

**RAFAELA SANCHEZ DE LIMA**

**O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre  
os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no  
estádio de vesícula germinativa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação do Instituto de Biociências de  
Botucatu, Universidade Estadual Paulista-  
UNESP para obtenção do título de mestre em  
Ciências Biológicas, Área Farmacologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabíola Freitas de Paula Lopes

Botucatu- SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Lima, Rafaela Sanchez.

O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa / Rafaela Sanchez de Lima. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fabíola Freitas de Paula Lopes

Capes: 21001006

1. Bovino - Reprodução. 2. Oogênese. 3. Apoptose.

Palavras-chave: Apoptose; Choque térmico; IGF-I; Oócito; Vesícula germinativa

O caminho foi longo...

E eu só posso dedicar às pessoas que mais me ajudaram e incentivaram...

Aos meus pais

Aos meus irmãos e ao meu cunhado

À minha avó

À todos verdadeiros amigos

...pelos ensinamentos, paciência e orações...

## AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento vai ao Senhor do Bonfim, principal responsável pelo milagre do bloqueio meiótico.

Ao Instituto de Biociência da UNESP- Botucatu.

À Universidade de São Paulo e Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia aonde o trabalho foi realizado.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização desse trabalho.

À minha orientadora Profa. Fabíola que me ensinou a ter dúvidas, questionar e correr atrás das respostas. Me ensinou o que é fazer pesquisa. Foi além de orientadora, foi amiga e algumas vezes até “psicóloga”.

Aos meus familiares, em especial meus pais Sandra e Fernando, meus irmãos Raquel e Renato, meu cunhado Cesinha, minha avó Nysséa. Obrigada por todo carinhoso, apoio e atenção!

À minha tia Fidela, minha principal inspiração para vida científica. Exemplo de pessoa. Obrigada por todo apoio!

Às amigas Juliana e Silvia que me agüentaram nesses últimos anos dividindo o mesmo teto, chorando e rindo juntas. Todos nossos esforços um dia irão valer muito a pena...

À Camilla e à Flávia que me socorreram milhares e milhares de vezes quando os problemas apareciam. Obrigada por todos os conhecimentos compartilhados e por toda a atenção.

Aos “amigos de fluxo” Pedro, Jéssica, Everton, Mariana Teixeira, Thais Teixeira, Adriano e Samir, pelos dias agradáveis de trabalho, por todo respeito e carinho. Nesses dois anos de trabalho juntos conheci o grande valor de cada um de vocês. Pessoas muito especiais...

Ao grande amigo Pedro, obrigada por toda paciência e pelos milhares de ensinamentos. Sou grata a toda e qualquer ajuda que você tenha dado, desde o início quando eu não sabia nem trabalhar em um fluxo até o momento atual com a dissertação. Obrigada pelas madrugadas mal dormidas para fazer FIV ou trocar placas de estufa, pelas inúmeras vezes que você saiu da “balada” e foi direto ao laboratório para me ajudar, pelos cochilos no carro esperando dar o horário da FIV, pelos milhares de desentendimentos (afim, se tudo fosse perfeito perderia a graça),

pelos almoços, jantares, baladas, compras, mudanças, etc..etc... Perdi as contas de quantas coisas boas vivemos....

Ao amigo Everton o meu muito obrigada! Por todas as ajudas na FIV, pela paciência, pelas conversas, conselhos, bebedeiras, baladas. Quando eu iria em um rock'n roll se não fosse com você? "Costumamos dizer que amigos de verdade são os que estão ao seu lado em momentos difíceis... Mas não! Amigos verdadeiros são os que suportam a tua felicidade! Padre Fábio de Mello"

Ao amigo Robinson, sempre muito atencioso, dedicado e prestativo. Obrigada por todas as ajudas e pelos conselhos. Acho que você tem razão, "príncipes encantando" não existem...

Às amigas de laboratório Fernanda, Júlia e Mariana Giassetti pela conversa amiga, pelos ensinamentos e por todas as ajudas.

À amiga Thaís que, além de toda a amizade e carinho, também contribuiu com a estatística do experimento.

Ao amigo Zeca por todo o apoio, todos os conselhos, todas as risadas e piadas.

Aos amigos que já deixaram o laboratório Paulo, Mariana Groke e Renata. Rê obrigada por toda paciência. Pelas inúmeras vezes que corri para pedir sua ajuda e você sempre disponível e paciente. Aprendi muito com você!

Aos alunos e ex alunos de iniciação científica, Erika Maria, Giana, Mariana Queiroz, Letícia, Alexandre, Juliana, Debora, obrigada por tudo!

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da USP em especial aos professores José Antônio Visintin e Mayra Elena Ortiz pelos ensinamentos, pela amizade criada e pelo laboratório no qual o experimento foi realizado.

Aos funcionários do VRA Harumi, Thais, Roberta, Miguel, Jocimar, D. Silvia, D. Sandra, Irailton, Belau e Luis pela ajuda e colaboração. D. Silvia estamos rezando muito e com certeza logo a senhora estará de volta aos corredores do VRA distribuindo aquele sorriso e aquele "Bom dia!" inesquecível. Fé em Deus!

Ao abatedouro Angeneli pelo fornecimento dos ovários utilizados nos experimentos e aos seus funcionários Sr. João, Patrícia e Marcos.

Às amigas de graduação Fernanda (Bistekinha), Gabrielle (Leiga), Carla (Xifruda) e Camila (Jud). Obrigada por todo apoio.

À amiga Raquel (Xuba) e toda sua família pelo apoio na fase mais difícil de mudança e adaptação em São Paulo. Por me tratarem como membro da família. Minha eterna gratidão...

Às amigas Tatícia (Burra), Funguet e Kyoto por me hospedarem durante todas as disciplinas em Botucatu. Com vocês eu podia me sentir em casa e sou muito grata pela ajuda.

À Janahi, a Rafaela e ao Eduardo pela amizade, pelas informações referentes a pós-graduação, pela ajuda com entrega de papéis e prazos. Desculpem todo e qualquer transtorno.

Ao Paulo Adona que me ajudou muito no desenvolvimento do meio para bloqueio meiótico. Obrigada por toda ajuda!

Ao Prof. Mário Binelli que ajudou muito com as estatísticas. Obrigada por todos os testes e conselhos!

À todos que contribuíram de forma direta e indiretamente para realização desse trabalho.

Obrigada a todos!!!

**“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”**

**“A vida é um palco de teatro que não admite ensaios. Por isso, cante, chore, ria, antes que as cortinas se fechem e o espetáculo termine sem aplausos.”**

Charles Chaplin

## RESUMO

LIMA, R. S. **O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa.** [The role of insulin-like growth factor-I on germinal vesicle oocytes exposed to heat shock]. 2012. 137 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

O estresse térmico materno compromete a fertilidade de vacas leiteiras. Os oócitos nas fases de vesícula germinativa (VG) e maturação são susceptíveis aos efeitos deletérios causados pelo estresse térmico, entretanto os mecanismos celulares desencadeados pela temperatura elevada são pouco conhecidos. Os danos celulares induzidos pelo estresse térmico podem ser manipulados por amplo espectro de fatores biológicos, incluindo o fator de crescimento semelhante à insulina- I (IGF-I). Dessa forma, os objetivos gerais desta proposta foram caracterizar as alterações celulares e de desenvolvimento induzidas pela temperatura elevada em oócitos na fase de VG e avaliar o papel termoprotetor do IGF-I neste contexto. Para tanto, os experimentos 1 e 2 visaram estabelecer o modelo de bloqueio meiótico *in vitro*. No primeiro experimento foram avaliadas concentrações crescentes (50; 75; 100; 150 e 200  $\mu\text{M}$ ) do bloqueador meiótico roscovitina. A porcentagem de oócitos em VG (taxa de bloqueio meiótico) foi baixa em todas as doses de roscovitina testadas. No segundo experimento foram avaliadas diferentes concentrações de butirolactona (0; 12,5; 25; 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) em meio de inibição meiótica contendo 0 ou 3 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) na porcentagem de oócitos em VG e na porcentagem de oócitos em metáfase II (taxa de reversão do bloqueio meiótico após a maturação *in vitro*). A eficiência do bloqueio meiótico foi alta para todas as doses de butirolactona avaliadas, exceto 12,5  $\mu\text{M}$  de butirolactona com BSA. De maneira similar, a porcentagem de oócitos em MII foi alta para todos os tratamentos, exceto para dose de 100  $\mu\text{M}$  de butirolactona sem BSA, indicando possível efeito tóxico desta concentração. Com base nestes resultados o modelo de inibição meiótica utilizado para todos os demais experimentos fez uso de 12,5  $\mu\text{M}$  de butirolactona na ausência de BSA. O experimento 3 avaliou o efeito de diversas concentrações de IGF-I (0; 12,5; 25; 50 e 100 ng/ml) na fragmentação de DNA induzida pelo choque térmico em oócitos bovinos no estágio de VG. Na ausência de

IGF-I, o choque térmico de 41°C por 14 horas aumentou a incidência de oócitos TUNEL-positivo. As concentrações de 12,5 e 25 ng/ml de IGF-I tenderam a diminuir a porcentagem de oócitos TUNEL-positivo induzida pela temperatura elevada. O choque térmico também diminuiu a porcentagem de oócitos em MII após 10 horas de maturação, independente do IGF-I. Os experimentos 4 e 5 visaram determinar o efeito de 0; 12,5 e 100 ng/ml de IGF-I na atividade de enzimas caspases do grupo II e na competência de oócitos bovinos no estágio de VG submetidos ao choque térmico. A exposição de oócitos bovinos ao choque térmico e ao IGF-I não alterou a porcentagem de oócitos com alta atividade de caspases. No entanto, o choque térmico reduziu as taxas de clivagem e blastocisto. A adição de 12,5 ng/ml de IGF-I reverteu os efeitos deletérios causados pelo choque térmico no desenvolvimento a blastocisto. O choque térmico e a adição de IGF-I no meio de cultivo de oócitos VG não alteraram a porcentagem de blastômeros TUNEL-positivo e nem o número total de blastômeros por blastocisto. O experimento 6 visou determinar o efeito de 0 e 12,5 ng/ml de IGF-I na atividade mitocondrial de oócitos bovinos no estágio de VG submetidos ao choque térmico. O choque térmico diminuiu a atividade mitocondrial quando comparado ao controle. A dose de 12,5 ng/ml de IGF-I reverteu os efeitos negativos causados pelo choque térmico na atividade mitocondrial. Este trabalho permite concluir que a exposição de oócitos bovinos no estágio de VG ao choque térmico 41°C por 14 horas altera a função do oócito VG: reduz a atividade mitocondrial, desencadeia a cascata de apoptose possivelmente por via caspase-independente e reduz a competência de desenvolvimento do oócito. Em concentrações fisiológicas o IGF-I reverteu os efeitos negativos causados pelo choque térmico no oócito VG.

Palavras-chave: Apoptose. Choque térmico. IGF-I. Oócito. Vesícula germinativa.

## ABSTRACT

LIMA, R. S. **The role of insulin-like growth factor-I on germinal vesicle oocytes exposed to heat shock.** [O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa.] 2012. 137 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

Maternal heat stress compromises fertility of lactating dairy cows. Germinal vesicle stage (GV) and mature oocytes are susceptible to deleterious effects of maternal heat stress. However, the cellular mechanisms triggered by elevated temperature are not well known. The cellular damage induced by heat stress can be manipulated by a wide range of biological factors, such as insulin-like growth factor-I (IGF-I). Therefore, overall objectives of this proposal were to characterize cellular and developmental changes induced by elevated temperature on GV oocytes and evaluate the role of IGF-I in this context. Experiments 1 and 2 aimed to establish an *in vitro* meiotic arrest model. The first study evaluated the effect of increasing concentrations (50, 75, 100, 150 and 200  $\mu\text{M}$ ) of the meiotic inhibitor roscovitine. The percentage of GV oocytes (rate of meiotic arrest) was low at all roscovitine doses tested. In the second experiment different butyrolactone concentrations (0, 12.5, 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$ ) were evaluated in meiotic inhibition medium containing 0 or 3 mg/mL bovine serum albumin (BSA) in percentage of GV oocytes and percentage of metaphase II oocytes (rate of meiotic arrest reversibly after *in vitro* maturation). Meiotic arrest efficiency was high for all butyrolactone doses tested, except 12.5  $\mu\text{M}$  butyrolactone with BSA. Similarly, the percentage of MII oocytes was high for all doses, except for 100  $\mu\text{M}$  butyrolactone without BSA, indicating a possible toxic effect of this concentration. Based on these results the meiotic arrest model used for all subsequent experiments used 12.5  $\mu\text{M}$  butyrolactone in the absence of BSA. The third experiment evaluated the effect of various IGF-I concentrations (0, 12.5, 25, 50 and 100 ng/ml) on heat-induced DNA fragmentation on GV oocyte. In the absence of IGF-I, heat shock of 41°C for 14 hours increased the incidence of TUNEL-positive oocytes. The concentrations of 12.5 and 25 ng/ml IGF-I tended to decrease the percentage of heat-induced TUNEL-positive oocytes. Heat shock also decreased the

percentage of MI oocytes after 10 hour maturation, regardless of IGF-I. Experiments 4 and 5 aimed to determine the effects of 0, 12.5 and 100 ng/ml IGF-I on group II caspase activity and developmental competence of bovine GV oocytes subjected to heat shock. Exposure of bovine oocytes to heat shock and IGF-I did not affect the percentage of oocytes with high caspase activity. However, heat shock reduced cleavage and blastocyst rates. Addition of 12.5 ng/ml IGF-I reversed the detrimental effects of heat shock on blastocyst development. Heat shock and IGF-I did not affect the percentage of TUNEL-positive blastomeres and total blastocyst cell number. The objective of experiment 6 was to determine the effect of 0 and 12.5 ng/ml IGF-I on mitochondrial activity of bovine GV oocytes subjected to heat shock. Heat shock decreased mitochondrial activity as compared to control. The concentration of 12.5 ng/ml IGF-I reversed the negative effects induced by heat shock on mitochondrial activity. In conclusion, exposure of bovine GV oocytes to heat shock at 41°C for 14 hours altered GV oocyte function: decreased mitochondrial activity, triggered apoptotic cascade possibly by caspase-independent mechanisms and decreased oocyte developmental competence. Physiological IGF-I concentrations reversed negative effects caused by heat shock on GV oocytes.

Key words: Apoptosis. Heat shock. IGF-I. Oocyte. Germinal vesicle.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo da via intrínscica de ativação da apoptose.....	57
Figura 2: Imagem representativa obtida com microscopia de fluorescência ilustrando o oócito bovino em VG corado com Hoechst 33342. A seta indica o DNA.....	74
Figura 3: Efeito de diferentes concentrações do inibidor meiótico roscovitina por 14 horas na porcentagem de oócitos em VG. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.....	75
Figura 4: Imagem representativa obtida com microscopia de contraste de fase ilustrando o oócito bovino no estágio de VG submetido à coloração com lacmóide.....	76
Figura 5: Efeito do inibidor meiótico butirolactona por 14 horas na porcentagem de oócitos em VG corados com lacmóide. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.....	77
Figura 6: Imagem representativa obtida com microscopia de fluorescência ilustrando o oócito bovino em MII corado com Hoechst 33342. A seta indica o DNA e * o corpúsculo polar.....	78
Figura 7: Reversão meiótica (porcentagem de MII) após 14 horas de incubação com o inibidor butirolactona seguido de 24 horas de MIV. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.....	78
Figura 8: Imagens representativas de oócitos (A) TUNEL-positivo e (B) TUNEL-negativo obtidas com microscopia de fluorescência. A seta indica marcação positiva para TUNEL.....	80
Figura 9: Efeito do choque térmico e do IGF-I na porcentagem de oócitos positivos para TUNEL após 14 horas de bloqueio e 10 horas de maturação. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.....	80

- Figura 10: Imagem representativa de oócito bovinos em MI obtida com microscopia de fluorescência. A seta indica o DNA da placa metafásica..... 81
- Figura 11: Efeito do choque térmico na porcentagem de oócitos em MI. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM..... 82
- Figura 12: Efeito do choque térmico e do IGF-I na porcentagem de oócitos em MI. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM..... 82
- Figura 13: Imagens representativas de oócitos VG com alta (A) e baixa (B) atividade de caspases do grupo II obtidas com microscopia de fluorescência..... 83
- Figura 14: Efeito do choque térmico e do IGF-I na porcentagem de oócitos com alta atividade de caspases do grupo II. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas..... 84
- Figura 15: Efeito do choque térmico na porcentagem de clivagem de oócitos bovinos no estágio de VG. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM..... 85
- Figura 16: Efeito do choque térmico e do IGF-I na porcentagem de clivagem de oócitos bovinos no estágio de VG. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM..... 85
- Figura 17: Efeito do choque térmico e do IGF-I em oócitos VG submetidos a MIV, FIV e CIV na porcentagem de blastocistos D8. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM..... 86
- Figura 18: Efeito do choque térmico e do IGF-I em oócitos VG submetidos a MIV, FIV e CIV na porcentagem de blastocistos expandidos D8. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença

significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	87
Figura 19: Efeito do choque térmico e do IGF-I em oócitos VG submetidos a MIV, FIV e CIV na porcentagem de blastocistos D9. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	88
Figura 20: Efeito do choque térmico e do IGF-I em oócitos VG submetidos a MIV, FIV e CIV na porcentagem de blastocistos eclodidos D9. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são medianas.....	89
Figura 21: Efeito do choque térmico e do IGF-I em relação ao número total de blastômeros por embrião. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	90
Figura 22: Efeito do choque térmico e do IGF-I em relação a porcentagem de embriões TUNEL-positivo. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	90
Figura 23: Efeito do choque térmico e do IGF-I na atividade mitocondrial. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.....	91
Figura 24: Imagens representativas de oócitos VG submetidos ao ensaio de mitotracker red obtidas com microscopia de fluorescência. Oócitos tratados com 0 ng/ml IGF-I a 38,5°C (A), 12,5 ng/ml IGF-I a 38,5°C (B), 0 ng/ml de IGF-I a 41°C (C) e 12,5 ng/ml IGF-I a 41°C (D).....	92

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Membros da subfamília da família das caspases.....	56
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>dUTP</b>	<i>2-deoxiuridina-5-trifosfato</i>
<b>DMAP</b>	6 – Dimetilaminoporina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BSA</b>	Albumina sérica Bovina
<b>PVA</b>	Álcool polivinílico
<b>AI</b>	Anáfase I
<b>OPU</b>	Aspiração folicular via transvaginal
<b>CCO</b>	Complexo cumulus-oócitos
<b>CIV</b>	Cultivo <i>in vitro</i>
<b>DNase</b>	Desoxirribonuclease
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Médium</i>
<b>Tdt</b>	Enzima deoxinucleotídeo transferase
<b>S1P</b>	Esfingosina – 1-fosfato
<b>IGF-I</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina-I
<b>IGF-II</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina-II
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>AIF</b>	Fator indutor de apoptose
<b>MPF</b>	Fator promotor da fase M
<b>FIV</b>	Fecundação <i>in vitro</i>
<b>G</b>	Grama
<b>H</b>	Hora
<b>GH</b>	Hormônio de crescimento
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante

<b>GHRH</b>	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>FITC</b>	Isoticianato de Fluresceína
<b>MCI</b>	Massa celular interna
<b>MIV</b>	Maturação <i>in vitro</i>
<b>MB</b>	Meio de Bloqueio
<b>COM</b>	Meio de coleta de oócitos
<b>MIM</b>	Meio de inibição meiótica
<b>MI</b>	Metáfase I
<b>MII</b>	Metáfase II
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>MI</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Min</b>	Minuto
<b>AMPc</b>	Monofosfato de adenosina cíclico
<b>Ng</b>	Nanograma
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>KSOM</b>	<i>Potassium simplex optimized médium</i>
<b>PMM</b>	Potencial de membrana mitocondrial
<b>APAF-1</b>	Protease associada à apoptose
<b>IAP</b>	Proteína inibidora de apoptose
<b>IGFBP</b>	Proteína ligadora de fator de crescimento semelhante a insulina
<b>PAPP-A</b>	Proteína plasmática associada à gestação – A
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativadora de mitose
<b>CDK</b>	Proteína quinase dependente de ciclina
<b>AKT</b>	Proteína quinase serina/treonina
<b>IGF-IR</b>	Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina-I
<b>IGF-IIR</b>	Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina-II
<b>ROI</b>	“Região in interesse”
<b>S6K</b>	S6 quinase
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>IRS</b>	Substrato do receptor de insulina

<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>TOR</b>	<i>Target of rapamicina</i>
<b>TI</b>	Telófase I
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
<b>TCM-199</b>	<i>Tissue Culture Medium- 199</i>
<b>TALP</b>	<i>Tyrode's albumin-lactate-pyruvate</i>
<b>UR</b>	Umidade relativa
<b>VG</b>	Vesícula germinativa

**LISTA DE SÍMBOLOS**

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$>$	Maior que
$\pm$	Mais ou menos
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada
$<$	Menor que
<b>U</b>	Unidades
$\mu$	Micro
$\%$	Porcentagem
$\text{\text{€}}$	Euro
<b>M</b>	Molar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>28</b>
2.1 ESTRESSE TÉRMICO.....	28
2.1.1 Efeito do estresse térmico na qualidade e competência oocitária.....	30
2.1.2 Alterações celulares causadas pelo choque térmico na função oocitária .....	33
2.1.2.1 Alterações na maturação nuclear .....	33
2.1.2.2 Alterações na maturação citoplasmática .....	34
2.2 GAMETOGÊNESE FEMININA.....	35
2.2.1 Organização estrutural do oócitos em VG.....	38
2.2.1.1 Citoesqueleto .....	38
2.2.1.2 Organelas .....	40
2.2.1.2.1 Mitocôndrias.....	40
2.3 BLOQUEIO DA MEIOSE.....	42
2.4 IGF-I.....	47
2.4.1 Efeito do IGF-I na maturação oocitária e no cultivo embrionário .....	50
2.4.2 Efeito do IGF-I em oócitos e embriões expostos ao estresse térmico .	52
2.5 APOPTOSE .....	54
<b>3 HIPÓTESES E OBJETIVOS .....</b>	<b>60</b>
3.1 HIPÓTESES.....	60
3.2 OBJETIVOS .....	60
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>62</b>
4.1 COLETA DE OVÁRIOS E OÓCITOS.....	62
4.2 BLOQUEIO DA MEIOSE COM ROSCOVITINA.....	62
4.3 BLOQUEIO DA MEIOSE COM BUTIROLACTONA .....	63
4.4 DILUIÇÃO DO IGF-I .....	63
4.5 COLORAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE OÓCITOS EM VG- LACMÓIDE.....	63

4.6	COLORAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁIO MEIÓTICO-HOECHST 33342 .....	64
4.7	ENSAIO DE TUNEL.....	64
4.8	ENSAIO DE ATIVIDADE DE ENZIMAS CASPASES DO GRUPO II .....	65
4.9	ENSAIO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL .....	66
4.10	MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	67
4.11	FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	67
4.12	CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	67
4.13	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	68
4.13.1	Experimento 1: Modelo de inibição meiótica - roscovitina.....	68
4.13.2	Experimento 2: Modelo de inibição meiótica – butirolactona.....	68
4.13.3	Experimento 3: Efeito do IGF-I na fragmentação de DNA induzida pelo choque térmico em oócitos bovino no estágio de VG .....	69
4.13.4	Experimento 4: Efeito do IGF-I na atividade de enzimas caspases do grupo II em oócitos bovinos no estágio de VG expostos ao choque térmico..	69
4.13.5	Experimento 5: Efeito do IGF-I na competência de oócitos bovinos no estágio de VG expostos ao choque térmico .....	70
4.13.6	Experimento 6: Efeito do IGF-I na atividade mitocondrial de oócitos bovinos no estágio de VG expostos ao choque térmico .....	71
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>74</b>
5.1	EXPERIMENTO 1: MODELO DE INIBIÇÃO MEIÓTICA- ROSCOVITINA	74
5.2	EXPERIMENTO 2: MODELO DE INIBIÇÃO MEIÓTICA BUTIROLACTONA .....	75
5.3	EXPERIMENTO 3: EFEITO DO IGF-I NA FRAGMENTAÇÃO DE DNA INDUZIDA PELO CHOQUE TÉRMICO EM OÓCITOS BOVINOS NO ESTÁDIO DE VG.....	79
5.4	EXPERIMENTO 4: EFEITO DO IGF-I NA ATIVIDADE DE ENZIMAS CASPASES DO GRUPO II EM OÓCITOS BOVINOS NO ESTÁDIO DE VG EXPOSTOS AO CHOQUE TÉRMICO.....	83
5.5	EXPERIMENTO 5: EFEITO DO IGF-I NA COMPETÊNCIA DE OÓCITOS BOVINOS NO ESTÁDIO DE VG EXPOSTOS AO CHOQUE TÉRMICO .....	84

5.6 EXPERIMENTO 6: EFEITO DO IGF-I NA ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE OÓCITOS BOVINOS NO ESTÁDIO DE VG EXPOSTOS AO CHOQUE TÉRMICO .....	91
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>129</b>



## **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 pelo aparecimento de problemas relacionados ao aquecimento global e ao crescimento da população. Além disso,  $\frac{3}{4}$  da população mundial está distribuída fora da zona temperada, em áreas onde a temperatura ambiente frequentemente ultrapassa os 38°C, temperatura acima da zona de conforto tanto para humanos como para a maioria dos animais. Nestas regiões a adaptação climática é difícil mesmo para o animal mais produtivo. 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 Lasley, 1985).

