

INFLUÊNCIA DAS ESTAÇÕES SECA E CHUVOSA NA CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DA ESPÉCIE CAPRINA

RICARDO DE MACÊDO CHAVES¹, EDIVALDO ROSAS DOS SANTOS JUNIOR², JAIRO PEREIRA NEVES³
MARCELO TIGRE MOURA⁴, JOSÉ CARLOS FERREIRA DA SILVA⁴, PAULO FERNANDES DE LIMA⁴, MARCOS
ANTÔNIO LEMOS DE OLIVEIRA⁴

¹Laboratório de Reprodução Animal - Universidade Estadual do Maranhão, São Luis - MA, Brasil.

rmchaves@hotmail.com

²Laboratório de Reprodução - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada - PE, Brasil.

³Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Nacional de Brasília. Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF, Brasil.

⁴Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos s/n, Recife - PE, Brasil.

RESUMO

Objetivou-se com este estudo determinar a influência das estações seca e chuvosa na maturação de oócitos e produção *in vitro* (PIV) de embriões na 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, nas quais os CCOs foram submetidos à maturação, fertilização e cultivo *in vitro* dos embriões. A média e desvio padrão da taxa de clivagem foi determinada no dia 3 (D-3) e dos embriões 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 quantidade de blastômeros foi determinada com o corante DAPI e os blastômeros positivos para apoptose por meio do teste de TUNEL. A produção de embriões no D-3 e mórulas foram inferiores ao obtido no período chuvoso ($P < 0,05$). Não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) quanto às fases de maturação, fertilização, cultivo no D-4 e blastocisto. Os embriões produzidos na estação seca apresentaram maior incidência de apoptose ($P < 0,05$). Nas condições descritas neste estudo, os resultados permitem concluir que as fases iniciais do desenvolvimento embrionário sofrem maior impacto negativo durante a estação seca em protocolos de PIV na espécie caprina.

PALAVRAS-CHAVE: Apoptose; complexos *cumulus oophorus*; FIV; desenvolvimento oocitário; teste TUNEL.

INFLUENCE OF DRY AND RAINY SEASONS ON OOCYTE MATURATION AND *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION IN GOATS

ABSTRACT

This study aimed to determine the influence of dry and rainy seasons on oocyte maturation and *in vitro* production (IVP) of embryos in goats. The ovaries of does in dry (October to March) and rainy season (April-

September) were collected at 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. We used 12 replicates, in which the COCs were submitted to maturation, fertilization and *in vitro* culture. The cleavage rate was determined on day 3 (D-3) and embryos that developed to 8-16 cells (D-4), morulae (D-5) and blastocyst (D-8) stages after fertilization. The number of blastomeres was assessed with DAPI staining, and the determination of apoptotic blastomeres was performed by TUNEL assay. In the dry season, D-3 embryos and

morulae development was lower than that obtained in the rainy season ($P < 0.05$). However, no differences ($P > 0.05$) were observed on oocyte maturation, fertilization, D-4 embryo yield and blastocyst development. Embryos produced during the dry season had a higher incidence of apoptosis on D-3 and at the morulae stage ($P < 0.05$). Under the conditions described in this study, the results suggest that the early stages of embryonic development suffer greater negative impact during the dry season in IVP protocols in goats.

KEYWORDS: Apoptosis; *cumulus oophorus* complexes; IVF; oocyte development; TUNEL test.

INTRODUÇÃO

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

De acordo com FONSECA (2005), estima-se um crescimento da ordem de cinco 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, a infertilidade causada 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 (WOLFENSON et al., 1995), a secreção hormonal (ROTH et al., 2000), a função do endométrio (MALAYER et al., 1988), o fluxo sanguíneo para o útero (FERRO et al., 2010) e a capacidade de desenvolvimento do oócito (AL-KATANANI et al., 2002) e do embrião (EALY et al., 1993).

O efeito deletério multifatorial causado pelo estresse térmico compromete a fertilidade em ovinos (OZAWA et al., 2005), suínos (WENTZ et al., 2001), coelhos (WOLFENSON & BLUM, 1988) e bovinos (EDWARDS & HANSEN, 1997; ROCHA et al., 2012). O embrião bovino no período de pré-implantação tem sido o foco de estudos visando elucidar problemas reprodutivos associados 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 & HANSEN, 2004). Morfológicamente, 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).

