas em 15 µL 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 (*4', 6-diamidino-2-phenyindole dihydrochloride*) por 15 minutos, lavadas em gotas de 100 µL de PBS-PVP, transferidas para lâminas e cobertas com lamínula (ROTH e HANSEN, 2004).

Para a estatística foi realizada análise de variância. 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

No que concerne ao total de estruturas recuperadas, os resultados demonstram que não existe diferenças ($P > 0,05$) entre as médias do número de oócitos recuperados nas estações seca e chuvosa. Quanto a média dos oócitos maturados *in vitro* também não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) em função da estação do ano. Entretanto, no que se refere à fertilização *in vitro* mantendo-se as mesmas condições, foi encontrada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos estudados nas estações seca e chuvosa (Tabela 1).

Durante o processo de produção *in vitro* dos oócitos fertilizados, foi observado que as médias dos embriões clivados no D-3 e dos embriões na fase de mórula (D-5) apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) quando comparado as estações seca e chuvosa. Já os embriões cultivados *in vitro* (CIV) no D-4 e os que chegaram à fase de blastocistos (D-8) não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre essas duas estações do ano (Tabela 2).

Tabela 1: Média e desvio padrão dos oócitos recuperados, maturados *in vitro* (MIV) e fertilizados *in vitro* (FIV) da espécie caprina 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	105,75 ± 6,53	108,25 ± 8,03
Maturação <i>in vitro</i> (24h)	53,18 ± 6,25	54,16 ± 6,76
Fertilização <i>in vitro</i> (18h)	28,41 ± 3,75 ^a	29,75 ± 3,84 ^b

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 dos embriões CIV (D-3), CIV (D-4), mórulas (D-5) e blastocistos (D-8) da espécie caprina 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)	23,83 ± 1,02 ^a	25,41 ± 1,44 ^b
Embrião CIV (D-4)	22,25 ± 1,28	22,75 ± 1,21
Mórula (D-5)	20,75 ± 1,28 ^a	21,33 ± 1,43 ^b
Blastocisto (D-8)	6,91 ± 0,79	6,33 ± 0,88

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

\bar{x} = média, s = desvio padrão.

Não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) no teste de TUNEL em blastocistos cultivados até o D-8 com relação as estações climáticas observadas neste estudo, embora, a porcentagem de blastocistos com fragmentação no DNA positivos para apoptose na seca (12,28%) tenha sido proporcionalmente superior a porcentagem encontrada na estação chuvosa (7,24%) (Figura 1).

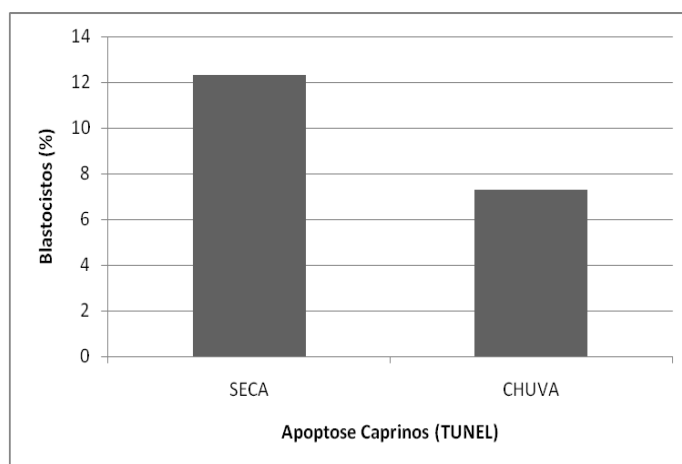


Figura 1: Porcentagem de blastocistos positivos para apoptose (Fragmentação do DNA) em caprinos ($P < 0,05$) pelo teste *F*, abatidos nas estações seca e chuvosa na região Metropolitana do Recife.