O Brasil é o sexto produtor mundial de leite bovino (ANUALPEC, 2007). Entretanto, por apresentar clima tropical e subtropical está vulnerável aos efeitos sazonais sobre a eficiência reprodutiva em vacas leiteiras (West, 2003). A exposição de vacas lactantes à temperatura e umidade elevadas causa aumento da temperatura corporal interna, resultando em estresse térmico e diminuição dos índices de gestação. A baixa fertilidade causada pelo estresse térmico está associada a alterações no padrão de secreção hormonal (De Rensis e Scaramuzzi, 2003), no crescimento folicular (Badinga et al., 1993), na capacidade de desenvolvimento do oócito (Rocha et al., 1998; Al-Katanani et al., 2002; Ju et al., 2005) e do embrião (Putney et al., 1988, Ealy et al., 1993).

Apesar do estresse térmico em vacas em lactação ser um fator de grande impacto econômico na indústria de leite em regiões de clima quente, são poucas as estratégias disponíveis a fim de contornar este problema. As modificações no

manejo, como o uso de ventiladores e aspersão de água, permitem apenas uma melhora parcial na eficiência reprodutiva do rebanho além de resultar em alto custo para propriedade (Hansen et al., 2001). Dessa forma, o desenvolvimento de alternativas visando contornar os efeitos negativos da temperatura e umidade elevada na reprodução de gado de leite é de suma importância para o melhor aproveitamento da capacidade produtiva deste setor no país.

A susceptibilidade de oócitos bovinos à temperatura elevada pode ser constatada tanto durante a fase de vesícula germinativa (VG) como durante o período de maturação oocitária. O oócito bovino no estágio de VG permanece no folículo antral por 42 dias (Lussier et al., 1974) e durante este longo período o animal exposto ao estresse térmico ambiental pode sofrer oscilações de temperatura corporal acima de 40-41°C (Ealy et al., 1993) comprometendo a função oocitária antes da maturação. Conseqüentemente torna-se imprescindível determinar os efeitos deletérios do estresse térmico em oócitos na fase de VG.

Uma alternativa a fim de reverter o efeito deletério do choque térmico na função oocitária seria o uso de fatores de crescimento/sobrevivência, tais como, o fator de crescimento semelhante à insulina- I (IGF-I). RNAm para receptores de IGF-I estão expressos em oócitos e células do cumulus (Yoshida et al., 1998; Nuttinck et al., 2004) sugerindo a importância deste fator de crescimento na função oocitária. Estudos *in vitro* demonstraram o papel benéfico do IGF-I em embriões expostos ao choque térmico. Em bovinos, a adição de 100 ng/ml de IGF-I durante o cultivo de embriões expostos ao choque térmico resgatou o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Jousan e Hansen, 2004). É possível que o IGF-I exerça um papel termoprotetor em oócitos VG expostos à temperatura elevada, reduzindo

danos celulares como a morte celular e promovendo o desenvolvimento embrionário pré-implantacional.

Não obstante à óbvia importância dos mecanismos desencadeados pela temperatura elevada, pouco se sabe sobre os eventos celulares ativados pelo choque térmico em oócitos bovinos, bem como os mecanismos de sobrevivência celular em resposta ao choque. Os conhecimentos destes mecanismos bem como a identificação de fatores de termotolerância celular possibilitarão o desenvolvimento de estratégias aplicadas à sobrevivência celular frente aos vários tipos de estresses, minimizando efeitos deletérios. Com base nestas evidências os objetivos gerais desta proposta são caracterizar as alterações celulares e de desenvolvimento induzidas pela temperatura elevada em oócitos bovinos no estágio de VG e avaliar o papel termoprotetor do IGF-I em oócitos bovinos submetidos ao choque térmico.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTRESSE TÉRMICO

O estresse térmico pode ser definido como o aumento na quantidade de calor corporal e suas consequências fisiológicas, metabólicas, celulares e moleculares. Sendo o calor corporal, uma função da quantidade de calor produzido pelo animal e da quantidade de calor trocado com o ambiente (Armstrong, 1994). Os bovinos são animais homeotérmicos que regulam a temperatura corporal interna pelo balanço entre a quantidade de calor metabólico e a dissipação de calor para o ambiente, a fim de manter a temperatura corporal constante (Hansen, 2004). A zona de conforto térmico para bovinos varia entre -13°C e +25°C. Dentro deste intervalo de temperatura o conforto animal é ótimo e a temperatura retal está em torno 38,4°C e 39,1°C (Lefebvre e Plamondon, 2003). Acima de 25°C a vaca sofre de estresse térmico.

Nesta revisão será utilizada a terminologia previamente descrita por Hansen et al. (2001) onde o aumento da temperatura *in vivo* é chamado de estresse térmico e o aumento da temperatura *in vitro* é chamado de choque térmico.

A exposição de vacas lactantes à temperatura e umidade elevadas causa aumento da temperatura corporal interna, resultando em estresse térmico e diminuição dos índices de gestação. Vários estudos demonstraram que a fertilidade do gado leiteiro é drasticamente reduzida quando há aumento na temperatura ambiental (Dunlap e Vicent, 1971; Badinga et al., 1985; Al-Katanani et al., 1999; Pires et al., 2002). Dunlap e Vicent (1971) relataram que o aumento da temperatura retal de novilhas hereford de 38,5°C para 40°C, 72 h após a inseminação artificial, diminuiu a taxa de gestação de 48 para 0%. Em outro estudo realizado na Flórida - Estados Unidos, as taxas de concepção de vacas Pardo Suíço, Jersey e Holandesas em lactação também diminuíram de 52 para 32% quando a temperatura máxima do ar aumentou de 23,9°C para 32,2°C no verão (Badinga et al., 1985). Al-Katanani et al. (1999) relataram que a taxa de não retorno ao cio 90 dias após a inseminação foi mais baixa quando a temperatura foi maior que 20°C no dia -10 (dia 0= estro), no dia do estro e no dia +10. Demonstrando que o estresse térmico antes, depois e no dia da inseminação é associado com uma menor taxa de não retorno ao cio 90 dias da

inseminação. No Brasil, vacas Holandesas, confinadas em *free stall*, tiveram uma queda na taxa de gestação de 71,2% no inverno para 45,7% no verão (Pires et al., 2002).

A seleção genética de vacas Holandesas visando a alta produção de leite está associada ao aumento na quantidade de calor metabólico (Berman et al., 1985; Martello et al., 2004), de maneira que a magnitude dos efeitos deletérios causados pelo estresse térmico na fertilidade animal é mais acentuado em animais de alta produção de leite (Al-Katanani et al., 1999). West (2003) revisou que vacas em lactação produzem uma grande quantidade de calor metabólico e, adicionalmente, acumulam calor de energia radiante. Este incremento calórico associado com a capacidade de resfriamento comprometida por causa das condições ambientais (alta temperatura e umidade) faz com que a temperatura corporal se eleve, diminua o consumo de alimentos e o desempenho produtiva e reprodutivo.

Apesar do estresse térmico em vacas em lactação ser um fator de grande impacto econômico na indústria leiteira em regiões de clima quente com perdas financeiras de até 422 €/vaca (St-Pierre et al., 2003), são poucas as estratégias disponíveis a fim de contornar este problema. O uso de aspersores de água e ventiladores são as estratégias mais usadas para aliviar os efeitos do estresse térmico nesses animais. Apesar de essas ferramentas reduzirem a temperatura corporal e aumentarem a produção de leite, os seus efeitos na fertilidade durante o verão são limitados (Hansen, 2004). Dessa forma, o desenvolvimento de alternativas visando contornar os efeitos negativos da temperatura e umidade elevada na reprodução de gado leiteiro é de suma importância para o melhor aproveitamento da capacidade produtiva deste setor nessas regiões de clima quente.

A baixa fertilidade causada pelo estresse térmico é um problema de ordem multifatorial, pois afeta as funções fisiológicas e celulares em vários tecidos. No que diz respeito à função reprodutiva, já foi demonstrado que o estresse térmico compromete o desenvolvimento e a função folicular, a secreção hormonal (Badinga et al., 1993; Wilson et al., 1998; Roth et al., 2000) a capacidade de desenvolvimento do oócito (Rocha et al., 1998; Al-Katanani et al., 2002; Ju et al., 2005) e o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (Putney et al., 1988; Ealy et al., 1993).

### 2.1.1 Efeito do estresse térmico na qualidade e competência oocitária

Os efeitos da temperatura elevada na função oocitária já foram demonstrados em estudos conduzidos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Alta temperatura e umidade ambiental durante o verão resultam em declínio na qualidade e no número de oócitos obtido de vacas holandesas (Rocha et al., 1998; Al-Katanani et al., 2002; Gendelman et al., 2010; Ferreira et al., 2011). Em estudo pioneiro Putney et al. (1989) demonstraram que quando novilhas Holandesas foram submetidas ao estresse térmico em câmara climática de 42°C por 10 h entre o estro e inseminação artificial (últimos estádios de maturação do oócito) houve diminuição do número de embriões normais quando comparados ao grupo controle (24°C).

O efeito deletério do estresse térmico na função oocitária já foi bem caracterizado em estudos sazonais. Nestes experimentos o número de folículos, oócitos e a proporção de partenotos que clivaram até o estágio de 2 ou 4 células foi mais alta para os oócitos coletados na estação fria quando comparados a estação quente (Gendelman et al., 2010). Rocha et al. (1998) conduziram experimento em que vacas *Bos taurus* (Holandesas) e *Bos indicus* (Brahman) superovuladas foram submetidas a aspiração folicular simples durante a estação quente e a estação fria. Todos os oócitos recuperados foram submetidos à maturação, fecundação e cultivo *in vitro* independente da morfologia. As vacas *Bos taurus* apresentaram uma menor porcentagem de oócitos normais na estação quente (24,5%) em relação a estação fria (80%), uma menor porcentagem de oócitos fertilizados que atingiram o estágio de 8 células e nenhum embrião chegou a mórula ou blastocisto. Para vacas *Bos indicus* não foi visto diferença na porcentagem de oócitos normais ou no desenvolvimento embrionário pré-implantacional entre as estações. Os oócitos de morfologia anormal aspirados de vacas *Bos taurus* na estação quente exibiam um ooplasma escuro degenerado, cavidade oolêmica incompletamente preenchida e células do cumulus dispersas. Nos animais *Bos indicus* os oócitos anormais tinham poucas ou nenhuma célula do cumulus mas um ooplasma normal.

Recentemente um estudo sazonal realizado no Brasil dividiu animais da raça Holandesa em categorias: novilhas, vacas repetidoras de cio (animais subférteis sem qualquer alteração anatômica ou infecção, que não emprenham até o terceiro serviço ou mais) e vacas em pico de lactação. Neste estudo foi observada uma

queda no número de oócitos recuperados por aspiração folicular no verão em todas as categorias. Houve também queda na taxa de blastocisto em todas as categorias e na porcentagem de blastômeros TUNEL-positivo apenas nas vacas repetidoras de cio durante o verão. As altas temperaturas também causaram queda no número total de blastômeros em todas as categorias. Esse experimento demonstrou a maior susceptibilidade das vacas repetidoras de cio ao efeito negativo e sazonal do verão (Ferreira, et. al., 2011).

Al-Katanani et al. (2002) conduziram estudo objetivando avaliar os efeitos da variação sazonal na competência de oócitos de vacas Holandesas e se o resfriamento desses animais por 42 dias (tempo necessário para um folículo crescer do estágio antral até o período pré-ovulatório) antes da coleta do oócito amenizaria os efeitos deletérios causados pelo estresse térmico do verão. O uso de sistema de resfriamento com aspersores de água e ventiladores, 42 dias antes da coleta do oócito de vacas Holandesas durante o verão, não aumentou a proporção de oócitos que desenvolveram para o estágio de blastocisto (Al-Katanani et al., 2002). No entanto, a temperatura retal dos animais submetidos ao sistema de resfriamento durante o verão da Flórida não foi diferente do grupo controle (sombra). Isso sugere que ou o sistema de resfriamento não foi eficiente ou os oócitos já estavam comprometidos antes mesmo do período de coleta.

Já foi demonstrado que o efeito sazonal do estresse térmico do verão se prolonga até o outono subsequente (Badinga et al., 1985; Roth et al., 2001) sugerindo efeito cumulativo ou tardio do estresse térmico na função reprodutiva. Roth et al. (2001) realizaram estudo visando caracterizar o efeito tardio do estresse térmico e minimizar os danos causados na função oocitária pela remoção dos folículos danificados no verão anterior. Para isso, vacas Holandesas foram submetidas ao estresse térmico sazonal (verão) e foi realizada aspiração folicular via transvaginal (OPU) durante os meses frios do outono subsequente. Nesse estudo os animais foram distribuídos no grupo tratado (OPU dias 4, 7, 11 e 15 do ciclo) e controle (OPU no dia 4 do ciclo). Os oócitos coletados por OPU no dia 4 foram avaliados morfológica e ativados partenogeneticamente. O número de oócitos grau 1 aumentou no ciclo 2 para o grupo tratado enquanto esse aumento só foi observado no ciclo 3 para o grupo controle. No grupo tratado houve um aumento na taxa de clivagem e no número de embriões em todas as fases do desenvolvimento nos ciclos 3 e 4, enquanto esse aumento não foi observado no grupo controle (Roth

et al., 2001). Torres-Júnior et al. (2008), avaliaram os efeitos imediatos e tardios do estresse térmico em câmara climática em animais da raça Gir (*Bos indicus*). Esses animais foram expostos ao estresse térmico de 38°C e 80% de umidade relativa (UR) durante o dia e 30°C e 80% UR durante a noite por 28 dias. Foram realizadas OPUs semanais e os oócitos submetidos a produção *in vitro* de embriões durante o período de estresse térmico (efeito imediato) e por aproximadamente 4 meses após o final do tratamento de estresse térmico (efeito tardio). A exposição de animais da raça Gir ao estresse térmico não causou efeitos imediatos (primeiros 28 dias) na função reprodutiva, porém foi observada uma redução na proporção de embriões que atingiram o estágio de blastocisto e blastocisto expandido quando os oócitos foram coletados após o período de estresse (Torres-Júnior et al., 2008).

Os efeitos da temperatura elevada na função oocitária também podem ser vistos durante o choque térmico e podem afetar o sucesso das técnicas de produção de embriões *in vitro*. Roth e Hansen (2004 (a) (b) demonstraram que a exposição de oócitos a temperaturas amenas (40°C e 41°C) durante as primeiras 12 h de maturação *in vitro* (MIV), reduziu a taxa de clivagem no dia 3 e o número de oócitos que atingiu o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação *in vitro* (FIV). Entretanto, o choque térmico moderado de 40,5°C e 41,5°C quando aplicado por um curto período de tempo (30 e 60 minutos) na maturação oocitária não levou a uma diminuição na taxa de clivagem e formação de blastocisto. Quando oócitos foram expostos ao choque térmico severo de 43°C por 45 e 60 minutos durante a MIV houve uma redução na taxa de blastocisto e blastocisto expandido (Ju et al., 1999).

Os oócitos de mamíferos estão bloqueados no diplóteno da prófase I e adquirem competência de desenvolvimento meiótico e potencial para serem fecundados de uma forma gradual durante o desenvolvimento folicular. Após retirada do oócito do folículo antral ou após a ovulação, ocorre a progressão espontânea do mesmo até o estágio de metáfase II (MII) (Pincus e Enzmann, 1935; Hyttel et al., 1986). Esse processo é denominado de maturação nuclear. Os oócitos em vesícula germinativa (VG) permanecem no folículo antral por aproximadamente 42 dias, e durante esse período podem ser expostos às flutuações diárias de temperatura corporal acima de 41°C. Em 2004, Payton et al. realizou estudo com o objetivo de avaliar os efeitos diretos da temperatura elevada em oócitos VG. Para tanto os oócitos foram cultivados na presença de um inibidor p34<sup>cdc2</sup>/cyclin B quinase (roscovitina- 50 µM). Quando o choque térmico *in vitro* foi aplicado a oócitos em VG

por 6 e 12 h, foi observada uma redução no desenvolvimento embrionário até os estádios de 8 a 16 células e blastocistos, respectivamente. A exposição desses oócitos em VG a 41°C por 12h também reduziu a proporção de oócitos que progrediram até MII após a MIV. Isso comprova que a susceptibilidade de oócitos bovinos aos efeitos diretos da temperatura elevada pode ser constatada tanto durante a fase de VG como durante o período de maturação oocitária.

Essa diminuição da competência e qualidade oocitária vistas em oócitos expostos ao estresse térmico estão relacionadas a alterações celulares tais como diminuição da maturação nuclear, apoptose (Roth e Hansen, 2004; 2005) e desorganização do citoesqueleto (Ju et al., 2005; Roth e Hansen, 2005).

## 2.1.2 Alterações celulares causadas pelo choque térmico na função oocitária

### 2.1.2.1 Alterações na maturação nuclear

O bloqueio da progressão meiótica até o estágio de MII é uma das alterações nucleares causadas pelo choque térmico em oócitos bovinos. Quando o choque térmico de 41°C, por 6 e 12 h, foi aplicado em oócitos VG (Payton et al., 2004) ou durante a MIV (Lenz et al., 1983; Roth e Hansen, 2005, Paula-Lopes et al., 2008) ocorreu diminuição da proporção de oócitos que progrediram para MII depois da MIV. Oócitos que sofreram choque térmico foram bloqueados na metáfase I (MI).

Edwards et al. (2005) encontraram resultados contrastantes em que o cultivo de (complexo cumulus-oócitos) CCOs a 41°C não reduziu a taxa de oócitos em MII, acelerando, porém, a cinética da maturação nuclear. Nesse estudo, a exposição de oócitos a temperatura elevada aumentou a proporção de oócitos em MII após 16-18 h de maturação quando comparado a 21 h no grupo não estressado. Os autores sugeriram, que nessas condições de choque térmico, a fertilização quando realizada 5 h mais cedo (com 19 h de MIV) poderia atenuar os efeitos deletérios do choque térmico sobre o desenvolvimento do oócito.

Outra alteração nuclear observada em oócitos submetidos ao choque térmico é a fragmentação de DNA característica de apoptose. O choque térmico de 41°C durante as primeiras 12 h de MIV aumentou a proporção de oócitos TUNEL-positivo (Roth e Hansen 2004; 2005; Ispada et al., 2011) e a proporção de oócitos com alta

atividade de enzimas caspases do grupo II (caspases 2, 3 e 7) após o choque térmico (Roth e Hansen, 2004 (a)).

Experimentos realizados com oócitos de animais majoritariamente *Bos indicus* indicou que a exposição de oócitos ao choque térmico moderado (41°C) durante as primeiras 12 h de maturação reduziu a competência oocitária sem aumentar a proporção de oócitos em estádios avançados de apoptose determinado por alterações na permeabilidade da membrana plasmática. O choque térmico moderado durante a MIV reduziu a maturação nuclear, taxa de clivagem e taxa de blastocisto. Quando oócitos foram expostos ao choque térmico severo (44°C) por 12 h a redução na maturação nuclear foi similar a observada no choque térmico moderado de 41°C, porém foi observado aumento na proporção de oócitos marcados para apoptose por alterações de permeabilização da membrana plasmática, aumento na proporção de oócitos positivo para necrose e bloqueio na clivagem e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Paula-Lopes et al., 2008).

O aumento da fragmentação de DNA (TUNEL-positivo) induzida pelo choque térmico em oócitos bovinos durante a maturação pode ser controlada pela suplementação do meio de MIV com o inibidor de caspases z-DEVD-fmk (Roth e Hansen, 2004 (a)), esfingosina-1-fosfato (S1P) (Roth e Hansen, 2005) ou IGF-I (Ispada et al., 2010).

#### 2.1.2.2 Alterações na maturação citoplasmática

Entre as alterações citoplasmáticas induzidas pelo aumento da temperatura durante a maturação oocitária destacam-se as alterações no citoesqueleto (Tseng et al., 2004; Ju e Tseng, 2004; Ju et al., 2005; Roth e Hansen, 2005). Já foi demonstrado que o choque térmico altera a estrutura organizada dos microtúbulos do oócito. Em consequência, o fuso meiótico torna-se disforme na MI e MII e os cromossomos desalinhados (Tseng et al., 2004; Roth e Hansen, 2005). Nesses cromossomos o eixo da largura foi menor que o do comprimento, o tamanho foi reduzido e foram considerados como morfologicamente anormais (Tseng et al., 2004; Tseng et al., 2006). Foi observada também uma diminuição do tamanho do fuso quando a duração do choque térmico de 42°C aumentou de 1 para 4 h (Ju et

al., 2005). Após 4h de choque térmico a 41,5°C a maioria dos oócitos apresentou a cromatina altamente condensada ou desaparecimento completo da cromatina (Tseng et al., 2004; Tseng et al, 2006). As mudanças no tamanho e na morfologia indicaram que o choque térmico afeta a polimerização e despolimerização de microtúbulos do fuso meiótico. O choque térmico desencadeia a agregação da cromatina que parece ser correlacionado com a despolimerização dos microtúbulos do fuso. As alterações nos microtúbulos do fuso provavelmente contribuem para segregação incorreta dos cromossomos durante a fertilização e clivagem embrionária (Tseng et al.,2004; Ju et al., 2005).

O anel de actina pericelular e a actina tanzonal também foram afetados pelo choque térmico. Esses foram diminuídos nos oócitos maturados a 41°C (Roth e Hansen, 2005) e 41,5° C (Tseng et al., 2004). Os microfilamentos de actina são responsáveis pela translocação dos grânulos corticais para o oolema depois da maturação (Wessel et al., 2002). Oócitos na fase de VG possuem grânulos agregados (tipo I), sendo que com a quebra da VG ocorre a dispersão com a translocação desses para o oolema (tipo III). A exposição de oócitos a um choque térmico de 41°C por 12 ou 24 h aumentou a quantidade de oócitos que apresentavam grânulos corticais tipo III sugerindo que o choque térmico acelerou a maturação citoplasmática (Edwards et al., 2005). Entretanto, em oócitos de camundongos a porcentagem de oócitos com migração incompleta dos grânulos corticais após a MIV foi significativamente maior em oócitos maturados a 40°C do que a 37°C (Wang et al., 2009). O choque térmico aplicado em oócitos bovinos na fase de VG também foi responsável por alterações no citoesqueleto. Quando o choque térmico de 41°C foi aplicado durante 12 h a oócitos na fase de VG foi observado aumento na proporção de oócitos que apresentaram grânulos corticais tipo III antes da MIV (Payton et al., 2004).

## 2.2 GAMETOGÊNESE FEMININA

A oogênese em ruminantes consiste na formação e na diferenciação das células germinativas primordiais até a formação do oócito haplóide fecundado (Rüsse, 1983).