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

Devido à 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 mestiças com idade variando de 12 a 46 meses, adquiridas na região do semiárido 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 glicose, 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 recuperados e classificados quanto a qualidade conforme GONÇALVES et al. (2007). Os oócitos foram lavados (três vezes) no meio MC, em seguida foram colocados em grupos de 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 µg/mL de sulfato de gentamicina, 20 µg/mL de FSH/LH (Pluset®) e 1 mg/mL de álcool polivinílico. Imediatamente depois, os oócitos foram colocados em estufa a 39° C, com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante 24 horas.

Após 24 horas de maturação, os oócitos foram submetidos ao processo de fecundação *in vitro*, utilizando-se sêmen fresco, conforme LIMA et al. (2006). Cuidadosamente, 0,1 mL de sêmen foi depositado em tubos cônicos de centrifuga contendo 1,5 mL de meio definido modificado (mDM), de acordo com KESKINTEPE et al. (1998), o qual foi constituído de 125 mg de glicose, 155,2 mg de bicarbonato de sódio, 6,9 mg de piruvato de sódio, 50,0 mg de álcool polivinílico, 50,0 mg de cafeína e 50 µg/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 mL da porção superior de cada tubo foram aspirados e centrifugados a 350 G por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, 200 µL do meio mDM contendo 10 µg/mL de heparina foi acrescentado a 200 µL do pellet resultante da centrifugação.

Antes da exposição aos espermatozoides, os

oócitos foram avaliados quanto à morfologia e somente aqueles que apresentaram boa expansão das células do *cumulus* foram lavados em mDM. Posteriormente, 25 oócitos foram transferidos para as gotas de 100 µL do mesmo meio sob óleo de parafina esterilizada, local onde foi depositada a suspensão espermática na concentração final de 2 x 10⁶ espermatozoides/mL. Os gametas foram incubados em condições idênticas as de maturação durante o período de 18 horas.

Os zigotos foram mecanicamente desnudados no agitador mecânico Vortex® em meio *Synthetic oviduct fluid* modificado (SOFm) durante dois minutos a velocidade “7” (escala 1-10), e 25 estruturas foram transferidas para as gotas de 100 µL 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 CO₂, 5% O₂ e 90% N₂.

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 média e desvio padrão da taxa de clivagem foi determinada no dia 3 (D-3) e dos embriões 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 fragmentação de DNA característica de apoptose foi analisada com o ensaio denominado *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL). Nesse ensaio, o grupo 3'-OH do DNA fragmentado foi marcado com fluoresceína (FITC) por meio da reação enzimática mediada pela enzima deoxinucleotidil transferase (Tdt), a qual catalisa a polimerização de nucleotídeos modificados no terminal 3'-OH (ROTH & HANSEN, 2004).

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* (DPBS) 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 DPBS-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 4',6-

diamidino-2-phenyindole dihydrochloride (DAPI) por 15 minutos, lavadas em gotas de 100 μL de DPBS-PVP. A identificação de embriões positivos para apoptose e a morfologia nuclear embrionária foi realizada com auxílio de um microscópio de fluorescência, com aumento de 1000x por meio da contagem total de células por blastocisto com o corante DAPI e da determinação de blastômeros positivos para apoptose. Essas técnicas foram conduzidas de acordo com aquelas utilizadas por PAULA-LOPES & HANSEN (2002ab), bem como por ROTH & HANSEN (2004).

Foi realizada análise de variância pelo método dos quadrados mínimos utilizando-se o procedimento PROC GLM (para variáveis fixas) e PROC MIXED (para variáveis fixas e aleatórias) do pacote estatístico SAS (SAS, 1986). Os dados foram previamente avaliados quanto às premissas para análise de variância (homogeneidade das variáveis e normalidade dos resíduos). As variáveis dependentes e independentes foram estabelecidas de acordo com o delineamento de cada etapa do experimento. Os modelos estatísticos usados incluíram os efeitos principais e todas as possíveis interações.