DISCUSSÃO

Utilizando meio de maturação composto de TCM-199 suplementado com cisteamina, fator de crescimento epidermal e gentamicina, Freitas et al. (2007) obtiveram uma taxa de maturação nuclear de 48,90% em caprinos, valores aproximados aos encontrados neste experimento nas estações seca e chuvosa. Cognié e Baril (2002) verificaram que, após a fertilização e cultivo *in vitro* durante uma semana, 60 a 70% dos oócitos maturados *in vivo* (ovulados) se desenvolvem até o estágio de blastocisto, no entanto a taxa de desenvolvimento dos blastocistos varia de 35 a 50% para os oócitos maturados *in vitro*. Resultados estes superiores aos obtidos neste experimento em ambas as estações. Chiamenti (2007) pesquisando a adição de retinol e ácido retinóico ao meio de maturação e retinóides associado ao fator de crescimento IGF-I ao meio de cultivo *in vitro*, obteve a média de $7,2 \pm 0,7$ blastocistos, resultados similares aos obtidos neste estudo.

Durante o desenvolvimento embrionário, após a maturação e fecundação *in vitro*, ocorrem alterações rápidas que o torna menos efetivo do que o de oócitos maturados *in vivo* (KIM et al., 1996). Al-Katanani et al. (2002) acreditam que isto ocorra por uma maturação citoplasmática incompleta. De acordo com Hendriksen et al. (2000), a quebra da vesícula germinativa (VG) *in vitro* ocorre mais rapidamente (5 a 6h) do que *in vivo* (7 a 10h), sugerindo que antes de continuar a maturação é requerido um período de pré-maturação, que ocorre naturalmente *in vivo* durante o desenvolvimento pré-ovulatório, dificultando, assim, as etapas de cultivo embrionário, principalmente quando o embrião está submetido a estresse térmico calórico (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002b). Estas reações refletem diretamente na fertilização *in vitro* (HENDRIKSEN et al., 2000), como foi observado neste estudo.

A estação de melhores taxas de desenvolvimento embrionário, representado pela taxa de clivagem (D-3) e mórula (D-5), foram aqueles em que as temperaturas estavam mais baixas, período em que os animais estão menos sujeitos ao estresse calórico, conferindo-lhes maior sucesso reprodutivo como referido na espécie bovina (WOLFESON et al., 2001). No entanto, o período compreendido entre outubro a março é também a época de maior estiagem do ano, sendo crítico na região Nordeste para o cultivo de pastagens, resultando em menor oferta de alimento para os animais criados nessas condições (YDOYAGA, 2006).

A baixa disponibilidade de melhores pastagens em 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 nutricional 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).

Quanto a apoptose, uma de suas funções é eliminar células que são danificadas por estresse. Segundo Matsumoto et al. (1997) e Fuse et al. (1998), o choque térmico, por exemplo, induz apoptose em muitos tipos de células. Embora vários estudos recentes tenham demonstrado que a pré-implantação de embriões em uma fase específica pode sofrer apoptose (BYRNE et al., 1999; MATWEE et al., 2000), poucos estudos têm avaliado o papel do estresse na indução da apoptose em embriões (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a).

As altas 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 (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a). Neste estudo, possivelmente devido às temperaturas ambientais encontradas, e a espécie caprina ser de reconhecida resistência as adversidades do ambiente, apenas 7,24% a 12,28% dos blastômeros foram positivos para marcação do teste de TUNEL após exposição às condições ambientais, sendo possível que apoptoses mais extensas comprometam o desenvolvimento embrionário após estresses mais severos (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002b).

A exposição dos embriões em um ambiente adverso na pré-implantação pode aumentar o número de células apoptóticas (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a). Segundo Paula-Lopes e Hansen (2002b), o efeito deletério do choque térmico em células embrionárias depende da magnitude do choque térmico e do estágio de desenvolvimento. A apoptose é um fenômeno adquirido que ocorre em embriões expostos a temperatura elevada e pode ser prevenida pela indução de termotolerância. Neste estudo, a fase de clivagem embrionária no D-3 apresentou diferença entre as estações. Assim, segundo Paula-Lopes e Hansen (2002b), o choque térmico no estágio de 2-4 célula provoca uma maior redução no número de células embrionárias apoptóticas do que o choque térmico em fases posteriores de cultivo *in vitro*.