O desenvolvimento dos oócitos e folículos de mamíferos tem início durante a vida fetal. A oogênese começa com a formação das células germinativas primordiais, cuja origem é extragonadal, sendo oriundas da porção caudal da linha primitiva, provenientes das células tronco embrionárias (Wassarman e Albertini, 1994). Com a formação dos cordões sexuais, aos trinta dias de gestação nos bovinos, as células germinativas migram para a crista genital juntamente com as células somáticas. A interação entre as células da granulosa e o gameta é de fundamental importância para o desenvolvimento do oócito (Cain et al., 1995). As células germinativas proliferam por mitose e transformam-se em oogônias, as quais apresentam um citoplasma claro, devido a pouca quantidade de organelas e uma alta frequência de divisão mitótica, chegando a 2.700.000 oogônias no dia 110 de gestação (Erickson, 1966). Em bovinos, 60 dias pós-concepção inicia-se uma intensa atividade mitótica oogonial que se encerra próximo ao dia 150, quando o número de células germinativas disponíveis é fixado. Uma vez formadas, as oogônias entram em meiose e diferenciam-se em oócitos (Hirshfield, 1991). Os oócitos progridem até a primeira prófase meiótica entre 75 e 80 dias pós-concepção (Erickson, 1966) e, nos folículos primordiais, formam um estoque finito de oócitos, que permanecem quiescentes até que sejam estimulados a crescer (Erickson, 1966)

A prófase é composta por vários estágios transitórios: preleptoteno, leptoteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, no qual a primeira divisão meiótica é bloqueada. Cada estágio é caracterizado por uma configuração de DNA particular (Baker e Franchi, 1967). A fim de estudar a sequência cronológica da quebra da vesícula germinativa, Motlik (1978), usou a classificação anteriormente utilizada por Motlik e Fulka (1976) em estudo com oócitos suínos. A técnica utilizada considera mudanças na membrana nuclear, na cromatina e nucléolos e é dividida em 4 grupos. A organização típica de oócitos de suínos em VG designado VG I não foi observado em nenhum oócito de bovinos. No começo do cultivo, a maioria dos oócitos encontrava-se em VG II que foi caracterizado por uma distinta membrana nuclear, nucleoplasma granular fino com alguns cromocentros alinhados a membrana nuclear ou concentrados em uma área da VG. Após 3 h de cultivo, 64% dos oócitos apresentavam-se na forma de VG III caracterizado por cromocentro remanescente, com os primeiros filamentos de cromatina finos. Quatro horas após o início do cultivo, 46,6% dos oócitos encontravam-se em VG IV, nesses os cromocentros tinham desaparecido mas filamentos bivalentes simples podiam ser vistos. Depois

de 5 h de cultivo, a fase típica foi VG IV (59,7%) com uma membrana nuclear menos distinta e bivalentes condensados. A quebra da vesícula germinativa foi completa em 30,4% dos oócitos depois de 5 h de cultivo e em 92,5% depois de 6 h (Motlik et al., 1978).

Os oócitos competentes devem atingir um diâmetro mínimo antes de ser capaz de retomar a meiose. Em bovinos, 75.9% e 80.7% dos oócitos com diâmetro de 110-120  $\mu\text{m}$  e  $>120 \mu\text{m}$ , respectivamente, atingem MII após 24 h de MIV, embora apenas 21,2% dos oócitos  $< 100 \mu\text{m}$  atinjam MII. Esses resultados demonstram que para ser competente o oócito deve atingir pelo menos 110  $\mu\text{m}$  em diâmetro (Fair et al., 1995).

À medida que o oócito aumenta em diâmetro modificações adicionais, proliferação e redistribuição de organelas citoplasmáticas ocorrem (Fair, 2003). As principais modificações observadas durante a fase de desenvolvimento do oócito são a formação dos *gap junctions* entre o oócito e suas células somáticas circundantes, desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi, do retículo endoplasmático liso, e das gotas lipídicas para a periferia do oócito, formação dos grânulos corticais e da zona pelúcida, diferenciação da mitocôndria, quebra dos centríolos, deposição ou síntese dos RNAm maternos (Fair et al., 1996; Hyttel et al., 1997). As *gap junctions* são formadas por associação íntima entre o oócito e as células da granulosa e são necessárias para a aquisição da competência meiótica (Canipari et al., 1984). Cerca de 9-12 h após o pico de LH há uma desconexão das projeções das células do cumulus com o oolema (Hyttel et al., 1986).

As células foliculares produzem fatores que inibem a retomada da meiose. *In vitro*, a retirada do oócito do seu ambiente folicular priva o mesmo de fatores inibidores fazendo com que retomem a meiose espontaneamente (Pincus e Enzmann, 1935). *In vivo*, entretanto, a maturação do oócito se dá após o pico de LH (Hyttel et al., 1986). A progressão do ciclo celular do oócito de prófase I até MII é marcada por uma série de transformações bioquímicas e estruturais no núcleo e no citoplasma do oócito. Esses eventos caracterizam a maturação oocitária (Hyttel et al., 1986; De Sousa et al., 2004).

O oócito recomeça seu ciclo celular progredindo da prófase da primeira meiose (prófase I) até metáfase da segunda divisão meiótica (MII), passando por (metáfase I) MI, anáfase I (AI), telófase I (TI). Antes que o oócito progrida para MI, há a condensação dos cromossomos e rompimento da membrana nuclear (quebra

da vesícula germinativa) (Meinecke et al., 2001). *In vitro*, após retirada do folículo mais de 97% dos oócitos encontram-se em VG, sendo que com 17 h apenas 2,2% permanecem em VG e 42,2% e 48,9% progrediram para MI ou estão entre AI e TI, respectivamente. Após 18 h, 17,8% dos oócitos já chegaram em MII e com 24 h de cultivo 80,4% chegam em MII e apenas 3,9% foram bloqueados em MI (Meinecke et al., 2001). Esses resultados foram similares aos encontrados por Sirard et al. (1989), em que oócitos em VG foram encontrados desde a retirada do folículo até 6,6 h, a quebra da vesícula se deu entre 6,6 e 8 h, MI entre 10,3 e 15,4 h, AI entre 15,4 e 16,6 h, TI entre 16,6 e 18 h e MII entre 18 e 24 h.

## 2.2.1 Organização estrutural do oócito em VG

### 2.2.1.1 Citoesqueleto

O citoesqueleto das células eucarióticas é constituído de filamentos proteicos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Os microtúbulos são bastões ocos, firmes e reforçados, que suportam a tensão e compressão de estímulos externos, sendo de grande vantagem no suporte de processos celulares assimétricos e no transporte em via dupla, gerado pelas proteínas motoras dineína e cinesina. Os filamentos de actina são menos rígidos, de maneira que eles devem ser unidos em feixes para aguentar forças de compressão ou permitir processos assimétricos. A forma da célula é determinada pela capacidade dos filamentos de actina e dos microtúbulos de resistir à deformação mecânica e de transmitir forças (De Robertis e Hib, 2001). Os microtúbulos e filamentos de actina são os principais componentes do citoesqueleto e importantes moduladores do movimento dos cromossomos, da formação do fuso meiótico e da divisão celular nos oócitos de mamíferos. Na transição do ciclo celular durante a maturação ocorre uma intensa reorganização destas estruturas do citoesqueleto (Kubiak et al., 1992; Kim et al., 2000; Calarco, 2005).

Os microtúbulos são dinâmicos polímeros homólogos  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina (Zhou et al., 2002). Em oócitos de camundongos, duas populações discretas de centrossomos ou centros organizadores de microtúbulos foram observadas: uma no pólo do fuso meiótico e outra no citoplasma (Messinger e Albertini, 1991). Durante a

maturação meiótica, essas duas discretas populações de centrossomos coordenadamente regulam a polimerização e despolimerização dos microtúbulos para eventos nucleares e citoplasmáticos, como a quebra da vesícula germinativa, a condensação dos cromossomos, a extrusão do corpúsculo polar e formação da estrutura da placa metafásica.

Já foi demonstrado que em oócitos no estágio de VG os microtúbulos encontram-se dispersos não possuindo estrutura organizada específica no citoplasma. Após a quebra da vesícula germinativa, no entanto, pequenos ásteres de microtúbulos foram inicialmente localizados próximo a cromatina condensada. Em seguida estes ásteres tornaram-se alongados e foram localizados em associação com cada cromossomo durante a prometáfase. Na MI, os microtúbulos foram localizados circundando os fusos enquanto na AI e TI, os microtúbulos foram vistos entre os fusos bem organizados. Em oócitos em MII, microtúbulos foram observados no segundo fuso meiótico, e em um menor grau no corpúsculo polar (Kim et al., 2000).

Os microfilamentos fornecem a estrutura para a divisão celular, sendo responsáveis por manter o fuso meiótico e os cromossomos na posição periférica e pela extrusão do corpúsculo polar durante a maturação e a fertilização (Webb et al., 1986).

Na fase de VG, os microfilamentos encontram-se no córtex do oócito e em volta da vesícula germinativa. Depois da quebra da vesícula, os microfilamentos parecem estar concentrados perto da cromatina. Na MI, a cromatina esta localizada no córtex rico em microfilamentos. Durante a AI e a TI, um suco de microfilamento foi observado entre os dois conjuntos de cromatina, indicando o papel dos microfilamentos na extrusão do corpúsculo polar. Depois da extrusão do corpúsculo polar os microfilamentos foram observados envolvendo a cromatina e o corpúsculo polar (Kim et al., 2000).

Condições inadequadas durante a maturação e fecundação *in vitro* possivelmente prejudicam a função das organelas citoplasmáticas, incluindo microtúbulos e microfilamentos que resulta em anormalidades após a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (Sun et al., 2004 ).

## 2.2.1.2 Organelas

### 2.2.1.2.1 Mitocôndrias

Em todos os eucariotos, as mitocôndrias são organelas especializadas que catalizam a formação de adenosina trifosfato (ATP) pelo metabolismo de carboidratos e ácidos graxos contidos no citoplasma da célula ou no meio externo. A taxa de respiração celular depende de dois fatores principais. O primeiro fator é a eficiência de conversão no citoplasma do oócito de precursores metabólicos como glicose em piruvato (Alberts, 1983). O segundo fator é a eficiência da matriz mitocondrial na conversão de piruvato em ATP, necessário para vários processos celulares no desenvolvimento oocitário e embrionário, incluindo maturação nuclear e divisão celular (Bigger et al., 1967).

A ativação de determinadas vias metabólicas envolvidas na síntese e fosforilação protéica é indispensável para a maturação citoplasmática. Nesse contexto a mitocôndria tem um papel de extrema importância por ser um componente chave na maquinaria metabólica responsável pelo suprimento de energia necessário para a maturação (Van Blerkom et al., 1995) e competência para desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Tarazona et al., 2006).

Durante o desenvolvimento do oócito, o número de mitocôndrias varia de aproximadamente 10 nas células germinativas primordiais pré-migratória e atinge 200 na fase de oogônia. Oócitos primários contêm aproximadamente 6000 mitocôndrias e durante a maturação citoplasmática o número aumenta para torno de 100.000 (Cummins, 2004).

A distribuição e localização das mitocôndrias no citoplasma de oócitos também variam ao longo das fases de crescimento e maturação do oócito. Em oócitos VG as mitocôndrias apresentam-se em grânulos e são encontradas mais na região subplasmática da membrana, sendo chamadas de tipo A. A maturação do oócito para MI ou MII leva a uma aparência mais lisa e as mitocôndrias estão distribuídas mais no centro do oócitos, sendo chamadas de padrão mitocondrial tipo B (Wilding et al., 2001). Da mesma forma, em um estudo mais detalhado sobre a distribuição de mitocôndrias ativas em oócitos suínos, Sun et al., 2001 demonstraram que o acúmulo de mitocôndrias ativas pode ser visto na periferia do

citoplasma e em volta da vesícula germinativa em oócitos VG. Após a quebra da vesícula germinativa até a AI, as mitocôndrias encontram-se acumuladas na área perinuclear do oócito, enquanto que agregados mitocondriais mais largos foram observados mais centralmente em oócitos em estágio MII. Uma forte marcação para mitocôndrias ativas foi identificada no primeiro corpúsculo polar em oócitos em M II (Sun et al., 2001). Este padrão de distribuição pode estar relacionado ao requerimento de energia. Oócitos VG precisam suportar as células do cúmulus nessa fase, por isso as mitocôndrias ficam localizadas mais periféricamente. Já na fase de quebra da VG é possível que o acúmulo perinuclear de mitocôndria tenha um papel na quebra da vesícula. Após a quebra da vesícula, as mitocôndrias continuam agregadas em volta da área perinuclear em MI e AI, que é provavelmente relacionado com o alto requerimento energético para os eventos meióticos, tais como a montagem do fuso, condensação da cromatina e movimento e emissão do corpúsculo polar (Sun et al., 2001).

Stojkovic et al. (2001) conduziram estudo em que a distribuição, morfologia e produção de ATP mitocondrial foram correlacionados em oócitos bovinos. Para tanto os oócitos foram morfológicamente classificados em diferentes categorias sendo que as categorias 1 e 2 eram compostos por oócitos de citoplasma mais homogêneo e com maior número de camadas de células do cumulus, e 3 e 4 eram compostas por oócitos com citoplasma mais heterogêneo e com menor número ou nenhuma camada de células do cumulus. Nos oócitos VG a marcação das mitocôndrias com Mito Tracker verde foi mais homogênea para a categoria 1. Após a maturação, as mitocôndrias de oócitos da categoria 1 e 2 apareceram como aglomerados mais intensos e centrais, enquanto a categoria 4 não apresentou reorganização das mitocôndrias. O conteúdo de ATP também foi significativamente afetado pela categoria. Antes da maturação, o conteúdo de ATP dos oócitos das categorias 1 e 2 foi maior que das demais categorias. A proporção de mórulas e blastocistos assim como o número total de células dos embriões foram significativamente mais alta nas categorias 1 e 2, que apresentaram maior conteúdo de ATP, quando comparado as categoria 3 e 4. Com esse estudo os autores demonstraram que a atividade mitocondrial é um determinante do potencial de desenvolvimento do embrião, embriões com conteúdo de ATP reduzido desenvolvem mais lentamente, resultando em um menor número de células (Stojkovic et al.,2001).

Para demonstrar a importância do citoesqueleto na distribuição mitocondrial, Sun et al., (2001) utilizaram um inibidor de polimerização de microtúbulos, nocodazole, que foi capaz de inibir a organização de tubulina e conseqüentemente a agregação mitocondrial na área da vesícula germinativa e a movimentação para a região central do oócito durante a maturação oocitária. O rompimento dos microfilamentos com citocalasina B, entretanto, não causou nenhum efeito. Esses dados indicam que a translocação das mitocôndrias é mediada por microtúbulos, mas não por microfilamentos. (Sun et al., 2001).

As mitocôndrias também estão intimamente envolvidas na indução de apoptose pela liberação de citocromo c da matriz mitocondrial para o citoplasma. Este é um evento chave que desencadeia a cascata de apoptose (Shimizu et al., 1999) que será discutida mais detalhadamente adiante.

### 2.3 BLOQUEIO DA MEIOSE

A remoção de oócitos competentes do seu ambiente folicular priva os mesmos dos fatores inibitórios possibilitando a retomada da meiose (Pincus e Enzmann, 1935). Estudos sugerem que o fator que inibe a retomada espontânea da meiose seja produzido pelas células da granulosa ou da teca (Kotsuji et al., 1994). A incubação de CCOs com células da granulosa atrasou a quebra da vesícula germinativa de 6 para 9 h, porém quando CCOs foram cultivados com células da granulosa e células da teca a quebra da vesícula germinativa só aconteceu após 24 h de cultivo. Possivelmente um sinal das células da teca aumenta a atividade bloqueadora da meiose das células da granulosa (Kotsuji et al., 1994).

O controle molecular da maturação meiótica tem sido extensivamente estudado e acredita-se que este fenômeno é controlado pelo fator promotor da fase M (MPF). O MPF é composto por uma subunidade catalítica (p34<sup>cdc2</sup>) e uma subunidade regulatória (ciclina B) (Gautier et al., 1988). A forma ativa desse heterodímero é a p34<sup>cdc2</sup> quinase e a sua atividade pode ser mensurada pela atividade da histona H1 quinase (Arion et al., 1988). A atividade da histona H1 quinase é responsável pela entrada na fase M e pela cascata de eventos associadas com a maturação meiótica. A ciclina B, que faz parte da molécula de MPF, depende de eventos específicos de fosforilação-desfosforilação para ser ativada. Já foi

demonstrado que a ciclina B está ausente em oócitos bovinos no momento da retirada do folículo ovariano, mas é sintetizada durante a maturação do oócito (Lévesque e Sirard, 1996).

Existem evidências *in vitro* de que a diminuição do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) intraocitário precede a quebra da vesícula germinativa, demonstrando a importância do AMPc no reinício da meiose (Schultz et al., 1983; Aberdam et al., 1987). Diante do questionamento em relação à síntese do AMPc pela adenilatociclase no oócito, tem sido proposto que o AMPc é mantido em altos níveis através da difusão entre as células somáticas (Gilula et al., 1978). Ocorre uma diminuição do AMPc após o pico de LH. A diminuição do AMPc causa a inativação da proteína quinase A (PKA) e uma diminuição da fosforilação. Desde que essa fosforilação é inibitória para maturação, a diminuição da fosforilação induz o oócito a retomar a meiose (Conti et al., 1998).

A síntese protéica e a atividade de uma série de proteínas quinases e fosfatases controlam a meiose em oócitos. Entre os inibidores meióticos já avaliados em estudos *in vitro* podemos destacar aqueles que mantêm altas concentrações de AMPc intraocitário (Bilodeau-Goeseels, 2003), os inibidores não específicos da síntese proteica como a ciclohexamida (Meinecke et al., 2001), os inibidores de proteínas quinases (Anderiesz et al., 2000) e os inibidores específicos da fosforilação de proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (Adona et al., 2008).

Recentemente, o uso de um meio definido ( $\alpha$ -MEM suplementado com PVA, insulina, IGF-1, androstenediona, aminoácidos não essenciais, transferrina e selênio de sódio) foi capaz de bloquear a progressão meiótica em uma taxa de 70% de oócitos imaturos após 24 h de cultivo. Para testar a capacidade de reversão desse meio, os oócitos foram cultivados por um período adicional de 24 h em meio definido e não definido. Após o cultivo por 24 h em meio definido seguido por 24 h em meio não definido, mais de 80% dos oócitos chegaram em MII. Entretanto, após o cultivo por 48 h em meio definido aproximadamente 80% dos oócitos permaneceram imaturos. Os oócitos cultivados por 24 h em meio definido apresentavam características de oócitos imaturos como falta de expansão das células do cumulus e aglomerados de grânulos corticais em 50% dos oócitos, sendo que após as 24 h de reversão em meio não definido os oócitos apresentavam características de oócitos maduros como distribuição das mitocôndrias pelo citoplasma, grânulos

corticais alinhados na região cortical do oócito e expansão das células do cumulus (Oliveira e Silva et al., 2011).

A inibição da degradação do AMPc com inibidores da fosfodiesterase do tipo 3 (PDE3), como exemplo o trequinsin, resultam na manutenção de 60,3% e 67,8% de oócitos em VG após 7 h de cultivo nas doses de 10 e 50 nM. Os oócitos cultivados com 10 nM de PDE3 por 7 h foram capaz de reverter o bloqueio meiótico após 16 h de cultivo em meio MIV em uma taxa de 83% de oócitos em MII (Bilodeau-Goeseels (2003).

A ciclohexamida é um inibidor da peptidil transferase que bloqueia a reação de tradução nos ribossomos de eucariotos e conduz a uma queda rápida da fase de alongação polipeptídica durante a síntese de proteínas (Alberts et al., 1993). O uso desse inibidor não específico da síntese protéica por 17 e 24 h de cultivo fez com que 80,7 e 86,2% dos oócitos apresentassem alta condensação da cromatina com VG intacta, respectivamente. Em ambos os tratamentos a quebra da vesícula ocorreu entre 4 e 5 h depois da retirada do inibidor e MI foi alcançada com 7 h de cultivo. Depois de 24 h de cultivo 73.6% dos oócitos chegaram ao estágio de MII, indicando que a ação da ciclohexamida é completamente revertida na maturação nuclear (Meinecke et al., 2001).

O 6-Dimetilaminoporina (DMAP) é um inibidor da serina treonina proteína quinase que previne a quebra espontânea da vesícula germinativa por inibir a ativação da histona H1 quinase, mas não interfere com a síntese da proteína (Rime et al., 1989, Fulka et al., 1991). O DMAP inibiu a retomada da meiose em 91% e 94% dos oócitos de camundongo após 7 e 18 h de cultivo, respectivamente. Em humanos, o DMAP inibiu a progressão meiótica em 83% dos oócitos. Esse bloqueio, entretanto, foi totalmente revertido. O desenvolvimento embrionário humano não diferiu entre os oócitos tratados com DMAP e o controle. Entretanto, em camundongos o desenvolvimento embrionário foi reduzido significativamente nos oócitos tratados com DMAP (Anderiesz et al., 2000).

A butirolactona I é um produto natural isolado do *Aspergillus terreus* var. africana IFO 8835 in 1977 (Kiryama et al., 1977). Esse inibidor bloqueia a progressão do ciclo celular e possui atividade antitumoral. Ele inibe seletivamente as quinases CDK2 e CDK1, ambas que desempenham importantes funções na progressão celular da fase G1 para S e da fase G2 para a fase M, respectivamente, em células de mamíferos. A CDK2 é ativada pela ciclina E e permite a progressão

na fase S. Além disso, CDK2 é também ativada pela ciclina A e permite a progressão pela fase S. A CDK1 é ativada pela ciclina B e estimula a entrada na mitose. A butirolactona age de forma competitiva pela ligação no mesmo sítio que o ATP (Kitagawa et al., 1993). Da mesma forma, a roscovitina age inibindo as CDK1, CDK2 e CDK5 (De Azevedo et al., 2002) por isso também pode ser usada como um inibidor da progressão meiótica.

O uso de butirolactona não afetou a expressão (RNAm e níveis de proteínas) e a localização do MPF (p34<sup>cdc2</sup> e ciclina B1) e não afetou a atividade de quinase durante a maturação (Quetglas et al., 2010).

Estudo conduzido por Lonergan (2003) demonstrou alguns efeitos negativos causados pelos inibidores meióticos roscovitina e butirolactona. Os CCOs bovinos foram incubados por 24 h na presença de 0 ou 50 µM de butirolactona ou roscovitina e posteriormente foram submetidos à MIV por 24 h. Em oócitos tratados com roscovitina foi observado edema mitocondrial e não foi observada expansão das células do cumulus após a MIV. Em oócitos tratados com butirolactona foi observado um aumento de mitocôndrias pleomórficas após a MIV, embora essas mitocôndrias tenham apresentado distribuição semelhante aos controles. Ambos inibidores causaram degeneração dos grânulos corticais e convolução da membrana do núcleo (Lonergan et al., 2003).

Estudos posteriores, entretanto, demonstraram resultados diferentes e positivos em relação ao uso desses inibidores meióticos. Microtúbulos e microfilamentos não foram afetados pelo bloqueio durante 24 h com 10 ou 100 µM de butirolactona. A marcação dos microtúbulos foi observada no citoplasma de todos os oócitos independente do estágio de maturação e do tratamento, exceto para os oócitos em VG. Para os microfilamentos, uma maior marcação foi observada no córtex celular e perto do corpúsculo polar com 18 a 24 h de maturação em todos os grupos. A migração dos grânulos corticais foi bloqueada e posteriormente revertida após tratamento com butirolactona. Em todos os oócitos em VG, independente do grupo, os aglomerados de grânulos corticais estavam dispersos no citoplasma e após 24 h de maturação 98% dos oócitos apresentavam migração dos grânulos corticais para a periferia do citoplasma (Adona et al., 2008 (b)).