RESULTADOS

Tabela 1: Média e desvio padrão dos oócitos recuperados, maturados *in vitro* (MIV) e fertilizados *in vitro* (FIV) da espécie caprina 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 ($\bar{x} \pm s$)
Oócitos recuperados	105,75 \pm 6,53	108,25 \pm 8,03
Maturação <i>in vitro</i> (24h)	53,18 \pm 6,25	54,16 \pm 6,76
Fertilização <i>in vitro</i> (18h)	28,41 \pm 3,75	29,75 \pm 3,84

Letras minúsculas nas linhas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). \bar{x} = média; s = desvio padrão.

Tabela 2: Média e desvio padrão da taxa de desenvolvimento de embriões cultivados *in vitro* (CIV), clivados (D-3), (D-4), mórula (D-5) e blastocistos (D-8) 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 \pm 1,02 ^a	25,41 \pm 1,44 ^b
Embrião CIV (D-4)	22,25 \pm 1,28	22,75 \pm 1,21
Mórula (D-5)	20,75 \pm 1,28 ^a	21,33 \pm 1,43 ^b
Blastocisto (D-8)	6,91 \pm 0,79	6,33 \pm 0,88

Letras minúsculas nas linhas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). \bar{x} = média; s = desvio padrão.

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 à média dos oócitos maturados e fertilização *in vitro*, também não houve diferença ($P > 0,05$) em função da estação do ano, mantendo-se as mesmas condições entre os grupos estudados nas estações seca e chuvosa (Tabela 1).

Durante o processo de produção *in vitro*, 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 comparadas 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).

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

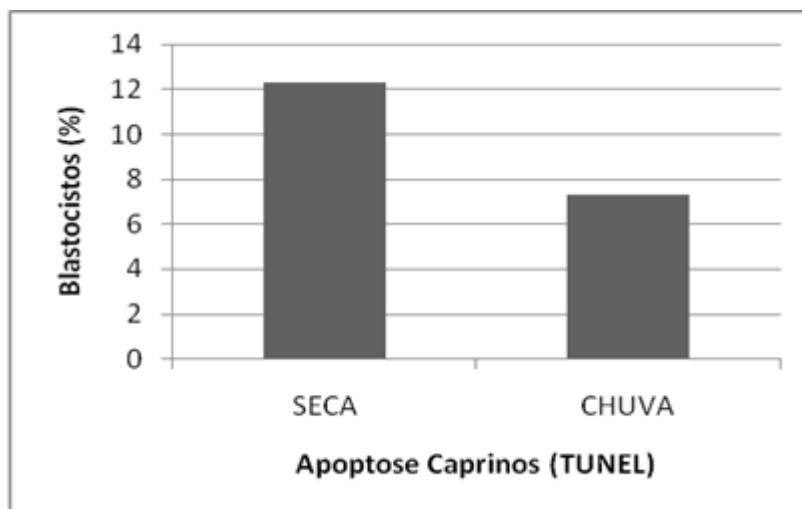


Figura 1: Porcentagem de blastocistos caprinos que apresentou resultado positivo para a apoptose. Avaliação da fragmentação do DNA por meio do teste de TUNEL utilizando as soluções de paraformaldeído e de *Phosphate-Buffered Saline + Polivinilpirrolidona*. Letras desiguais nas diferentes colunas significa diferença ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Utilizando-se 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 próximos aos encontrados neste experimento nas estações seca e chuvosa. COGNIÉ & 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* na espécie caprina. Esses resultados são superiores aos obtidos neste experimento em ambas as estações. CHIAMENTI et al. (2010), pesquisando a adição de retinol e ácido retinóico ao meio de maturação e retinóides associados 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 importantes que tornam essas estruturas mais susceptíveis aos efeitos deletérios do estresse térmico calórico quando comparada àquelas derivadas de oócitos maturados *in vivo* (KIM et al., 1996). AL-KATANANI et al. (2002) afirmaram que isso ocorre 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 *in vitro*, principalmente quando o embrião está submetido a estresse térmico calórico (PAULA-LOPES & HANSEN, 2002b).