Mais estudos avaliando outros índices de desenvolvimento, bem como os efeitos das estações seca e chuvosa deverão adicionar subsídios sobre as implicações da apoptose induzida por estresse térmico ambiental na sobrevivência embrionária da espécie caprina.

CONCLUSÃO

Nas condições observadas neste estudo, os resultados permitem concluir que não houve influência das estações seca e chuvosa na capacidade de desenvolvimento de oócitos e na produção *in vitro* de embriões na espécie caprina.

AGRADECIMENTOS

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

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.

BADINGA, L. THATCHER, W. W.; DIAZ, T.; DROST, M.; WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v.39, n.4, p.797-810, 1993.

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.

BYRNE, A. T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D. R.; LEESE, H. J. 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. Universidade Federal de Minas Ferais.

CHIAMENTI, A. Adição de retinóides e de fator de crescimento IGF-I aos meios de maturação de oócitos e de desenvolvimento *in vitro* de embriões caprinos. 132p. 2007.

Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* e *in vitro* chez la bebris e la chèvre. **Produção Animal**, v.15, p.199-207, 2002.

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 and 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.; HOWELL, J. L.; MONTERROSO, V. H.; ARE´CHIGA, C. F.; HANSEN, P. J. 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.; ANDRADE, M. L. L; CAJAZEIRAS, J. B.; LUZ J. V. Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no nordeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 (Supl. 3), p.781-786, 2007.

FUSE, T.; YOON, K-W.; KATO, T.; YAMADA, K. Heat-induced apoptosis in human glioblastoma cell line A172. **Neurosurgery**, v.42, p.843–849, 1998.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, 2005, Goiânia, GO. *Anais...* Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. CD-ROM.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. 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.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; COCERO, M. J.; GARCIAGARCIA, R. M.; INSKEEP, E. K.; LOPEZ SEBASTIAN, A.; McNEILLY, A. S.; SANTIAGO MORENO, J., SOUZA, C. J.; VEIGA LOPEZ, A. 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.

HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; STEENWEG, W. N. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.11-20, 2000.

INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/html/prev_climatica_tempo/prognostico>. Acesso em: 23 de abril de 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.

KIM, K. S.; MITSUMIZO, N.; FUJITA, K.; UTSUMI, K. The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.45, n.4, p.787-799, 1996.

MALAYER, J. R.; HANSEN, P. J, BUHI, W. C. Effect of day of oestrus cycle, side of the reproductive tract and heat shock on *in vitro* protein secretion by bovine endometrium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.84, p.567-578, 1988.

MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v.8, p.57-68, 2000.

MATSUMOTO, H.; TAKAHASHI, A.; WANG, X.; OHNISHI, K.; OHNISHI, T. Transfection of *p53*-knockout mouse fibroblasts with wild type *p53* increases thermosensitivity and apoptosis induced by heat stress. **International Journal Radioactive Oncology**, v.39, p.197-203, 1997.

OZAWA, M.; TABAYASHI, D.; LATIEF, T. A.; SHIMIZU, T.; OSHIMA, I.; KANAI, Y. 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.1, p.195-209, 1988.

ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEL, J. D.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. 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.

ROMAN-PONCE, H.; THATCHER, W. W.; CATON, D.; BARRON, D. H.; WILCOX, C. J. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.46, p.175-180, 1978.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. 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. 264p.

TOMPKINS, E. C.; HEIDENRICH, C. J.; STB, M. Effect of post-breeding thermal stress on embryonic mortality of swine. **Journal of Animal Science**, v.26, p.377-380, 1967.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82, Suppl.: E63-74, 2004.

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.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L.; SAVIO, J. D.; MEIDAN, R.; LEW, B. J.; BRAW-TAL, R; BERMAN, A. 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.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. 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.

YDOYAGA, D. F. Caracterização da caatinga, consumo e desempenho de novilhas das raças Guzerá e Girolando, suplementadas durante o período chuvoso, em Serra Talhada – PE. 90p. 2006. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) – Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal Rural de Pernambuco.