A pré-maturação de oócitos com 100 µM de butirolactona (BL) ou 6,25 µM de butirolactona e 12,5 µM de roscovitina (BR) por 24 h bloqueou a maturação meiótica em uma taxa de 100% para o grupo BL e 89% no grupo BR. Após a pré maturação

esses oócitos foram colocado em meio de maturação e a proporção de MII foi similar entre todos os grupos (66-78% com 18h de maturação, 77-89% com 21 h de maturação e 85-95% com 24 h de maturação). Esses autores também testaram a competência desses oócitos após o tratamento com BL ou BR em meio TCM-199 ou *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). A taxa de clivagem não foi afetada por nenhum dos tratamentos (79-84%). O mesmo foi visto para a taxa de blastocisto no dia 7 (26-36%) (Adona et al., 2008 (a)). Em outro estudo onde diferentes doses de butirolactona foram testadas a maioria dos oócitos tratados permaneceu em VG nas diferentes concentrações (97,4; 84,4 e 65,1% para as concentrações de 100, 50 e 25  $\mu$ M de butirolactona suplementados com BSA, respectivamente). Quando o bloqueio foi feito em um meio TCM-199 sem BSA por 24 h com concentrações mais baixas de butirolactona (10, 15, 20 e 25  $\mu$ M) a maioria dos oócitos também permaneceu bloqueada em VG (> 95%) independente da concentração testada. Após a pré-maturação esses oócitos foram maturados por 24 h e a taxa de MII para o controle (sem pré-maturação) foi igual aos grupos que passaram pela pré-maturação em 10  $\mu$ M de butirolactona sem BSA e 100  $\mu$ M de butirolactona com BSA (aproximadamente 90%). A taxa de clivagem foi similar entre os grupos (81–87%) mas a taxa de blastocisto no dia 7 diminuiu no grupo tratado com 100  $\mu$ M de butirolactona (33%) comparado ao controle e ao grupo tratado com 10  $\mu$ M (38,3 e 41,6%). A taxa de eclosão no dia 8 (11%) e o número total de células (136–150) foi similar entre os tratamentos (Adona, 2008 (b)). A pré-maturação dos oócitos em meio com 100  $\mu$ M de butirolactona por 24 h resultou em um bloqueio meiótico de 90,2% dos oócitos. Após a pré-maturação esses oócitos foram maturados por 18 h (BL18) ou 24 h (BL24) e a taxa de maturação foi similar entre todos os grupos (80,3%, 73,6% e 82,7% para o controle, BL18 e BL 24, respectivamente). A incidência de anormalidades meióticas não diferiu entre os grupos (Ferreira et al., 2009).

Da mesma forma, o uso da roscovitina em concentrações crescentes de (12,5; 25; 50 e 100  $\mu$ M) em oócitos cultivados por 24 horas apresentou resultados satisfatório a partir da concentração de 25  $\mu$ M de roscovitina (83% de oócitos em VG) (Mermillod et al., 2000). Esses autores também demonstraram que esse efeito inibitório pode ser completamente revertido visto que 89% dos oócitos pré-maturados com 25  $\mu$ M de roscovitina atingiram o estágio de MII após MIV por 24 horas. Além disso, as taxas de clivagem e o desenvolvimento para blastocisto não foram diferentes nos oócitos pré-maturados por 24 horas com roscovitina. Da

mesma forma, Coy et al., 2005 testaram várias concentrações de roscovitina (0; 12,5; 25 ou 50  $\mu\text{M/l}$  S-roscovitina por 24 horas) e demonstraram que nessas concentrações 52; 87,6 e 96,8% dos oócitos permaneceram em VG. Os resultados desse estudo demonstraram que a roscovitina age de forma dose dependente e que a concentração 50  $\mu\text{M}$  é capaz de manter mais de 90% dos óocitos bovinos em VG por 48 horas sem comprometer a sua maturação nuclear, fertilização e desenvolvimento embrionário posterior. A pré-maturação por longos períodos (66 horas), entretanto, compromete o desenvolvimento desses oócitos (52% em MII).

## 2.4 IGF-I

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) possuem ações autócrinas, parácrinas e endócrinas sobre o metabolismo, proliferação, crescimento e diferenciação celular (Voss e Rosenfeld, 1992; Baker et al., 1993; Yakar et al. 1999). O sistema IGF inclui os ligantes IGF-I e IGF-II, os receptores tipo 1 e 2 de IGF (IGF-IR e IGF-IIR, respectivamente), as proteínas ligadoras de IGF 1 a 6 (do inglês *insulin-like growth factor binding protein* - IGFBP) e as proteínas intracelulares sinalizadoras associadas ao IGF-IR, que incluem os membros da família do IRS (*insulin-receptor substrate*), AKT (Proteína quinase serina/treonina), TOR (*target of rapamicina*) e a S6K (S6 quinase) (Jones e Clemmons, 1995; Clemmons et al., 1998; Tatar et al., 2002; Firth e Baxter, 2002).

O fígado é o responsável pela síntese da maior concentração circulante de IGFs e proteína ligadora de fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBPs), mas esses fatores também podem ser localmente secretadas em outros órgãos por ação autócrina ou parácrina (Clemmons et al., 1998), como no oviduto (Pushpakumara et al., 2002) e endométrio (Robinson et al., 2000).

A síntese dos IGFs é regulada pelo eixo GH-IGF. O hipotálamo secreta hormônio liberador de GH (GHRH) e hormônio inibidor de GH ou somatostatina. O GHRH age na hipófise anterior estimulando a secreção de hormônio de crescimento (GH) que age primariamente no fígado estimulando a produção e a liberação de IGF-I. O GH é o principal estimulador da produção de IGF-I, mas não de IGF-II. A secreção do GH também é estimulada pela ghrelina, que é secretada pelo estômago e hipotálamo (Martinelli Jr et al., 2008; Oliveira et al., 2008)

As IGFs são transportadas para as células-alvo em complexo com as IGFBPs, diferentemente da insulina, o que prolonga sua meia-vida e modula sua interação com a superfície de membrana dos receptores (Jones e Clemmons, 1995; Tatar et al., 2002).

A IGFBP3 é a forma circulante mais abundante, responsável pela maior parte da capacidade de ligação às IGFs, em especial à IGF-I; e está normalmente associada a um complexo ternário composto pela IGFBP3, o IGF-I e a ALS (acid-labile subunit). As IGFBP1 e IGFBP6 possuem uma capacidade de ligação 10 vezes maior à IGF-II em relação à IGF-I, enquanto as demais IGFBPs (Jones e Clemmons, 1995; Tatar et al., 2002) têm igual afinidade às IGFs. As IGFBPs possuem um papel muito importante no controle da biodisponibilidade dos IGF-I. Estas proteínas inibem o efeito do IGF-I possivelmente por sequestrar o IGF-I extracelular, limitando o seu acesso aos receptores na superfície da célula. Em contraste, as IGFBPs também potencializam a ação do IGF-I por prolongar a meia vida deste agindo como reservatório para garantir a liberação controlada para as células alvos e facilitar o transporte da circulação periférica para os tecidos alvos (Clemmons et al., 1998; Firth e Baxter, 2002). A clivagem das IGFBPs para liberação da IGF-I depende de ações proteolíticas. A redução das IGFBs é associada ao aumento da atividade proteolítica da proteína sérica A associada à gestação (PAPP-A). A degradação das IGFBPs pela PAPP-A leva ao aumento da biodisponibilidade de IGF livre (Monget et al., 2003).

A concentração de IGF-I total no soro varia com uma série fatores tais como a fase do ciclo estral e o manejo nutricional. Os maiores valores de IGF-I circulante foram encontrados próximos ao período da ovulação (Armstrong et al., 2001). Em vacas Simentais e Charolesas a concentração média de IGF-I circulante coletado 48-50 h após injeção com PGF2 $\alpha$  foi de 297 ng/ml (Echternkamp et al., 1990). Em animais submetidos à dieta contendo alto e baixo valor energético a concentração de IGF-I foi 600 e 350 ng/ml, respectivamente (Armstrong et al., 2001). A restrição alimentar também pode alterar a concentração de IGF-I no soro. Vacas Angus, Charolês, Hereford e Simental, fora do período de gestação, submetidas à dieta de restrição durante 13 dias (menos que 10% dos requerimentos de energia e proteína) apresentaram diminuição da concentração de IGF-I no soro no último dia de restrição (120 e 98 ng/ml para o controle e o grupo restrição, respectivamente) (Kirby et al., 1993).

A concentração de IGF-I total no fluído folicular varia entre os autores. Kirby et al., 1993 demonstraram que a concentração de IGF-I no fluído folicular do maior folículo da onda foi similar para animais que tiveram acesso livre ao alimento (70 ng/ml) quando comparada aos animais com restrição alimentar (71 ng/ml). Echternkamp et al. (1990), entretanto, encontraram concentrações mais altas de 243 ng/ml e 177 ng/ml de IGF-I nos dois maiores folículos ovarianos e no pool de folículos pequenos (< 4 mm), respectivamente. Em novilhas, o IGF-I total de folículos pequenos foi de 160 ng/ml, 179 ng/ml nos folículos médios e 219 ng/ml nos folículos grandes (Spicer e Enright, 1991). Baixos níveis de IGF-I, insulina e glicose e alta atividade de IGF-BPs foram associados a formação de cisto folicular, com valores médios de IGF-I de 146 ng/ml no folículo pré-ovulatório e 61 ng/ml nos cistos (Braw-Tal et al., 2009). A concentração de IGF-I livre para o folículo dominante e folículo subordinado na hora do desvio (quando folículo dominante atinge 8,5 mm) foi de aproximadamente 12 ng/ml, sendo que após o desvio a concentração de IGF-I livre aumentou para próximo de 17 ng/ml no folículo dominante e diminuiu para aproximadamente 5 ng/ml no folículo subordinado (Ginther et al., 2002). Já em éguas, o IGF-I livre no fluído folicular de folículos pequenos e médios variou em torno de 1,6 e 1,9 ng/ml, respectivamente, na fase folicular, enquanto o folículo dominante apresentou concentração média 25,1 ng/ml (Spicer et al., 2005).

RNA<sub>m</sub> para receptores de IGF-I estão presentes em oócitos (Yoshida et al., 1998; Nuttinck, et al., 2004), nas suas células do cumulus (Yoshida et al., 1998; Nuttinck, 2004) desde a retirada do oócito do folículo antral até a fase de embriões pré-implantacionais (Yoshida et al., 1998; Wang et al., 2009) sugerindo a importância deste fator de crescimento na função oocitária e embrionária. O RNA<sub>m</sub> para IGF-I e IGF-BP-4 foram detectados nas células do cumulus e nos CCOs, não sendo detectados no oócito, enquanto RNA<sub>m</sub> para IGF-IR e IGF-BP-2 foram expressos nas células do cumulus, oócitos e nos CCOs antes e após a maturação (Nuttinck et al., 2004). Yoshida et al. (1998), entretanto detectaram expressão de RNA<sub>m</sub> para IGF-I em oócitos logo após a retirada do folículo, embora não tenham detectado em nenhuma outra fase da maturação, e em embriões de 2, 8, 16 células e blastocistos (Yoshida et al., 1998). Proteínas para IGF-II, IGF-IR e IGF-IIR foram detectadas na membrana plasmática das células do cumulus de CCOs, nos oócitos maduros ou imaturos e em embriões de 2 e 8 células, nas mórulas e blastocistos (Wang et al., 2009).

#### 2.4.1 Efeitos do IGF-I na maturação oocitária e no cultivo embrionário

Experimentos *in vitro*, demonstraram os efeitos benéficos da adição do IGF-I em meios de MIV e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões. A suplementação do meio MIV com 100 ng/ml de IGF-I acelerou a maturação nuclear em oócitos bovinos (Lorenzo et al., 1994; Sakaguchi et al., 2002). É possível que esta mudança na cinética da maturação nuclear seja resultado do aumento da atividade da H1 e MAP quinases (Sakaguchi et al., 2002). Da mesma forma, em búfalos, o IGF-I estimulou a maturação nuclear dos oócitos de maneira dose dependente, com máximo efeito na dose de 100 ng/ml quando comparado as doses 0, 1, e 10 ng/ml (Pawshe et al., 1998). A suplementação do meio de MIV com 100 ng/ml de IGF-I diminuiu a porcentagem de oócitos TUNEL-positivo e diminuiu a porcentagem de oócitos com alta atividade de caspases quando comparado ao controle sem IGF-I e ao controle 0 hora (avaliado imediatamente após a retirada do folículo) (Wasielak e Bogacki, 2007). A suplementação do meio de MIV com 50 ng/ml de IGF-I aumentou a taxa de mórulas e blastocistos em ovinos, sendo que a adição de 100 µM/l de cisteamina melhorou o desenvolvimento embrionário nesse meio (Shabankareh e Zandi, 2010). De maneira semelhante, a adição de 100 ng/ml de IGF-I durante a MIV de oócitos de búfalos aumentou a taxa de clivagem e o desenvolvimento para blastocisto (Pawshe et al., 1998).

A suplementação de IGF-I no meio de CIV estimulou o desenvolvimento embrionário pré-implantacional. A adição de 10% de soro de vaca em estro contendo 34,8 ng/ml de IGF-I endógeno no meio CIV aumentou a porcentagem de blastocistos no dia 9 e blastocistos eclodidos no dia 13 depois da inseminação. A adição de 50 e 100 ng/ml de IGF-I no meio CIV contendo 10% de soro de vaca em estro também aumentou a taxa de mórula e blastocisto nos dias 7 e 9 após a fertilização. O IGF-I acelerou o desenvolvimento embrionário por diminuir o tempo de transição do estágio de mórula para blastocisto (Palma et al., 1997).

Da mesma forma, a adição de 100 ng/ml de IGF-I no meio de cultivo reduziu os índices de apoptose e aumentou o número de células em blastocisto (Byrne et al., 2002 (b); Makarevich e Markkula, 2002). A suplementação do meio CIV com 100 e 1000 ng/ml de IGF-I, entretanto, causou um aumento na taxa de blastocistos apenas na dose 100 ng/ml. A dose de 1000 ng/ml de IGF-I exerceu efeito estimulante na proliferação de células na massa celular interna (MCI) e aumentou o index de

apoptose. O aumento das células da MCI foi associado ao aumento na expressão protéica para receptores de IGF-I na MCI sugerindo que os efeitos deletérios causado pela dose 1000 ng/ml não estão relacionados com a regulação negativa dos receptores de IGF-I. A concentração de 100 ng/ml de IGF-I aumentou as proteínas para receptores de IGF-I e aumentou os transcritos para IGFBP3 levando a um aumento na formação de blastocistos sem alterar o número de células ou de apoptose (Velazquez et. al., 2011).

Em experimentos *in vivo* a administração de 1 µg de IGF-I intraovariano reduziu a taxa de blastocistos e de blastocistos viáveis em vacas magras quando comparado a vacas gordas. A expressão de IGFBP3 foi maior em blastocistos coletados das vacas magras tratadas com IGF-I quando comparado aos grupos controle ou vacas gordas tratados com IGF-I. O aumento rápido e supra-fisiológico de IGF-I intraovariano reduziu a competência de desenvolvimento de oócitos coletados de vacas magras quando comparado a vacas gordas. As vacas gordas superovuladas foram refratárias ao tratamento com IGF-I. A administração intraovariana de IGF-I não alterou a concentração plasmática ou do fluido uterino luminal de IGF-I em nenhum dos grupos, porém as vacas gordas apresentaram uma maior concentração plasmática de IGF-I (Velazquez et al., 2011 (b)). Da mesma forma, a administração intraovariana de 0,6 µg de IGF-I recombinante humano em animais pré-puberis e pós-puberis afetou a competência oocitária. Em animais pré-púberes a administração intraovariana reduziu a taxa de blastocisto independente do IGF-I. No entanto, nos animais pós-púberes a taxa de blastocisto foi reduzida apenas nos animais tratados com IGF-I quando comparados com o controle pós-púbere e com vacas adultas. Neste estudo o número de núcleos positivos para apoptose foi mais baixo nos blastocistos originados de vacas adultas do que os originados de animais pré e pós-puberis. Os resultados demonstraram que a apoptose é crítico para a aquisição de competência de desenvolvimento dos oócitos de animais pré-puberis e que o IGF-I não apresentou efeitos benéficos na capacidade de desenvolvimento do oócito (Zaraza et al., 2010).

#### 2.4.2 Efeitos do IGF-I em oócitos e embriões expostos ao estresse térmico

Além de reduzir a apoptose embrionária espontânea, o IGF-I minimiza a apoptose induzida por vários outros fatores estressantes. O IGF-I inibiu a apoptose induzida pela radiação ultravioleta em embriões de coelho (Herrler et al., 1998), pelo fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Byrne et al., 2002 (a) e pela actinomicina D em embriões de camundongo (Fabian et al., 2004). Em bovinos, a adição de IGF-I durante o CIV reduziu a apoptose embrionária induzida pelo choque térmico (Jousan e Hansen, 2004). Entretanto, o papel do IGF-I em oócitos em estágio VG expostos ao choque térmico ainda não foi demonstrado. É possível que o IGF-I exerça um papel termoprotetor em oócitos expostos à temperatura elevada reduzindo danos celulares como a morte celular por apoptose e melhorando o desenvolvimento embrionário.

O efeito termoprotetor do IGF-I em embriões bovinos expostos ao estresse térmico já foram demonstrados *in vitro*. O cultivo de embriões bovinos *in vitro* na presença de 100 ng/ml de IGF-I aumentou a taxa de gestação e diminuiu a taxa de perda embrionária após a transferência de embriões para vacas de leite lactantes expostas ao estresse térmico *in vivo* durante o verão (Block et al., 2003; Block e Hansen, 2007). No entanto, a suplementação com IGF-I não afetou estas taxas na estação fria (Block e Hansen, 2007). Além disso, a adição de 100 ng/ml de IGF-I durante o cultivo de embriões bovinos expostos ao choque térmico de 41°C resgatou o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, aumentou o número total de células por blastocisto e diminuiu a porcentagem de apoptose embrionária causada pelo choque térmico (Jousan e Hansen, 2004). Dados indicam que o IGF-I afeta a fisiologia dos embriões bovinos por alterar a abundância relativa de RNAm de genes importantes no desenvolvimento, incluindo desmolina II, Na/K-ATPase, BAX, IGF-IR, IGFBP3 e HSP70. A mudança na expressão desses genes pode acontecer sem mudanças detectáveis no número de células, na apoptose ou na relação entre a MCI e o trofotoderma (Block et al., 2008).

A exposição de vacas leiteiras ao estresse térmico *in vivo* diminuiu o consumo de matéria seca, reduzindo os níveis circulantes de glicose, insulina e IGF-I. Essa redução de IGF-I compromete o crescimento folicular e a qualidade oocitária (De Rensis et al., 2003).

Estudos recentes conduzidos por Bonilla et al. (2001) demonstraram que a exposição de embriões bovinos no estágio de 2 células ao choque térmico de 41°C reduziu a porcentagem de blastocisto no dia 8 e que a suplementação do meio CIV com 100 ng/ml de IGF-I não minimizou os efeitos deletérios do choque térmico no desenvolvimento embrionário. No entanto, quando o IGF-I foi adicionado ao meio de cultivo de embriões > 16 células coletados no dia 5 após a fertilização e submetidos ao choque térmico de 42°C por 15 horas houve efeito benéfico do IGF-I resgatando o desenvolvimento embrionário nestes embriões. A expressão de genes envolvidos na sinalização do IGF-I (IGF-IR, RAF, MAPK, PI3K e HK2) foi mais elevada em embriões de 2-células do que embriões de 5 dias, indicando que a falha no efeito termoprotetor do IGF-I em embriões de 2-células não está envolvida com a falta de expressão de genes da cascata de sinalização do IGF-I. Além disso, o cultivo de embriões com IGF-I por 7 dias teve pouco efeito no transcriptoma de blastocistos com um total de 102 genes diferentemente regulados nos blastocistos grau 1. Entre os genes diferentemente expressos, muitos eram envolvidos com a apoptose, proteção contra os radicais livres e com o desenvolvimento (Bonilla et al., 2011).

A adição de IGF-I no meio de maturação de oócitos expostos ao estresse térmico também já foi avaliada e possui resultados contraditórios. A adição de 100 ng/ml de IGF-I em oócitos submetidos ao choque térmico diminuiu a taxa de formação de blastocisto nos grupos expostos a altas temperaturas na presença ou ausência de IGF-I (Zhandi et al., 2009). O número total de blastômeros por embrião foi menor e a porcentagem de blastômeros positivos para TUNEL foi maior nos grupos tratados com IGF-I submetidos ou não ao choque térmico (Zhandi et al., 2009). Zhandi et al., 2009 também demonstraram que a suplementação do meio MIV com 100 ng/ml de IGF-I sob efeito do choque térmico aumentou a porcentagem de oócitos TUNEL-positivo, embora Ispada et al., 2010 tenha encontrado resultados contrários. Ispada et al., 2010 demonstraram que embora o choque térmico tenha aumentado a porcentagem de oócitos TUNEL-positivo, o IGF-I foi capaz de reverter esses efeitos. O choque térmico durante a MIV também reduziu a atividade mitocondrial de oócitos bovinos. Considerando que vários estresses celulares ativam a via mitocondrial da apoptose, é possível sugerir que houve ativação da apoptose pela via mitocondrial. Entretanto, a suplementação do meio MIV com IGF-I resgatou a atividade mitocondrial dos oócitos submetidos ao choque térmico (Ispada et al., 2011).

## 2.5 APOPTOSE

Originariamente o termo morte celular programada foi utilizado para descrever eventos de morte celular que ocorre de uma forma espontânea, orquestrada e de maneira previsível ao longo do desenvolvimento dos animais (Lockshin e Williams, 1964). Apenas em 1972 que Kerr, Wyllie e Currie estabeleceram as semelhanças entre vários modelos de morte celular e descreveram um conjunto de características morfológicas observadas em vários tipos de células durante episódios fisiológicos de morte celular em mamíferos. Esta morte celular programada foi chamada de apoptose (Kerr et al., 1972) e é um processo de auto-destruição celular que está envolvido em grande variedade de eventos biológicos (Kerr et al., 1972).

A morte celular é um importante processo que contribui para o desenvolvimento normal. A apoptose tem sido proposta como o mais importante evento regulatório observado durante o desenvolvimento embrionário, estabelecimento da tolerância auto-imune e regulação da viabilidade da célula por hormônios e fatores de crescimento (Zakeri e Lockshin, 2002). Alterações na programação da morte celular pode contribuir para o câncer, patologias virais, injúrias agudas neurológicas, doenças neurodigestivas, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e síndromes de imunodeficiência adquirida (Zimmermann et al., 2001).

Morfologicamente, a apoptose envolve uma série de fases consecutivas que afetam o núcleo e o citoplasma da célula (Wyllie et al., 1980). Inicialmente, a célula encolhe e torna-se mais densa (Kerr, 1971). A cromatina agrega e condensa e apresenta uma aparência curva comumente descrita como meia lua ou ferradura (Majno e Joris, 1995). O envelope nuclear permanece morfológicamente intacto, mas os poros nucleares são redistribuídos e acumulam entre a cromatina condensada (Earnshaw, 1995). O citoplasma começa a condensar (Kondo et al., 1997). Organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e lisossomos podem ser mantidos com forma intacta durante as fases iniciais da apoptose (Kerr et al., 1972). Entretanto, dilatação do retículo endoplasmático (Pollard et al., 1987; Ludewig et al., 1995), desprendimento dos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso juntamente com a agregação dos ribossomos (Ferguson and Anderson, 1981), e condensação das mitocôndrias (Kluck et al., 1999) podem ser vistos como efeitos tardios da apoptose.

Do ponto de vista bioquímico a apoptose caracteriza-se por alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial externa que torna-se permeável a proteínas (Patterson et al., 2000), redução no potencial de membrana mitocondrial (PMM) regulado por proteínas da família Bcl-2 (Hirsch et al., 1997; Deshmukh et al., 2000; Goldstein et al., 2000), desorganização da camada bilipídica com translocação da fosfatidilserina da camada interna para camada externa da membrana plasmática (Martin et al., 1995). No núcleo, a mudança bioquímica mais bem definida é a ativação da cascata das enzimas caspases que desencadeia a ativação da DNase (do inglês *caspase activated DNase*) (Desoxirribonuclease). A ativação da DNase leva a clivagem do DNA entre nucleossomos, gerando fragmentos de DNA entre 180-200 pb (Wyllie et al., 1997; Saraste e Pulkki, 2000).