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 em volume e qualidade de alimento para os animais criados na caatinga (YDOYAGA et al., 2010).

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 viabilidade e maturação 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 deve-se, provavelmente, 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 devida a essa capacidade do animal de utilizar suas reservas, apesar da menor disponibilidade de pastagem (GONZALES-BULNES et al., 2004).

Quanto à 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 acarretar apoptose (MATWEE et al., 2000), poucos estudos têm avaliado o papel do estresse na indução da apoptose em embriões (PAULA-LOPES & HANSEN, 2002a).

As altas temperaturas ambientais podem produzir um estresse térmico celular associado a perdas embrionárias *in vitro* (JU et al., 1999), podendo induzir apoptose, conforme determinado por reação do teste de TUNEL (PAULA-LOPES & HANSEN, 2002a). Neste estudo, possivelmente devido às temperaturas ambientais encontradas e à reconhecida resistência da espécie caprina às adversidades do ambiente, apenas 7,24% a 12,28% dos blastômeros nas estações seca e chuvosa, respectivamente, 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 (JU et al., 1999; PAULA-LOPES & HANSEN, 2002b).

A exposição dos embriões em um ambiente adverso na pré-implantação pode aumentar o número de células apoptóticas (PAULA-LOPES & HANSEN, 2002a). Segundo PAULA-LOPES & 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 à 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 & HANSEN (2002b) e BROKER et al. (2005), o choque térmico no estágio de 2-4 célula resulta em um maior 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 as fases iniciais do cultivo e desenvolvimento embrionário sofrem maior impacto negativo durante a estação seca em protocolos de PIV na espécie caprina.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FACEPE e à Empresa Suimax pelo suporte para execução deste projeto.

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 of Dairy Science**, v.85, p.390-396, 2002.
- 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.
- CHIAMENTI, A.; AGUIAR FILHO, C. R.; FREITAS NETO, L. M.; CHAVES, R. M.; PAULA-LOPES, F.; LIMA, P. F.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L. Effects of retinoids on the *in vitro* development of Capra Hircus embryos to blastocysts in two different culture systems. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p. 68-72, 2010.
- 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. **Productions Animales**, v.15, p.199-207, 2002.
- EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2899-2905, 1993.
- 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.
- FERRO, F. R. A.; CAVALCANTI NETO, C. C.; TOLEDO FILHO, M. R.; FERRI, S. T. S.; MONTALDO, Y. C. Efeito do estresse calórico no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. **Revista Verde**, v.5, n.5, p.01-25 (Numero Especial), 2010.
- FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral

- e superovulação em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.16, p.1-9, 2005.
- 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.
- GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.
- GONZALES-BULNES, A.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; COCERO, M. J.; GARCIA GARCIA, 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/prog_nostico>. Acesso em: 23 de abril de 2009.
- 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.
- 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.
- LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M.A.L.; SANTOS, M. H. B.; REICHENBACH, H-D.; WEPPERT, M.; PAULA-LOPES, F.; CAVALCANTI NETO, C.C.; GONÇALVES, P. B. D. Effect of retinoids and growth factor on *in vitro* bovine embryos produced under chemically defined conditions. **Animal Reproduction Science**, v.95 p.184-192, 2006.
- 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.
- 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.
- MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v.8, p.57-68, 2000.
- 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.
- ROCHA, D. R.; SALLES, M. G. F.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.1, p.18-24, jan./mar. 2012.
- 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.
- 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.
- SAS. **User's Guide**. SAS Inst., Cary: SAS, NC.1986.
- 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.
- WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P.; BRANDT, G.; HECK, A.; BENNEMANN, P. E.; GUIDONI, A. L.; UEMOTO, D. A. A hipertermia durante o estro pode afetar o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas. **Ciência Rural**, vol.31, no.4, p.102-109, 2001.
- 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.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; FERREIRA, M. A.; SANTOS, D. C.; MELLO, A. C. L. Consumo de matéria seca e desempenho de novilhas das raças Girolando e Guzerá sob suplementação na caatinga, na época chuvosa, em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.10, p.2148-2154, 2010.

Protocolado em: 29 mar. 2010. Aceito em 12 dez. 2012.