Estudos em nematóides *Caenorhabditis elegans* descreveram a regulação molecular do processo de apoptose. Esses estudos identificaram genes importantes envolvidos na apoptose (*ced-3, ced-4 and ced-9*) (Horvitz et al., 1982; Ellis e Horvitz, 1986) e levaram a descoberta de seus homólogos em mamíferos (Yuan et al., 1993; Hengartner e Horvitz, 1994). Em mamíferos, o gene supressor da apoptose, Bcl2, sempre está associado ao gene proteína humana fator de ativação de proteases associada à apoptose (APAF-1), o que impede a ativação da caspase 9. Quando a apoptose é iniciada, a proteína humana Bax se associa a Bcl2, liberando a APAF-1 e ativando a caspase 9 que leva a apoptose (Hengartner, 2000).

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem à família das cisteínas proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo) que clivam especificamente seus substratos em resíduos de ácido aspártico (Nicholson e Thornberry, 1997). As caspases sinalizam para a apoptose e clivam os substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolípidios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (Nicholson e Thornberry, 1997; Boatright e Salvesen, 2003). Já foram identificadas 14 caspases que são classificadas de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos, em 3 subfamílias como mostrada na Tabela 1 (Fan et al., 2005). As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios (Hengartner, 2000). Após um sinal de morte celular, as caspases são ativadas por clivagem proteolítica. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (Boatright e Salvesen, 2003).

Tabela 1: Membros da subfamília da família das caspases

Subfamília	Papel	Membros
I	Ativadoras da apoptose	Caspase -2
		Caspase- 8
		Caspase- 9
		Caspase- 10
II	Executores da apoptose	Caspase- 3
		Caspase- 6
		Caspase- 7
III	Mediadores inflamatórios	Caspase- 1
		Caspase- 4
		Caspase- 5
		Caspase- 11
		Caspase- 12
		Caspase- 13
		Caspase- 14

A cascata de apoptose dependente de caspase pode ser iniciada por duas principais vias. A via extrínseca ou de receptor de morte é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (Budihardjo et al., 1999).

A via intrínseca ou mitocondrial é ativada por estresse intracelular ou extracelular como choque térmico, estresse oxidativo, inibição da proteína quinase. A resposta a esses estímulos direcionam-se principalmente para a mitocôndria (Hengartner, 2000).

A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose (Borner, 2003). Os membros da família Bcl-2 é formado por proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1 e Al) e pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bcl-xs, Bad, Bid, Bik, Hrk e Bok) (Adams e Cory, 2001; Kuwana et al., 2005).

As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2). O equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula (Petros et al., 2004). Em células viáveis, o monômero Bax está localizado no citosol ou frouxamente ligado as membranas. Depois do sinal de morte, Bax transloca para a mitocôndria e se insere na membrana como uma proteína integral e forma um homodímero (Gross et al., 1998). Quase imediatamente após a translocação para a membrana mitocondrial, as Bax se concentram em focos submitocondriais (Nechushtan et al., 2001). As Baks também vão para esses focos. Bax e Bak induzem a morte celular através de permeabilização da membrana mitocondrial externa, que leva à liberação de moléculas pró-apoptóticas pequenas como citocromo c, fator indutor de apoptose (AIF) e smac/diablo (second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-Binding Protein with Low pI) (Du et al., 2000; Patterson et al., 2000). O colapso do potencial da membrana mitocondrial é considerado o ponto de não retorno na cascata de morte (Zamzami, 1995).

No citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9 (Li et al., 1997), o chamado apoptossomo. A apoptossomo promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa (Budihardjo et al., 1999). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que é uma caspase efetora (Gottlieb, 2000; Rupnarai et al., 2004; Petros et al., 2004).

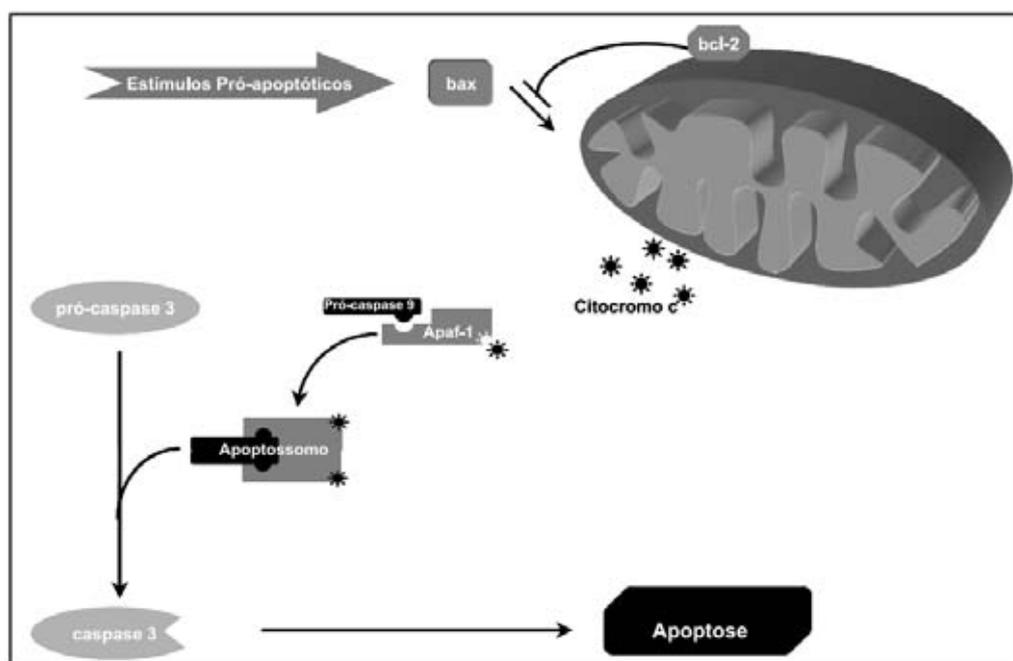


Figura 1: Modelo da via intrínseca de ativação da apoptose  
 Fonte: Grivicich et al., 2007

As proteínas inibidoras da apoptose (IAP) são moléculas que exercem seu papel antiapoptótico através da capacidade de inibir a atividade das caspases efetoras -3 e -7 e da caspase iniciadora -9. Após dano mitocondrial, a Smac/Diablo é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo c. O citocromo c liga-se à APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9, enquanto o Smac/Diablo remove as IAP de sua ligação inibitória com as caspases (Chai et al., 2000; Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000).

Mais recentemente, foi descrita a participação na via mitocondrial de uma flavoproteína conhecida por AIF (Susin et al., 1996). A AIF é uma flavoproteína intermembrana mitocondrial que pode ser liberada da mitocôndria e transportada para o núcleo em resposta a sinais específicos de morte (Daugas et al., 2000). No núcleo ela induz a condensação da cromatina e fragmentação do DNA em fragmentos de 50Kb, independente da ativação das caspases (Bröker et al., 2005; Susin et al., 1999). Uma das primeiras demonstrações claras de que a morte celular programada pode ser induzida de forma independente das caspases foi feita por Xiang, et al., 1996 que demonstrou que a inibição da atividade de caspases em células humanas leucêmicas da linhagem Jurkat não inibiu a indução da morte celular pela Bax mas apenas mudou a morfologia da apoptose na célula que estava morrendo (Xiang et al., 1996).



### 3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

Nesse trabalho foram estabelecidas as seguintes hipóteses e objetivos.

#### 3.1 HIPÓTESES

As hipóteses testadas nesse estudo foram:

1. A exposição de oócitos bovinos na fase de VG ao choque térmico desencadeia a morte celular por apoptose (aumento da fragmentação de DNA, aumento da atividade das enzimas caspases do grupo II e diminuição da atividade mitocondrial) e reduz a competência de desenvolvimento oocitária.
2. O IGF-I minimiza os danos induzidos pelo choque térmico em oócitos bovinos na fase de VG.

#### 3.2 OBJETIVOS

1. Estabelecer a condição de cultivo de oócitos bovinos capaz de bloquear de maneira reversível a progressão meiótica no estágio de VG.
2. Avaliar os efeitos do choque térmico e de diversas concentrações de IGF-I em oócitos VG na:
  - Porcentagem de fragmentação de DNA
  - Atividade de enzimas caspases do grupo II
  - Desenvolvimento embrionário pré-implantacional após fecundação e cultivo *in vitro*
  - Atividade mitocondrial



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DE OVÁRIOS E OÓCITOS

O projeto foi desenvolvido no laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ- USP). Os ovários foram transportados do abatedouro Angelelli localizado na cidade de Piracicaba em solução fisiológica estéril [0,9% (v/v) de NaCl contendo 100 unidades/ml de penicilina-G e 100 µg/ml de estreptomicina] a 37°C.

No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica estéril a 37°C para remoção de sangue e tecidos. Os CCOs foram coletados dos folículos de 2-8 mm de diâmetro pela técnica de fatiamento folicular (Paula-Lopes e Hansen, 2002). A coleta foi realizada em béqueres contendo meio de coleta de oócitos [MCO: *Tissue Culture Medium*-199 (TCM-199) suplementado com 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio, 100 unidades/mL de penicilina-G, 100 µg/mL de estreptomicina, 1% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 2 U/ml de heparina]. O conteúdo do béquer foi transferido para tubos Falcon de 50 ml e incubado por 10 minutos em banho maria a 37°C para decantar. Com uma pipeta Pasteur o sedimento foi retirado do tubo e filtrado em filtro de nylon de 100 µm. O filtro foi lavado várias vezes com MCO para retirada dos CCOs que ficaram retidos no mesmo. O material foi transferido para uma placa de Petri, e foi feita a busca dos oócitos sob estereomicroscópio para avaliação e classificação dos mesmos. Somente oócitos classificados como graus I e II (De Loos et al., 1991), contendo três ou mais camadas de células do cumulus e citoplasma uniforme, foram utilizados para os experimentos.

### 4.2 BLOQUEIO DA MEIOSE COM ROSCOVITINA

O inibidor meiótico roscovitina (Sigma, R7772- 5MG) foi preparado em solução estoque de 10 mM em dimetilsulfóxido (DMSO- Sigma, D5879- 5mg/ml). No momento do uso o estoque foi diluído para as concentrações experimentais finais. Os CCOs selecionados foram lavados 3 vezes em Meio Pré-MIV [Meio Pré-MIV:

TCM-199-HEPES contendo 10% (v/v) de SFB, 50 µg/mL de gentamicina e 0.2 mM de piruvato de sódio]. Grupos de 10 CCOs foram transferidos para gotas de 50 µl de Meio de Bloqueio [MB: TCM-199-Bicarbonato contendo roscovitina, 50 µg/mL de gentamicina, 0.2 mM de piruvato de sódio, 1 mg/mL de álcool polivinílico (PVA)] cobertas com óleo mineral por 14 horas a 38.5°C em 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.3 BLOQUEIO DA MEIOSE COM BUTIROLACTONA

A solução estoque de 5 mM do inibidor meiótico butirolactona I (Biomol, BML-CC210) foi preparada em TCM-199-Bicarbonato contendo 15% (v/v) de DMSO. No momento do uso o estoque foi diluído para as concentrações experimentais finais. Os CCOs selecionados foram lavados 3 vezes em Meio Pré-MIV. Grupos de 10 CCOs foram transferidos para gotas de 50 µl de Meio de Inibição Meiótica [MIM: TCM-199-Bicarbonato contendo butirolactona, 100 uM de cisteamina, 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio] cobertas com óleo mineral por 14 horas.

#### 4.4 DILUIÇÃO DO IGF-I

A solução estoque de 250 µg/ml do fator de crescimento semelhante à insulina-I recombinante humano (IGF-I, Up State 01-208) foi preparado em 0,1 M de ácido acético. No momento do uso o estoque foi diluído para as concentrações finais.

#### 4.5 COLORAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE OÓCITOS EM VGLACMÓIDE

Após 14 horas de incubação com o inibidor meiótico os CCOs foram desnudados por pipetagens repetidas para remoção completa das células do cumulus. Grupos de aproximadamente 10 oócitos desnudos foram transferidos para o centro de lâminas e montados em parafina-vaselina com lamínula. As laterais da lamínula foram seladas e as lâminas incubadas em solução de acetoalcol (25% de ácido acético glacial e 75% de etanol) por 48 horas a 4°C. Em seguida as lâminas

foram incubadas com corante lacmóide 0,004% (40% ácido acético, 60% água e 0,004% de lacmóide) por 10 minutos a temperatura ambiente seguido pela remoção do excesso de corante com solução de acetoalcol (25% de ácido acético glacial e 75% de etanol). As lâminas foram mantidas a 4°C até a leitura em microscópio de contraste de fase no aumento de 400X para determinação da proporção de oócitos no estágio de VG.

#### 4.6 COLORAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁDIO MEIÓTICO-HOECHST 33342

Os CCOs foram desnudados por pipetagens repetidas para remoção completa das células do cúmulus. Os oócitos desnudos foram incubados em gotas de 50 µl contendo 5 µg/ml de Hoechst 33342 em 10 mM de PBS (tampão fosfato-salino) por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de 50 µl de PBS contendo 1 mg/ml de PVP (polivinilpirrolidona) (PBS-PVP) e foram preparadas as lâminas para posterior leitura em microscópio de epifluorescência Olympus IX81 equipado com filtros FITC (Isoticianato de Fluresceína), TEXAS RED e DAPI.

#### 4.7 ENSAIO DE TUNEL

O ensaio de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) foi utilizado para identificação de fragmentos de DNA característicos do processo de apoptose. Neste ensaio o grupo 3'-OH do DNA fragmentado é marcado com FITC pela enzima deoxinucleotídeo transferase (Tdt), a qual catalisa a polimerização de nucleotídeos modificados no terminal 3'-OH.

Para realização deste ensaio os oócitos desnudos foram fixados em gotas de 100 µl de solução de fixação [4% (p/v) paraformaldeído em 0.2 M de PBS, pH 7.4] por 1 hora a temperatura ambiente. Os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de 50 µl de PBS-PVP. Após a fixação os oócitos foram armazenados a 4°C em eppendorf com 400 µl de PBS-PVP até o início do procedimento de TUNEL.

Para o ensaio de TUNEL os oócitos foram incubados em gotas de 100 µl de solução de permeabilização [0.1% (v/v) de Triton X-100 em PBS 10 mM] por 1 hora (para oócitos) ou 2 horas (para embriões) a temperatura ambiente e lavados 3 vezes em gotas de 50 µl de PBS-PVP. Os controles positivo e negativo foram incubados em gotas de 100 µl contendo 50 U/ml DNase livre de RNase a 37°C por 1 hora e lavados 3 vezes em gotas de 50 µl de PBS-PVP. A reação de TUNEL foi preparada aproximadamente 15 minutos antes do uso e mantida a 4°C como indicado pelo fabricante (*In Situ Cell Detection Kit, Fluorescein*: Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics; 1684795). Para tanto fez-se uso de 12,5 µl do frasco 1 (enzima Tdt) e 112,5 µl do frasco 2 (solução marcadora de *2-deoxiuridina-5-trifosfato marcado com FITC* (dUTP-FITC) para obter 125 µl de mistura para reação de TUNEL. Os grupos experimentais e o controle positivo foram incubados com 15 µl dessa solução por 1 hora a 37°C em câmara úmida no escuro. O controle negativo foi incubado em 15 µl da solução marcadora do frasco 2. Os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de 50 µl PBS-PVP e incubados em gotas de 50 µl contendo 5 µg/ml de Hoechst 33342 em 10 mM PBS por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de 50 µl PBS-PVP e foram preparadas as lâminas para posterior leitura em microscópio de epifluorescência. As lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência (Olympus IX81) no aumento de 400 vezes equipado com filtros FITC, TEXAS RED e DAPI.

#### 4.8 ENSAIO DE ATIVIDADE DE ENZIMAS CASPASES DO GRUPO II

O reagente PhiPhiLux-G<sub>1</sub>D<sub>2</sub> (Oncoimmunin) é um substrato específico para as enzimas caspases do grupo II (caspase -3, -7 e -2) pois contém a seqüência de aminoácidos DEVDGI reconhecida por este grupo de enzimas. Este reagente está ligado a uma sonda fluorescente de maneira que a ativação das enzimas caspases, em células em processo de apoptose, causa a catálise do substrato marcado e emissão do sinal de fluorescência em áreas do citoplasma celular.

Imediatamente após o final das 14 horas de incubação com o inibidor meiótico os CCOs foram desnudados por pipetagens repetidas para remoção completa das células do cúmulus em meio TCM-199-HEPES suplementado com 1 mg/ml de PVA aquecido. Os oócitos frescos foram lavados 3 vezes em gotas de 50 µl de TCM-199-

HEPES-PVA e incubadas em gotas de 15 µl de TCM-199-HEPES-PVA contendo 5 µM de PhiPhiLux-G<sub>1</sub>D<sub>2</sub> por 40 minutos à 39°C protegido da luz. Os oócitos para controle negativo foram incubadas em gotas de 15 µl de TCM-199-HEPES-PVA. As amostras foram lavadas 3 vezes em gotas de 50 µl em TCM-199-HEPES-PVA. Em seguida foram preparadas as lâminas para leitura da atividade de caspases em microscópio de fluorescência (Olympus IX81) no aumento de 400 vezes equipado com filtros FITC, TEXAS RED e DAPI. Fotografias digitais de cada oócito foram obtidas e armazenadas como arquivos .tiff. As imagens foram submetidas à análise utilizando o programa livre Image J versão 1.43 e foram classificadas como alta e baixa atividade de caspases do grupo II. Para tanto a área de cada oócito foi circundada manualmente com ferramenta circular para delimitar a “região in interesse” (ROI).

#### 4.9 ENSAIO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL

O reagente MitoTracker Red CMX-Ros (Invitrogen M7512) atravessa a membrana celular e, no citosol, é transportado pela membrana mitocondrial até a matriz mitocondrial, onde é oxidado pela atividade mitocondrial, adquirindo fluorescência vermelha. Este produto permite a identificação e quantificação de mitocôndrias ativas.

Imediatamente após o final das 14 horas de incubação com o inibidor meiótico os CCOs foram desnudados por pipetagens repetidas para remoção completa das células do cúmulus em meio TCM-199-HEPES-PVA aquecido. Os oócitos frescos foram incubados em 200 µl do meio TCM-199-HEPES-PVA contendo 50 nM do MitoTracker Red CMX-Ros durante 15 min à 37°C. Em seguida os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de 50 µl de TCM-199-HEPES-PVA e foram preparadas as lâminas para leitura da quantificação da atividade mitocondrial em microscópio de fluorescência. As lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência (Olympus IX81) no aumento de 400X equipado com filtros FITC, TEXAS RED e DAPI. Fotografias digitais de cada oócito foram obtidas e armazenadas como arquivos .tiff. As imagens foram submetidas à análise utilizando o programa livre Image J versão 1.43. Para tanto a área de cada oócito foi circundada manualmente com ferramenta circular para delimitar a ROI. Em seguida foi realizada a

quantificação da intensidade de pixel (média, mínima e máxima) por unidade de área desta região.

#### 4.10 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

Após o período de inibição meiótica os CCOs foram lavados 3 vezes em Meio Pré-MIV. Grupos de 10 CCOs foram transferidos para gotas de 50 µl de Meio de Maturação [Meio MIV: TCM-199-Bicarbonato contendo 10% (v/v) de SFB, 50 µg/mL de gentamicina, 0.2 mM de piruvato de sódio, 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 10 µg/mL de hormônio luteinizante (LH) e 1 µg/ml de estradiol 17-β] cobertas com óleo mineral por 22 a 24 horas a 38.5°C em 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.11 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Os meios de fecundação TALP (*Tyrode's albumin-lactate-pyruvate*) foram utilizados para purificação do sêmen e FIV. Após a MIV, grupos de 10 oócitos foram lavados em uma placa com Meio Pré-FIV [TCM-199-HEPES contendo 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 50 µg/mL de gentamicina, 0.2 mM de piruvato de sódio] e transferidos para gotas de 90 µl de Meio FIV [FERT-TL contendo 6 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 50 µg/mL de gentamicina, 0.2 mM de piruvato de sódio e 0.01 mg/mL de heparina). O sêmen foi purificado em gradiente de Percoll 90:45% por centrifugação. Os oócitos foram fecundados com 1 X 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL.

#### 4.12 CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

Cerca de oito horas após a fecundação, os presumíveis zigotos foram desnudados por pipetagens repetida e lavados 3 vezes em gotas de 50 µl de meio de cultivo para embriões KSOM modificado (*Potassium simplex optimized médium*) [suplementado com 10% (v/v) de SFB, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 0,25 µl/ml de gentamicina]. Grupos de 20 presumíveis zigotos foram transferidos para gotas de 50 µl de meio de cultivo KSOM modificado a 38.5°C em 5% de CO<sub>2</sub>.

## 4.13 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

### 4.13.1 Experimento 1: Modelo de inibição meiótica- roscovitina

Este experimento visou estabelecer a concentração de roscovitina capaz de inibir a progressão meiótica oocitária por 14h. Para tanto foram avaliadas 5 concentrações de roscovitina (50, 75, 100, 150 ou 200  $\mu\text{M}$ ). Em cada réplica, os CCOs foram aleatoriamente distribuídos nos grupos Controle 0 hora (CCOs processados para coloração com Hoechst 33342 imediatamente após a coleta) ou bloqueio meiótico. Para o bloqueio meiótico grupos de 10 CCOs foram cultivados *in vitro* em gotas de 50  $\mu\text{l}$  de MB contendo 0, 50, 75, 100, 150 ou 200  $\mu\text{M}$  de roscovitina. Após as 14 horas os CCOs foram desnudados por pipetagens repetidas em PBS-PVP e submetidos à coloração com Hoechst 33342 para determinação da porcentagem de oócitos VG (N= 5 réplicas utilizando 90-94 CCOs/tratamento, total= 556 CCOs).

### 4.13.2 Experimento 2: Modelo de inibição meiótica- butirolactona

Este experimento visou estabelecer a concentração de butirolactona e a condição de cultivo capaz de inibir de forma eficiente e reversível a progressão meiótica oocitária por 14 horas. Para tanto foi delineado experimento fatorial 5 x 2 no qual foram avaliadas 5 concentrações de butirolactona (0, 12,5, 25, 50 ou 100  $\mu\text{M}$ ) e 2 condições de cultivo (0 ou 3 mg/ml de BSA). Em cada réplica, os CCOs foram aleatoriamente distribuídos nos grupos Controle 0 hora (CCOs processados para coloração com lacmóide imediatamente após a coleta) ou bloqueio meiótico. Para o bloqueio meiótico grupos de 10 CCOs foram cultivados *in vitro* em gotas de 50  $\mu\text{l}$  de MIM suplementado com 0 ou 3 mg/ml de BSA contendo 0; 12,5; 25; 50 ou 100  $\mu\text{M}$  de butirolactona por 14 horas. Após as 14 horas os CCOs foram distribuídos em dois grupos sendo uma parte dos oócitos desnudados e processados para coloração com lacmóide visando à determinação da porcentagem de oócitos em VG (N= 5 réplicas utilizando 18-55 CCOs/tratamento, total= 435 CCOs) e uma parte submetida à MIV por 24 horas visando à avaliação da reversibilidade do bloqueio (N= 5 réplicas utilizando 48-59 CCOs/tratamento, total 484 CCOs). Após a MIV os CCOs foram

desnudados e submetidos à coloração com Hoechst 33342 para determinação da porcentagem de oócitos em MII.

#### 4.13.3 Experimento 3: Efeito do IGF-I na fragmentação de DNA induzida pelo choque térmico em oócitos bovinos no estágio de VG

O presente estudo visou determinar o efeito de diferentes concentrações de IGF-I na indução de apoptose induzida pelo choque térmico em oócitos bovinos no estágio de VG. Para tanto foi delineado experimento fatorial 5 x 2 no qual foram avaliadas 5 concentrações de IGF-I (0, 12,5, 25, 50 e 100 ng/ml de IGF-I) e 2 temperaturas (38,5 e 41°C). O modelo de bloqueio meiótico de escolha para todos os experimentos posteriores, baseado nos resultados dos experimentos 1 e 2, foi MIM contendo 12,5 µM de butirolactona na ausência de BSA. Os CCOs foram submetidos aos tratamentos Controle (14 horas a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>) e Choque Térmico (14 horas a 41°C e 7% CO<sub>2</sub>) em MIM contendo 0; 12,5; 25; 50 e 100 ng/ml de IGF-I. Em seguida os CCOs foram transferidos para meio MIV padrão a 38,5°C por 10 horas. Após este período os CCOs foram desnudados mecanicamente por pipetagens repetidas e processados para o ensaio de TUNEL como previamente descrito. Em cada réplica foram realizados controles adicionais: Controle MIV em que os oócitos foram maturados *in vitro* por 24 horas sem passar pelo bloqueio meiótico e o Controle VG em que foi avaliada a eficiência do bloqueio meiótico pela determinação da porcentagem de oócitos em VG após 14 horas de inibição. Para tanto, 10 oócitos de 4 tratamentos aleatórios foram desnudados após 14 horas de bloqueio meiótico e corados com Hoechst 33342. Foram realizadas 6 réplicas utilizando 81-111 CCOs/tratamento (total= 974 CCOs). Porcentagem média de oócitos VG= 93,7%.

#### 4.13.4 Experimento 4: Efeito do IGF-I na atividade de enzimas caspases do grupo II em oócitos bovinos no estágio de VG expostos ao choque térmico

Este experimento visou determinar o efeito de diferentes concentrações de IGF-I na atividade de caspases do grupo II em oócitos bovinos no estágio de VG submetidos ao choque térmico. Para tanto foi delineado experimento fatorial 3 x 2 no

---

qual foram avaliadas 3 concentrações de IGF-I (0; 12,5 e 100 ng/ml de IGF-I) e 2 temperaturas (38,5 e 41°C). Os CCOs foram submetidos aos tratamentos Controle (14 horas a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>) e Choque Térmico (14 horas a 41°C e 7% CO<sub>2</sub>) em MIM (12,5 µM de butirolactona) acrescido de 0; 12,5 e 100 ng/ml de IGF-I. Em seguida os CCOs foram desnudados e processados para avaliação da atividade de enzimas caspases como previamente descrito. Em cada réplica foi também avaliada a eficiência do bloqueio meiótico pela determinação da porcentagem de oócitos em VG após 14 horas de inibição. Para tanto, 10 oócitos de 3 tratamentos aleatórios foram desnudados após 14 horas de bloqueio meiótico e corados com Hoechst 33342. Foram realizadas 5 réplicas utilizando 63-96 CCOs/tratamento (total= 484 CCOs). Porcentagem média de oócitos VG= 87,9%.

#### 4.13.5 Experimento 5: Efeito do IGF-I na competência de oócitos bovinos no estágio de VG expostos ao choque térmico.

Este experimento visou determinar o efeito de diferentes concentrações de IGF-I na competência de oócitos bovinos no estágio de VG submetidos ao choque térmico. Para tanto foi delineado experimento fatorial 3 x 2 no qual foram avaliadas 3 concentrações de IGF-I (0; 12,5 e 100 ng/ml de IGF-I) e 2 temperaturas (38,5 e 41°C). Os CCOs foram submetidos aos tratamentos Controle (14 horas a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>) e Choque Térmico (14 horas a 41°C e 7% CO<sub>2</sub>) em MIM (12,5 µM de butirolactona) acrescido de 0; 12,5 e 100 ng/ml de IGF-I. Em seguida os CCOs foram submetidos a MIV, FIV e CIV a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em cada réplica foram realizados controles adicionais: Controle MIV em que os oócitos foram maturados *in vitro* por 24 horas sem passar pelo bloqueio meiótico e o Controle VG em foi avaliado a eficiência do bloqueio meiótico pela determinação da porcentagem de oócitos em VG após 14 horas de inibição. Para tanto, 10 oócitos de 3 tratamentos aleatórios foram desnudados após 14 horas de bloqueio meiótico e corados com Hoechst 33342. A porcentagem de clivagem foi determinada no dia 3 e a porcentagem de blastocisto nos dias 8 e 9 após a fecundação. Os blastocistos no dia 9 foram processados para ensaio de TUNEL e determinação do número total de blastômeros por blastocisto como previamente descrito. Foram realizadas 5 réplicas

utilizando 108-128 CCOs/tratamento (total= 833 CCOs). Porcentagem média de oócitos em VG= 88,2%.

#### 4.13.6 Experimento 6: Efeito do IGF-I na atividade mitocondrial de oócitos bovinos no estágio de VG expostos ao choque térmico.

Este experimento visou determinar o efeito do IGF-I na atividade mitocondrial de oócitos bovinos no estágio de VG submetidos ao choque térmico. Para tanto foi delineado experimento fatorial 2 x 2 no qual foram avaliadas 2 concentrações de IGF-I (0 e 12,5 ng/ml de IGF-I) e 2 temperaturas (38,5 e 41°C). Os CCOs foram submetidos aos tratamentos Controle (14 horas a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>) e Choque Térmico (14 horas a 41°C e 7% CO<sub>2</sub>) em MIM (12,5 µM de butirolactona) acrescido de 0 e 12,5 ng/ml de IGF-I. Em seguida os CCOs foram desnudados e processados para avaliação da atividade mitocondrial como previamente descrito. Em cada réplica foi também avaliada a eficiência do bloqueio meiótico pela determinação da porcentagem de oócitos em VG após 14 horas de inibição. Para tanto, 10 oócitos de 2 tratamentos aleatórios foram desnudados após 14 horas de bloqueio meiótico e corados com Hoechst 33342. Foram realizadas 6 réplicas utilizando 88-116 CCOs/tratamento (total= 402 CCOs). Porcentagem média de oócitos VG= 91,9%.

#### 4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram previamente avaliados quanto às premissas para análise de variância (homogeneidade das variáveis e normalidade dos resíduos) utilizando o pacote estatístico SAS (SAS, 1989). As variáveis que não atenderam às premissas da análise de variância foram inicialmente submetidas às transformações estatísticas (logaritmo, raiz quadrada e arco-seno) e, quando necessário, analisadas por testes não paramétricos. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância pelo método dos quadrados mínimos utilizando o procedimento PROC GLM e PROC MIXED do pacote estatístico SAS. As variáveis dependentes foram porcentagem de oócitos em MI, porcentagem de clivagem, porcentagem de blastocisto total, porcentagem de blastocisto expandido, número total de blastômeros (transformado para raiz quadrada) e porcentagem de blastômeros

TUNEL-positivo (transformado para logaritmo). As variáveis independentes foram temperatura, IGF-I e réplica. O modelo estatístico usado para cada experimento considerou os efeitos principais e todas as possíveis interações. Foi utilizado o procedimento pdiff para estabelecer as comparações significativas entre médias. Os dados não paramétricos foram avaliados pelos testes Kruskal-Wallis e Wilcoxon. As medianas foram obtidas utilizando o procedimento PROC MEANS do pacote estatístico SAS. As variáveis dependentes foram porcentagem de oócitos em VG, porcentagem de oócitos em MII, porcentagem de oócitos TUNEL-positivo, porcentagem de oócitos com alta atividade de caspase e atividade mitocondrial e a variável independente foi tratamento.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXPERIMENTO 1- MODELO DE INIBIÇÃO MEIÓTICA- ROSCOVITINA

Este experimento visou determinar a eficiência de diferentes concentrações de roscovitina (200; 150; 100; 75 e 50  $\mu\text{M}$ ) no bloqueio da meiose em oócitos bovinos durante o período de 14 horas.

Imagem representativa obtida com microscopia de fluorescência ilustrando o oócito bovino no estágio de VG submetido a coloração com Hoechst 33342 está demonstrada na Figura 2. A seta indica a marcação do DNA da VG. A eficácia do bloqueio meiótico foi baixa para todas as concentrações de roscovitina testadas. A porcentagem de oócitos em VG não diferiu entre as diferentes doses de roscovitina (Figura 3). Entretanto, todas as concentrações de roscovitina avaliadas apresentaram taxa de bloqueio mais baixas ( $P < 0,05$ ) que o controle 0 hora em que os oócitos foram avaliados imediatamente após a coleta dos mesmos do folículo antral (Figura 3).

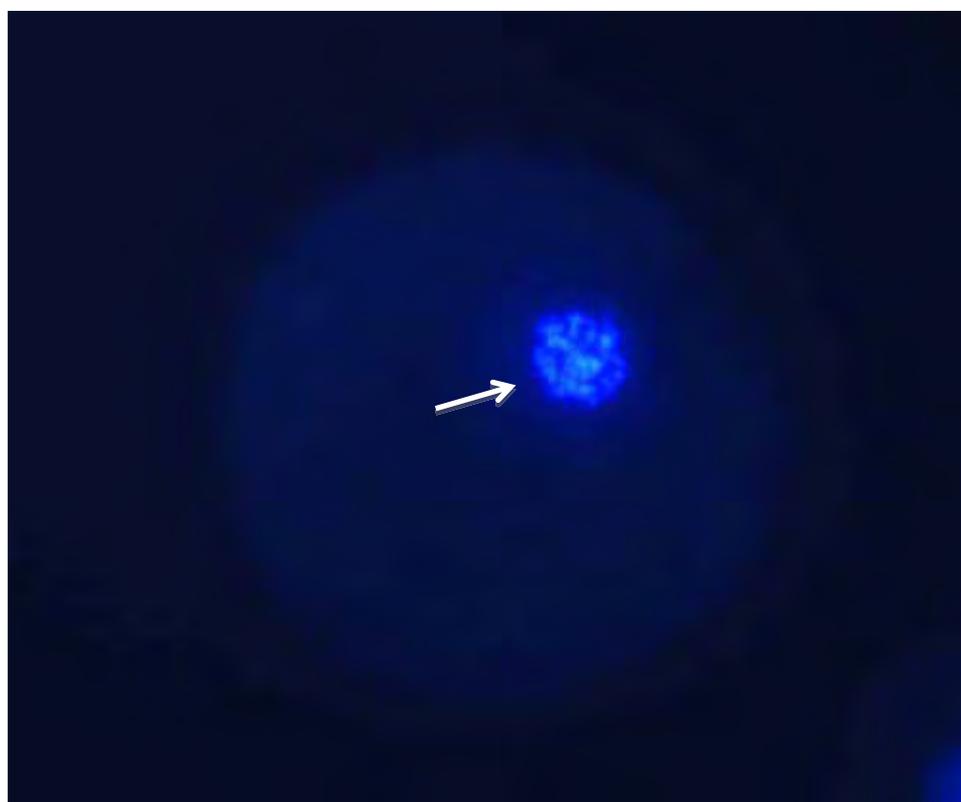


Figura 2: Imagem representativa obtida com microscopia de fluorescência ilustrando o oócito bovino em VG corado com Hoechst 33342. A seta indica o DNA.

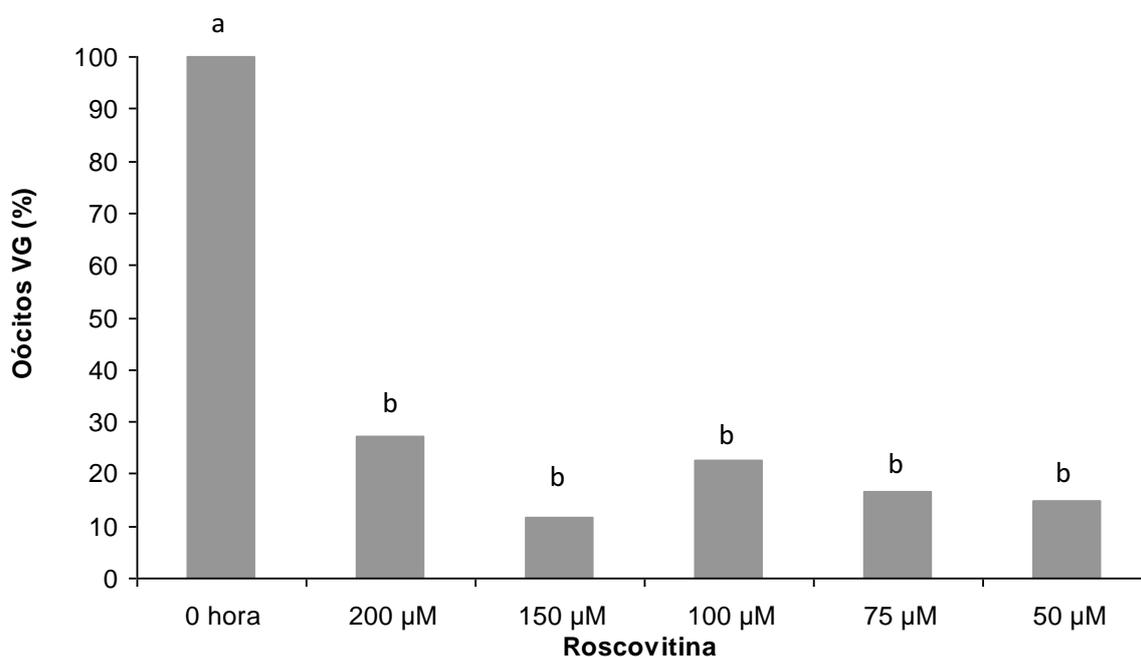


Figura 3: Efeito de diferentes concentrações do inibidor meiótico roscovitina por 14 horas na porcentagem de oócitos em VG. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.

## 5.2 EXPERIMENTO 2- MODELO DE INIBIÇÃO MEIÓTICA- BUTIROLACTONA

A baixa taxa de oócitos em VG obtida no experimento 1 com o uso do inibidor meiótico roscovitina levou a realização de experimentos adicionais para o estabelecimento do modelo de bloqueio meiótico. Para tanto foram avaliadas diferentes concentrações do inibidor meiótico butirolactona (100; 50; 25; 12,5 e 0 µM) e duas condições de cultivo (0 ou 3 mg/ml de BSA) no bloqueio meiótico em oócitos bovinos por 14 horas. Foi avaliada também a capacidade de reversão meiótica oocitária após 14 horas de bloqueio meiótico seguido de 24 horas de MIV.

Imagem representativa obtida com microscopia de contraste de fase ilustrando o oócito bovino no estágio de VG submetido à coloração com lacmóide está demonstrada na Figura 4. A seta indica a marcação da vesícula germinativa. A taxa de bloqueio meiótico dos oócitos cultivados em meio MIM sem butirolactona foi reduzida ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle 0 hora, em que os oócitos foram avaliados imediatamente após a coleta dos mesmos do folículo antral (Figura 5).

A taxa de bloqueio meiótico dos oócitos cultivados em meio MIM na presença de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  de butirolactona sem BSA foi maior ( $P < 0,05$ ) do que aqueles cultivados em meio MIM sem butirolactona e BSA. De maneira similar, as doses 50 e 100  $\mu\text{M}$  de butirolactona sem BSA tenderam ( $P = 0,07$ ) a aumentar a taxa de bloqueio meiótico em relação ao meio MIM sem butirolactona e BSA. No entanto, os oócitos cultivados em meio MIM com 12,5; 25; 50 e 100  $\mu\text{M}$  de butirolactona na presença de BSA apresentaram taxa de VG maior ( $P < 0,05$ ) que aqueles cultivados em meio MIM sem butirolactona com BSA (Figura 5).

Não foi observada diferença entre as diversas concentrações de butirolactona (100; 50; 25 e 12,5  $\mu\text{M}$ ) e o controle 0 hora na porcentagem de oócitos em VG na presença ou ausência de BSA, exceto para a dose de 12,5  $\mu\text{M}$  de butirolactona com BSA em que foi observada menor ( $P < 0,05$ ) proporção de oócitos em VG quando comparado ao controle 0 hora. Esta menor porcentagem de bloqueio do tratamento 12,5  $\mu\text{M}$  em meio com BSA foi similar aos tratamentos 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , independente da presença da BSA (Figura 5).

Não houve efeito de BSA entre as diferentes concentrações de butirolactona, exceto para o tratamento 12,5  $\mu\text{M}$  de butirolactona em que a taxa de VG foi menor ( $P < 0,05$ ) no tratamento com BSA quando comparado ao sem BSA (Figura 5).



Figura 4: Imagem representativa obtida com microscopia de contraste de fase ilustrando o oócito bovino no estágio de VG submetido à coloração com lacmóide.

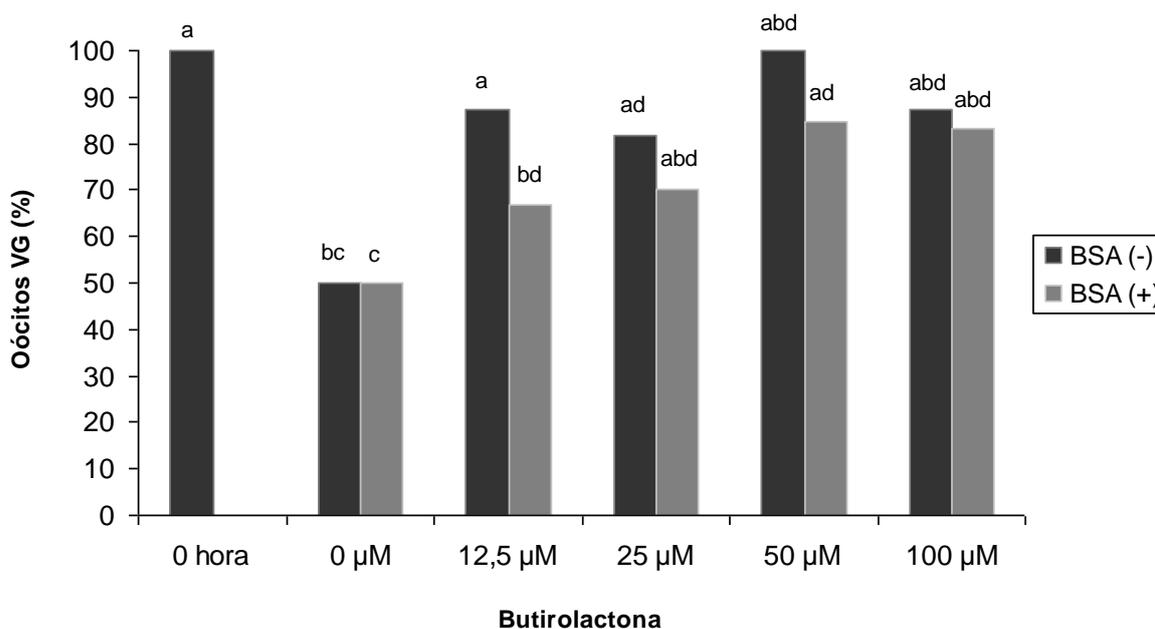


Figura 5: Efeito do inibidor meiótico butirolactona por 14 horas na porcentagem de oócitos em VG corados com lacmóide. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.

Após 14 horas de bloqueio meiótico os oócitos foram cultivados por 24 horas em meio MIV para determinar reversibilidade do bloqueio. Imagem representativa obtida com microscopia de fluorescência ilustrando o oócito bovino no estágio de MII submetido à coloração com Hoechst 33342 está demonstrada na Figura 6. A seta indica a marcação do DNA da placa metafásica e o asterisco indica o corpúsculo polar. O bloqueio meiótico foi revertido de forma eficiente como demonstrado na Figura 7. A porcentagem de oócitos em MII foi similar entre as várias concentrações de butirolactona, com e sem BSA, e o grupo controle em que os oócitos foram maturados *in vitro* sem prévio bloqueio meiótico (grupo MIV padrão), exceto na concentração de 100 µM de butirolactona sem BSA. Na ausência de BSA, a dose mais alta de 100 µM de butirolactona exerceu efeito tóxico demonstrado pela ausência de reversão do bloqueio meiótico ( $P < 0,05$ ) (Figura 7).

Com base nestes resultados o modelo de inibição meiótica estabelecido fez uso da dose de 12,5 µM de butirolactona na ausência de BSA. Este modelo foi utilizado para todos os demais experimentos.

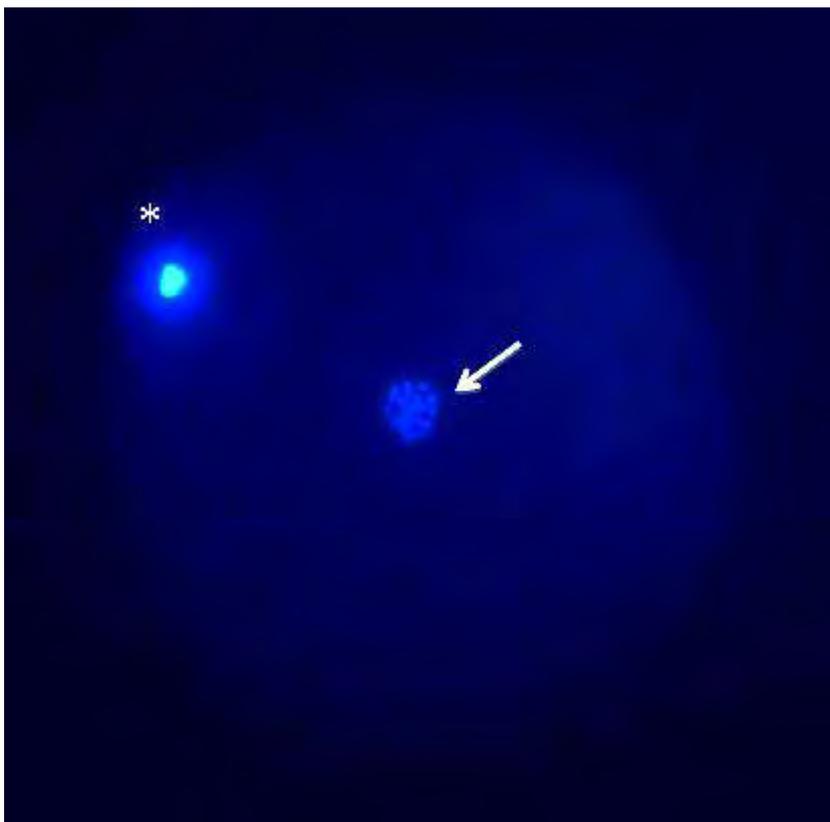


Figura 6: Imagem representativa obtida com microscopia de fluorescência ilustrando o ócito bovino em MII corado com Hoechst 33342. A seta indica o DNA e \* o corpúsculo polar.

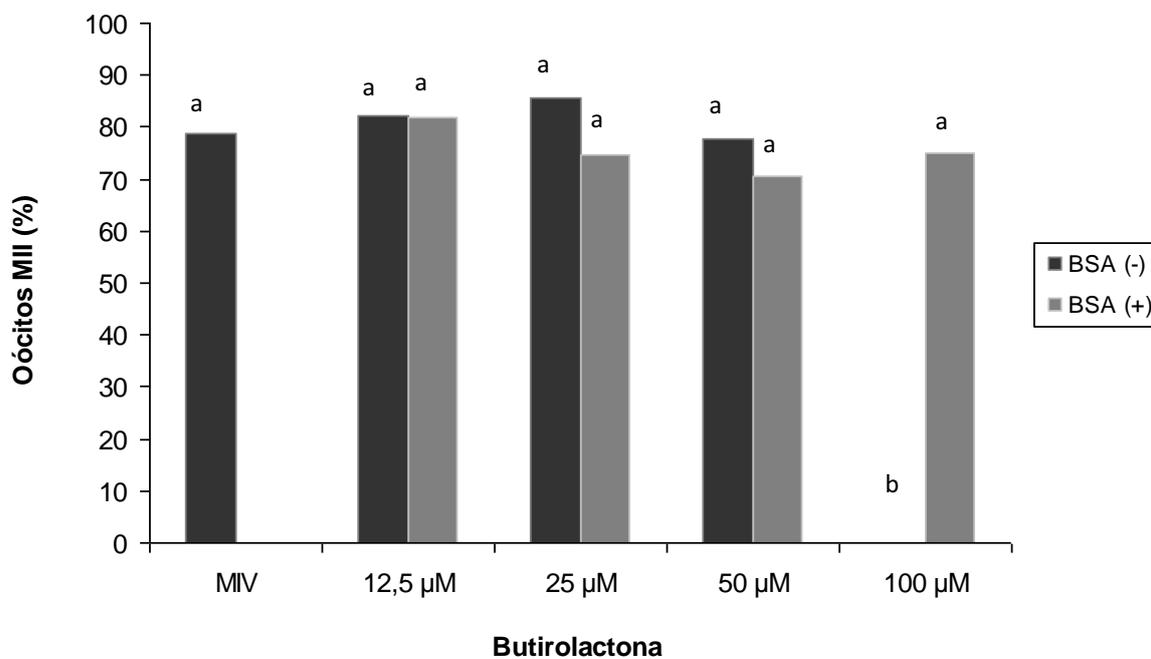


Figura 7: Reversão meiótica (porcentagem de MII) após 14 horas de incubação com o inibidor butirolactona seguido de 24 horas de MIV. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.

---

### 5.3 EXPERIMENTO 3- EFEITO DO IGF-I NA FRAGMENTAÇÃO DE DNA INDUZIDA PELO CHOQUE TÉRMICO EM OÓCITOS BOVINOS NO ESTÁDIO DE VG

Nesse experimento foi avaliado o efeito de diversas concentrações de IGF-I (0; 12,5; 25; 50 e 100  $\mu$ M) na fragmentação de DNA induzida pelo choque térmico em oócitos bovinos no estágio de VG.

Imagens representativas obtidas com microscopia de fluorescência ilustrando oócitos VG TUNEL-positivo (A) e TUNEL-negativo (B) para estão demonstradas na Figura 8. Na ausência de IGF-I o choque térmico de 41°C por 14 horas aumentou ( $P < 0,05$ ) a incidência de oócitos TUNEL-positivo quando comparado ao controle 38,5°C. Na presença das diferentes doses de IGF-I, entretanto, não houve diferença na porcentagem de oócitos TUNEL-positivo entre os grupos controle e choque térmico (Figura 9).

Nas concentrações mais baixas (12,5 e 25 ng/ml) o IGF-I tendeu a reduzir ( $P = 0,07$ ) a porcentagem de oócitos TUNEL-positivo após o cultivo a 41°C por 14 horas quando comparado aos oócitos expostos ao choque térmico sem IGF-I. Este efeito termoprotetor do IGF-I não foi observado nas doses mais altas (50 e 100 ng/ml) (Figura 9).

Em oócitos cultivados a 38,5°C a adição de 25 ng/ml de IGF-I aumentou ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de oócitos TUNEL-positivo em relação ao grupo 0 ng/ml de IGF-I (Figura 9). Além disso, a exposição de oócitos VG ao choque térmico de 41°C na presença de 50 ng/ml de IGF-I aumentou ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de oócitos TUNEL-positivo quando comparado ao controle 38,5°C sem IGF-I. A proporção de oócitos TUNEL-positivo do grupo controle laboratorial (MIV) não diferiu dos demais grupos experimentais (Figura 9).

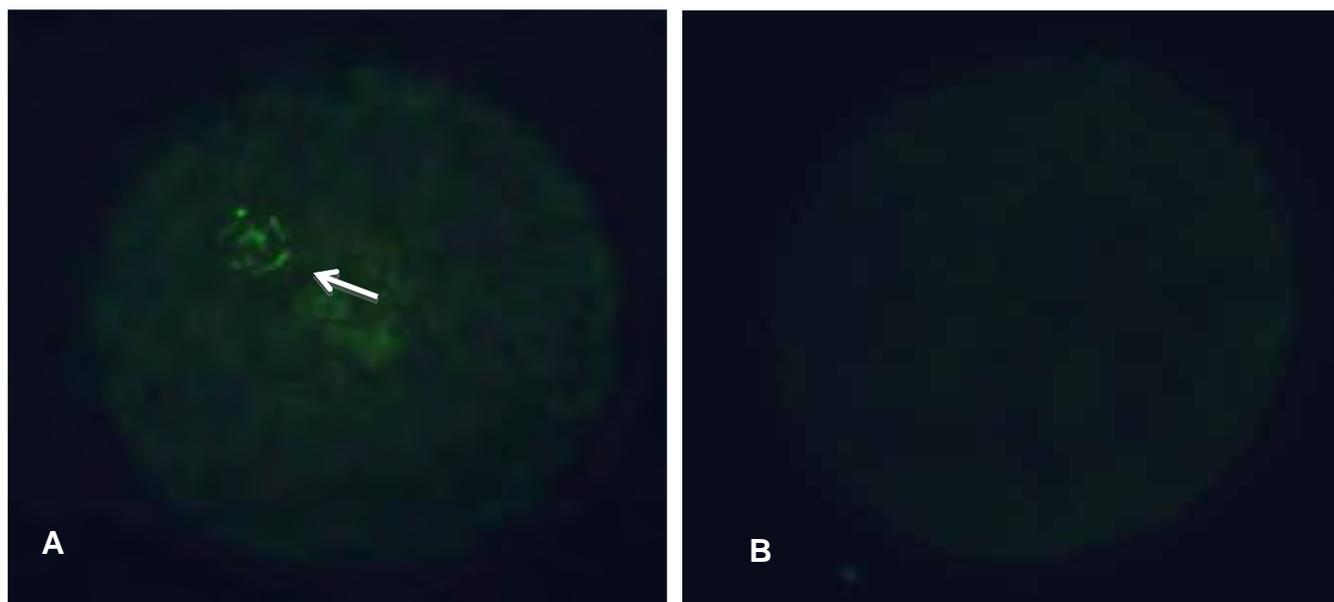


Figura 8: Imagens representativas de oócitos (A) TUNEL-positivo e (B) TUNEL-negativo obtidas com microscopia de fluorescência. A seta indica marcação positiva para TUNEL.

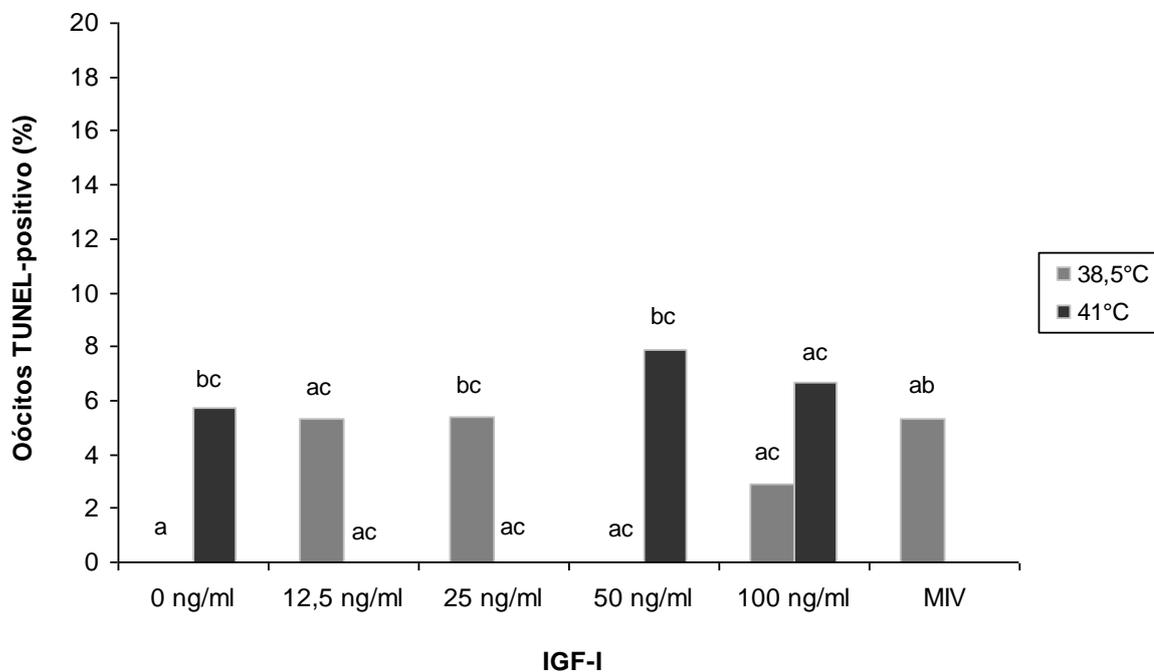


Figura 9: Efeito do choque térmico e do IGF-I na porcentagem de oócitos positivos para TUNEL após 14 horas de bloqueio e 10 horas de maturação. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.

A progressão meiótica oocitária foi avaliada após 14 horas de bloqueio meiótico seguido de 10 horas de MIV. A Figura 10 é uma imagem representativa do oócito bovino no estágio de MI submetido à coloração com Hoechst 33342. A seta indica a marcação do DNA da placa metafásica. A porcentagem de oócitos em MI foi afetada pela temperatura. O choque térmico reduziu ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de oócitos em MI (Figura 11).

Na ausência de IGF-I o choque térmico não alterou a porcentagem de oócitos em MI em relação ao controle  $38,5^{\circ}\text{C}$ . No entanto, choque térmico na ausência de IGF-I diminuiu ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de oócitos em MI em relação aos tratamentos 50 e 100 ng/ml de IGF-I cultivados a  $38,5^{\circ}\text{C}$  (Figura 12). A exposição de oócitos bovinos ao choque térmico na presença de 25 e 100 ng/ml de IGF-I reduziu ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de oócitos em MI quando comparado aos grupos controle  $38,5^{\circ}\text{C}$  na presença de 0; 12,5 e 25 ng/ml (Figura 12).

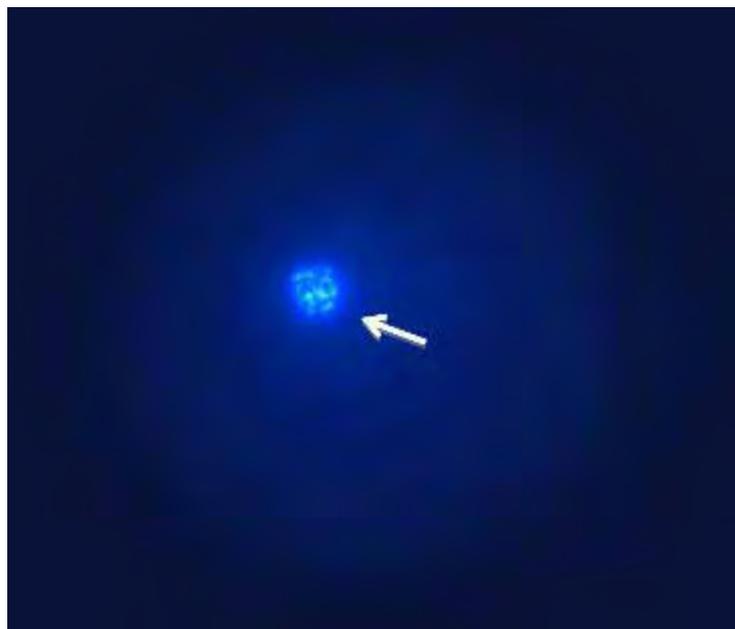


Figura 10: Imagem representativa de oócito bovinos em MI obtida com microscopia de fluorescência. A seta indica o DNA da placa metafásica.

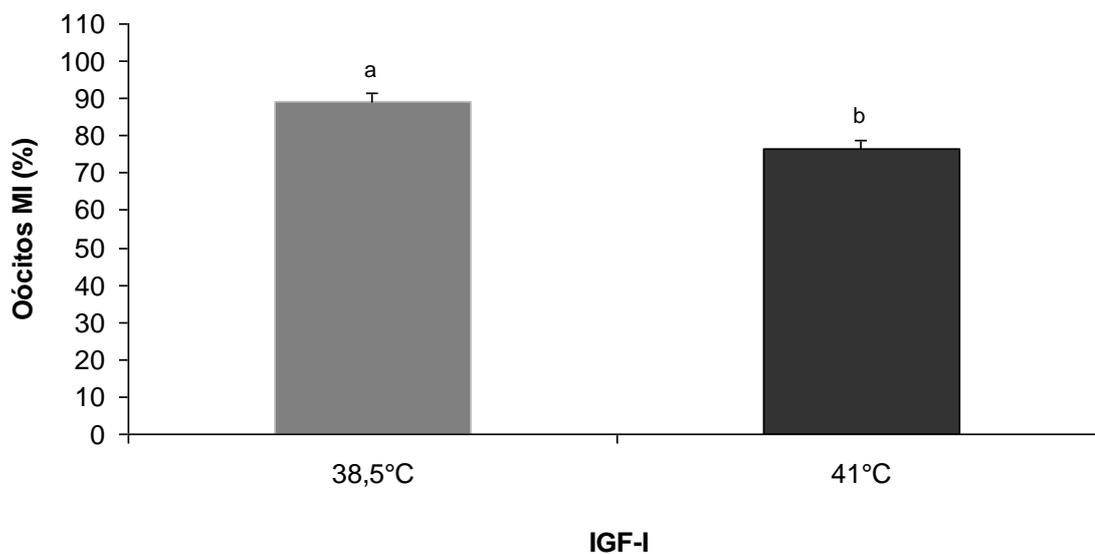


Figura 11: Efeito do choque térmico na porcentagem de oócitos em MI. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM.

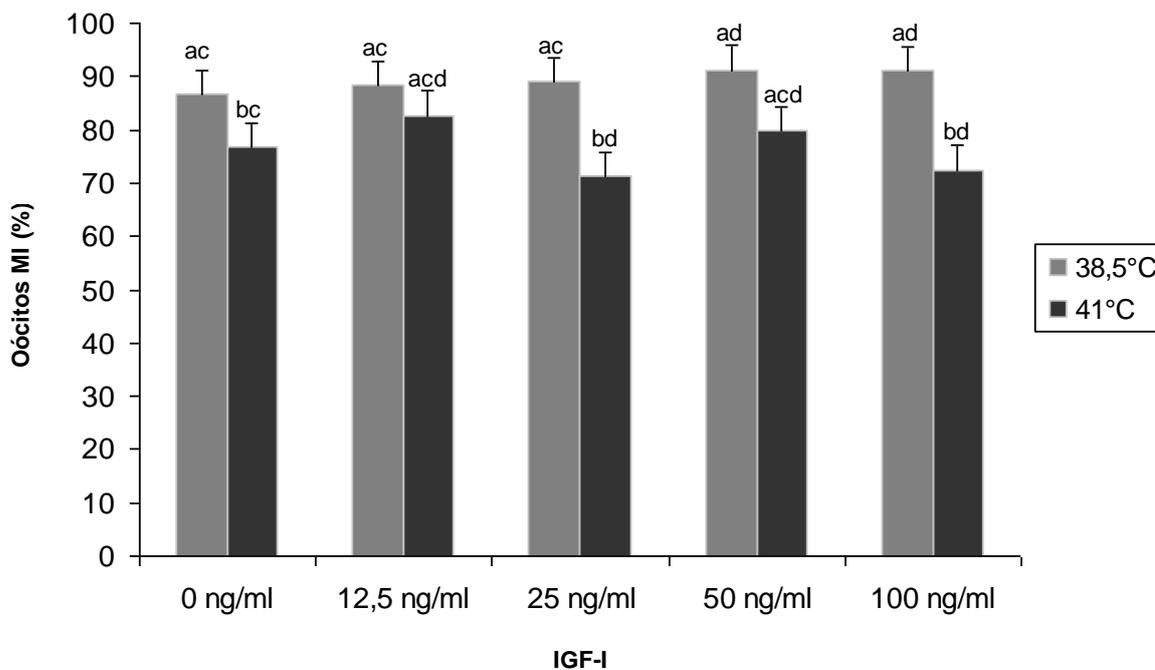


Figura 12: Efeito do choque térmico e do IGF-I na porcentagem de oócitos em MI. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM.

#### 5.4 EXPERIMENTO 4- EFEITO DO IGF-I NA ATIVIDADE DE ENZIMAS CASPASES DO GRUPO II EM OÓCITOS BOVINOS NO ESTÁDIO DE VG EXPOSTOS AO CHOQUE TÉRMICO

Nesse experimento foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de IGF-I (0; 12,5 e 100 ng/ml) em oócitos bovinos no estágio de VG submetidos ao choque térmico na atividade de caspases do grupo II.

Imagens representativas de oócitos bovinos no estágio de VG com alta (A) e baixa (B) atividade de caspases estão demonstradas na Figura 13. Não houve efeito do choque térmico e das diferentes concentrações de IGF-I na porcentagem de oócitos com alta ou baixa atividade de caspases do grupo II (Figura 14).

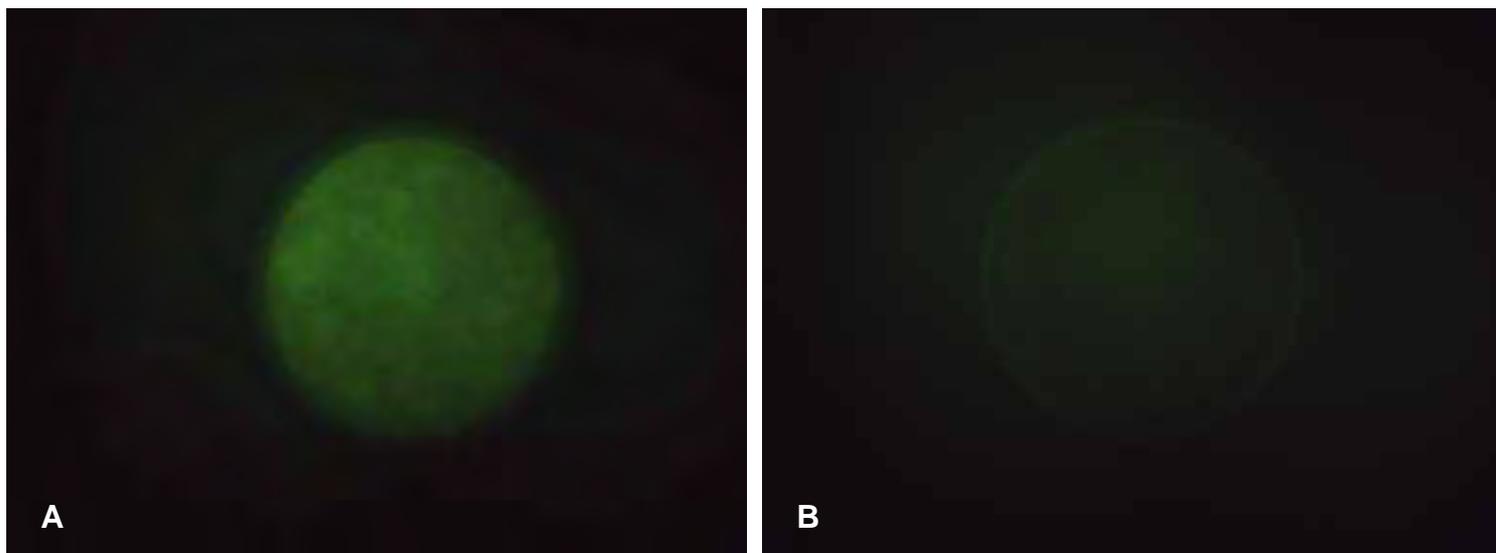


Figura 13: Imagens representativas de oócitos VG com alta (A) e baixa (B) atividade de caspases do grupo II obtidas com microscopia de fluorescência.

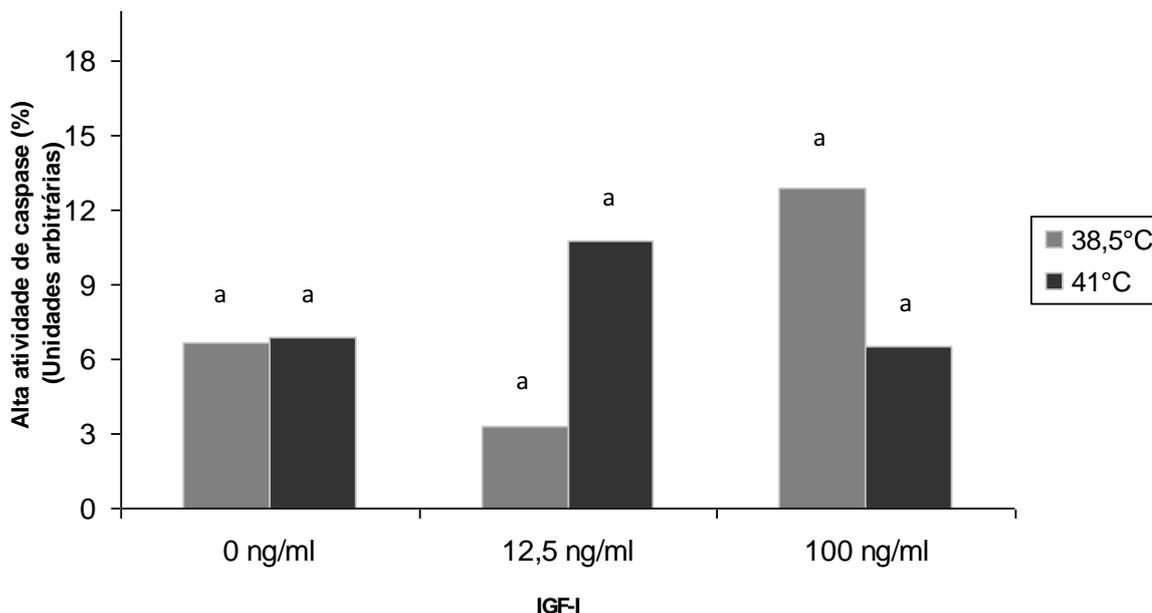


Figura 14: Efeito do choque térmico e do IGF-I na porcentagem de oócitos com alta atividade de caspases do grupo II. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.

## 5.5 EXPERIMENTO 5- EFEITO DO IGF-I NA COMPETÊNCIA DE OÓCITOS BOVINOS NO ESTÁDIO DE VG EXPOSTOS AO CHOQUE TÉRMICO

Este experimento avaliou o efeito de diversas concentrações de IGF-I na competência de oócitos bovinos no estágio de VG submetidos ao choque térmico.

A porcentagem de clivagem foi afetada pela temperatura. O aumento da temperatura durante 14 horas de bloqueio meiótico diminuiu ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de oócitos que clivaram (Figura 15).

Na ausência do IGF-I o choque térmico não alterou a porcentagem de clivagem quando comparado ao controle 38,5°C. No entanto, o choque térmico sem IGF-I diminuiu ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de clivagem quando comparado aos grupos 12,5 e 100 ng/ml de IGF-I cultivados a 38,5°C. Na presença de 100 ng/ml de IGF-I o choque térmico diminuiu ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de clivagem quando comparado aos tratamentos 12,5 e 100 ng/ml de IGF-I a 38,5°C (Figura 16).

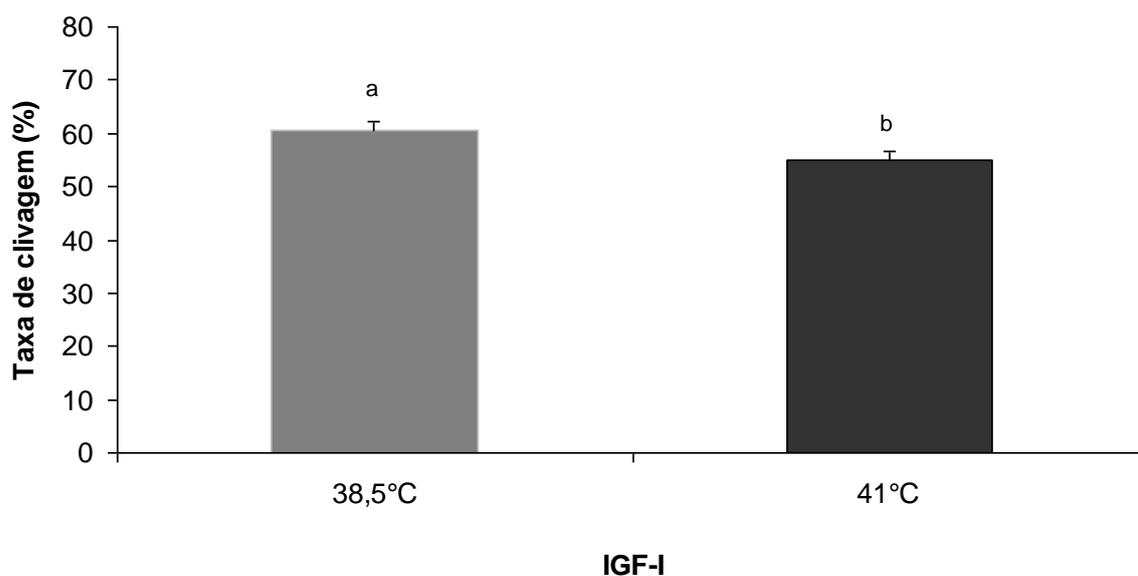


Figura 15: Efeito do choque térmico na porcentagem de clivagem de oócitos bovinos no estágio de VG. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM.

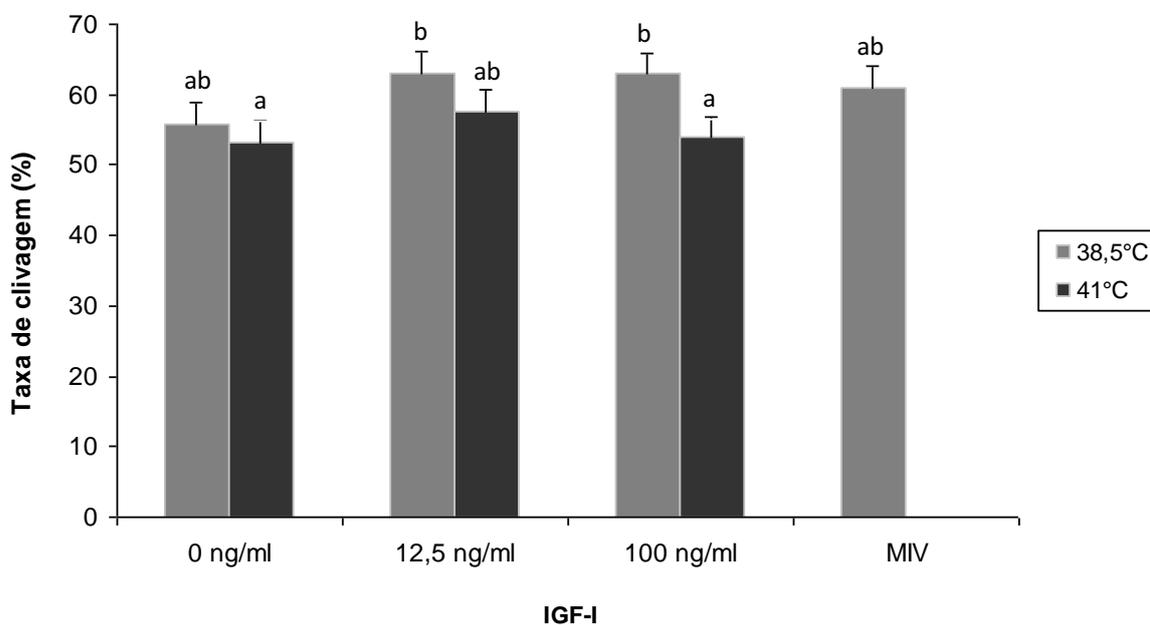


Figura 16: Efeito do choque térmico e do IGF-I na porcentagem de clivagem de oócitos bovinos no estágio de VG. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM.

Na ausência de IGF-I o choque térmico diminuiu ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de oócitos VG que atingiu o estágio de blastocisto aos oito dias de cultivo (D8) quando comparado ao controle  $38,5^{\circ}\text{C}$ . Esse efeito negativo causado pelo aumento da temperatura na ausência de IGF-I não foi observado quando os oócitos VG foram tratados com  $12,5 \text{ ng/ml}$  de IGF-I, demonstrando efeito termoprotetor dessa concentração de IGF-I. Quando oócitos VG foram submetidos ao choque térmico na presença de  $12,5 \text{ ng/ml}$  de IGF-I houve aumento ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto e blastocisto expandido no D8 quando comparado ao grupo choque térmico sem IGF-I (Figuras 17 e 18). No entanto, a dose mais alta de  $100 \text{ ng/ml}$  de IGF-I não reverteu o efeito negativo causado pelo choque térmico. Na presença de  $100 \text{ ng/ml}$  de IGF-I o choque térmico de  $41^{\circ}\text{C}$  diminuiu a taxa de blastocisto D8 quando comparado aos tratamentos 0 e  $100 \text{ ng/ml}$  de IGF-I a  $38,5^{\circ}\text{C}$  ( $P \leq 0,05$ ) e  $12 \text{ ng/ml}$  de IGF-I a  $41^{\circ}\text{C}$  ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 17).

O tratamento com  $100 \text{ ng/ml}$  de IGF-I a  $38,5^{\circ}\text{C}$  apresentou maior ( $P < 0,05$ ) taxa de desenvolvimento embrionário D8 quando comparado ao grupo  $0 \text{ ng/ml}$  de IGF-I a  $41^{\circ}\text{C}$  (Figura 17).

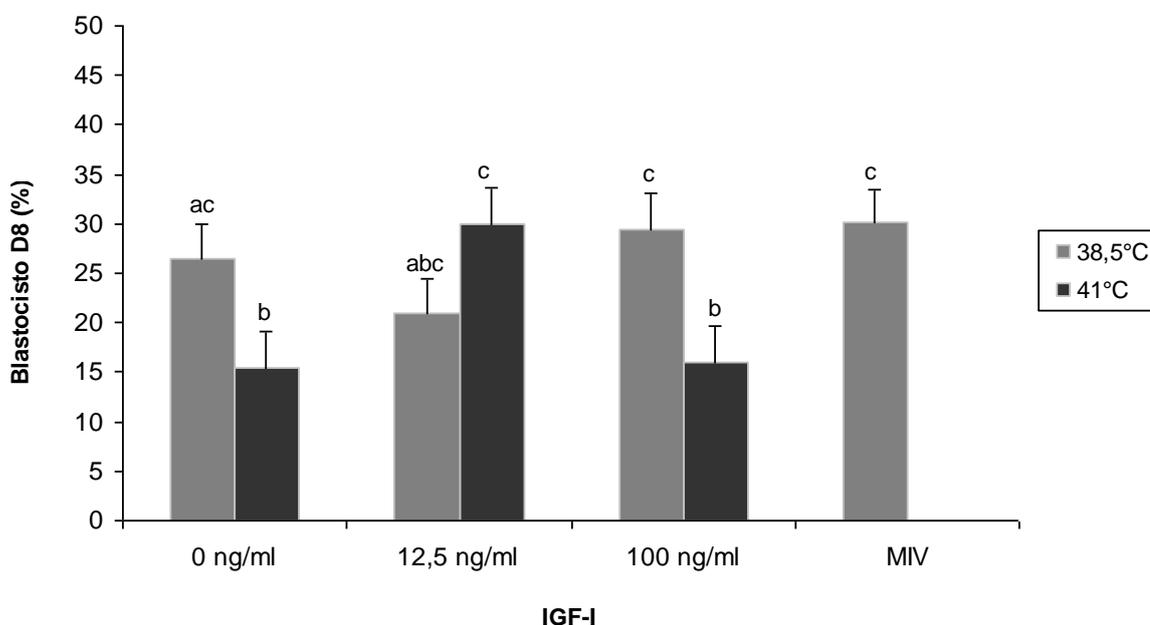


Figura 17: Efeito do choque térmico e do IGF-I em oócitos VG submetidos a MIV, FIV e CIV na porcentagem de blastocistos D8. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM.

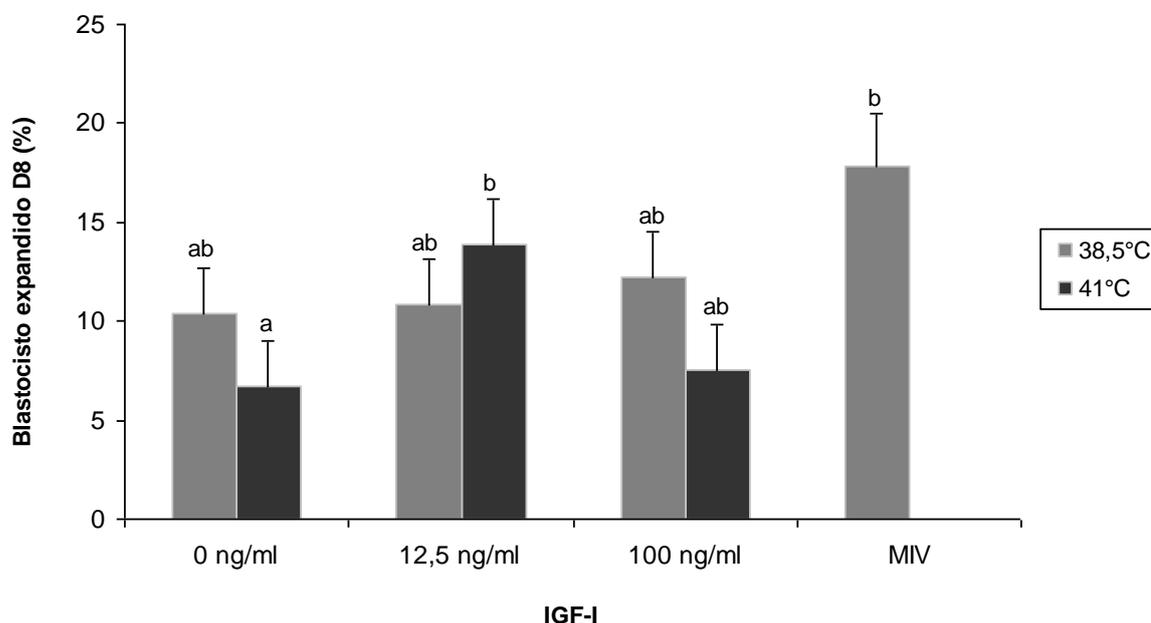


Figura 18: Efeito do choque térmico e do IGF-I em oócitos VG submetidos a MIV, FIV e CIV na porcentagem de blastocistos expandidos D8. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM.

Na ausência de IGF-I o choque térmico diminuiu ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de oócitos VG que atingiu o estágio de blastocisto aos nove dias de cultivo (D9) quando comparado ao controle 38,5°C. Esse efeito negativo causado pelo choque térmico na ausência de IGF-I não foi observado quando os oócitos VG foram tratados com 12,5 ng/ml de IGF-I. Quando oócitos VG foram submetidos ao choque térmico na presença de 12,5 ng/ml de IGF-I houve aumento ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de oócitos que atingiu o estágio de blastocisto no D9 quando comparado ao grupo choque térmico sem IGF-I. No entanto, a dose mais alta de 100 ng/ml de IGF-I não reverteu o efeito negativo causado pelo choque térmico. Na presença de 100 ng/ml de IGF-I o choque térmico de 41°C diminuiu a taxa de blastocisto no D9 quando comparado aos tratamentos 0 ng/ml de IGF-I a 38,5°C ( $P < 0,05$ ) e 12 ng/ml de IGF-I a 41°C ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 19).

Na ausência de IGF-I o choque térmico diminuiu ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de oócitos VG que atingiu o estágio de blastocisto eclodido no D9 quando comparado ao tratamento 12 ng/ml de IGF-I cultivado a 38,5°C. A exposição de oócitos VG ao choque térmico na presença de 12,5 ng/ml de IGF-I tendeu ( $P=0,08$ ) a aumentar a

taxa de blastocisto eclodido quando comparado ao choque térmico de 41°C na ausência de IGF-I (Figura 20).

A taxa de blastocisto D8 e D9 do grupo controle laboratorial (MIV) foi similar aos demais tratamentos a 38,5°C, apresentando maior porcentagem de blastocisto apenas quando comparado aos tratamentos 0 (P< 0,05) e 100 ng/ml de IGF-I a 41°C (P< 0,05) (Figuras 17 e 19). Da mesma forma, a taxa de blastocisto expandidos e blastocisto eclodidos do grupo controle laboratorial (MIV) foi similar aos demais tratamentos a 38,5°C, apresentando maior porcentagem de blastocisto expandidos e blastocisto eclodidos apenas quando comparado aos tratamentos 0 ng/ml de IGF-I a 41°C (P< 0,05) (Figuras 18 e 20).

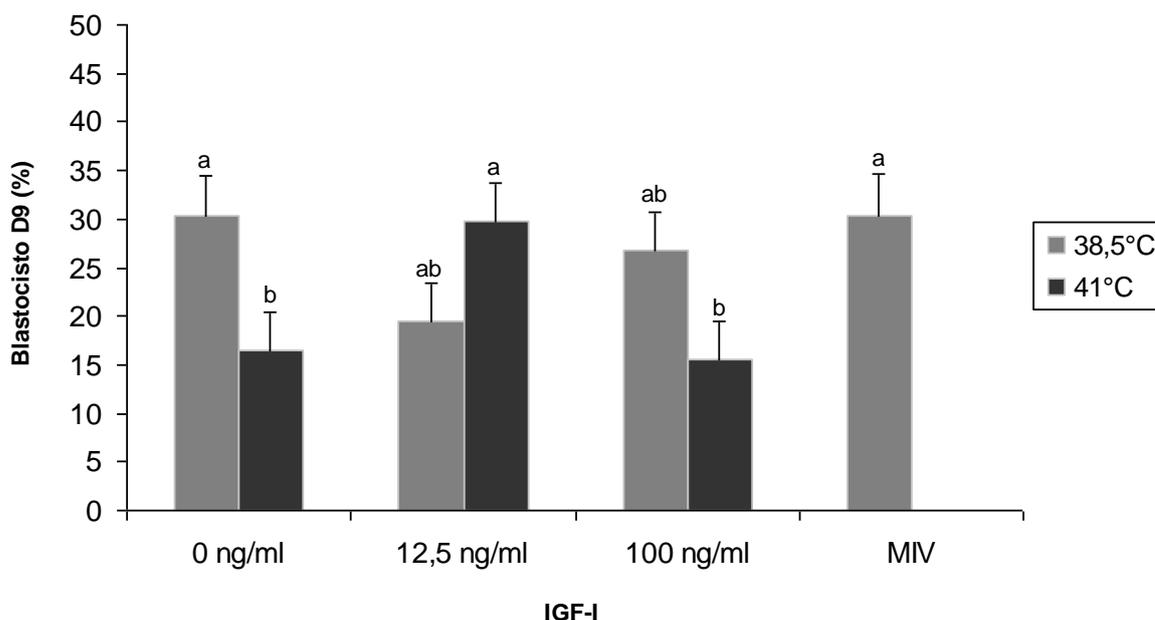


Figura 19: Efeito do choque térmico e do IGF-I em oócitos VG submetidos a MIV, FIV e CIV na porcentagem de blastocistos D9. Letras diferentes sobscritas em cada barra representam diferença significativa (P < 0,05). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM.

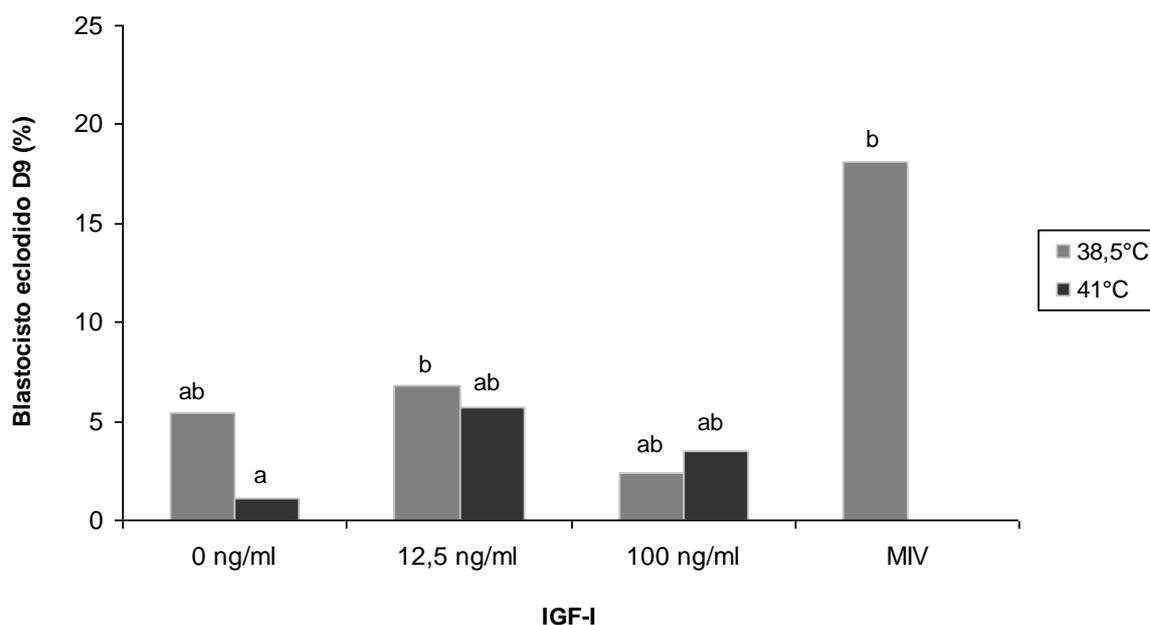


Figura 20: Efeito do choque térmico e do IGF-I em óocitos VG submetidos a MIV, FIV e CIV na porcentagem de blastocistos eclodidos D9. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são medianas.

O número total de células por blastocistos no D9 não foi afetado por temperatura ou IGF-I. Entretanto, o grupo controle laboratorial (MIV) apresentou maior número de células ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos, exceto ao tratamento 0 ng/ml IGF-I cultivado a 38,5°C (Figura 21).

A porcentagem de blastômeros TUNEL-positivo não foi afetada por temperatura. No entanto, a porcentagem de blastômeros positivos para TUNEL aumentou no tratamento 12 ng/ml ( $P < 0,05$ ) e houve uma tendência no tratamento 100 ng/ml ( $P = 0,06$ ) a 38,5°C quando comparados ao tratamento choque térmico sem IGF-I. No grupo controle laboratorial (MIV) a taxa de blastômeros positivo para TUNEL não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 22).

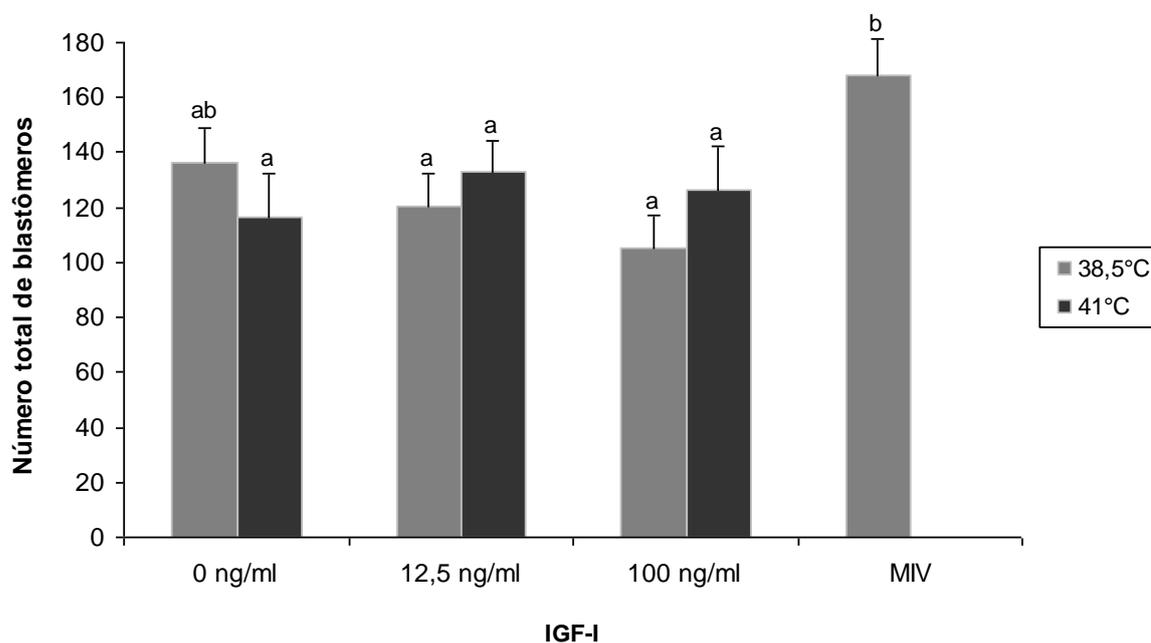


Figura 21: Efeito do choque térmico e do IGF-I em relação ao número total de blastômeros por embrião. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM.

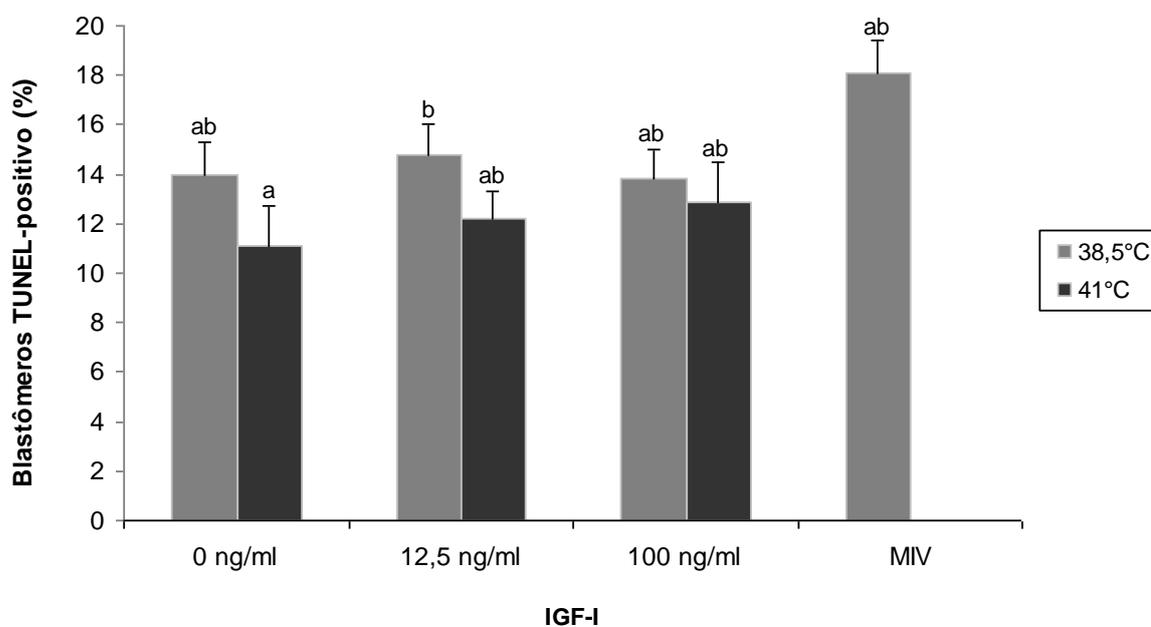


Figura 22: Efeito do choque térmico e do IGF-I em relação a porcentagem de embriões TUNEL-positivo. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Resultados são médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM.

## 5.6 EXPERIMENTO 6- EFEITO DO IGF-I NA ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE OÓCITOS BOVINOS NO ESTÁDIO DE VG EXPOSTOS AO CHOQUE TÉRMICO

Este experimento avaliou o efeito das concentrações 0 e 12,5 ng/ml de IGF-I na atividade mitocondrial em oócitos bovinos no estágio de VG submetidos ao choque térmico.

Imagens representativas obtidas com microscopia de fluorescência de oócitos bovinos no estágio de VG submetidos ao ensaio de mitotracker red estão demonstradas na Figura 24. Na ausência de IGF-I o choque térmico diminuiu ( $P < 0,05$ ) a atividade mitocondrial quando comparado ao controle 38,5°C. No entanto, o cultivo de oócitos VG na presença de 12 ng/ml de IGF-I reverteu ( $P < 0,05$ ) o efeito negativo causado pelo choque térmico na atividade mitocondrial. A atividade mitocondrial deste grupo experimental (41°C- 12 ng/ml) foi similar ao grupo controle (38,5°C- 0 ng/ml) sem IGF-I (Figura 23).

O tratamento com 12,5 ng/ml de IGF-I em oócitos cultivados a 38,5°C tendeu a aumentar ( $P = 0,06$ ) a atividade mitocondrial em relação aos oócitos do tratamento 0 ng/ml de IGF-I e submetidos ao choque térmico, entretanto não diferiu dos oócitos tratados com 0 ng/ml de IGF-I cultivados a 38,5°C (Figura 23).

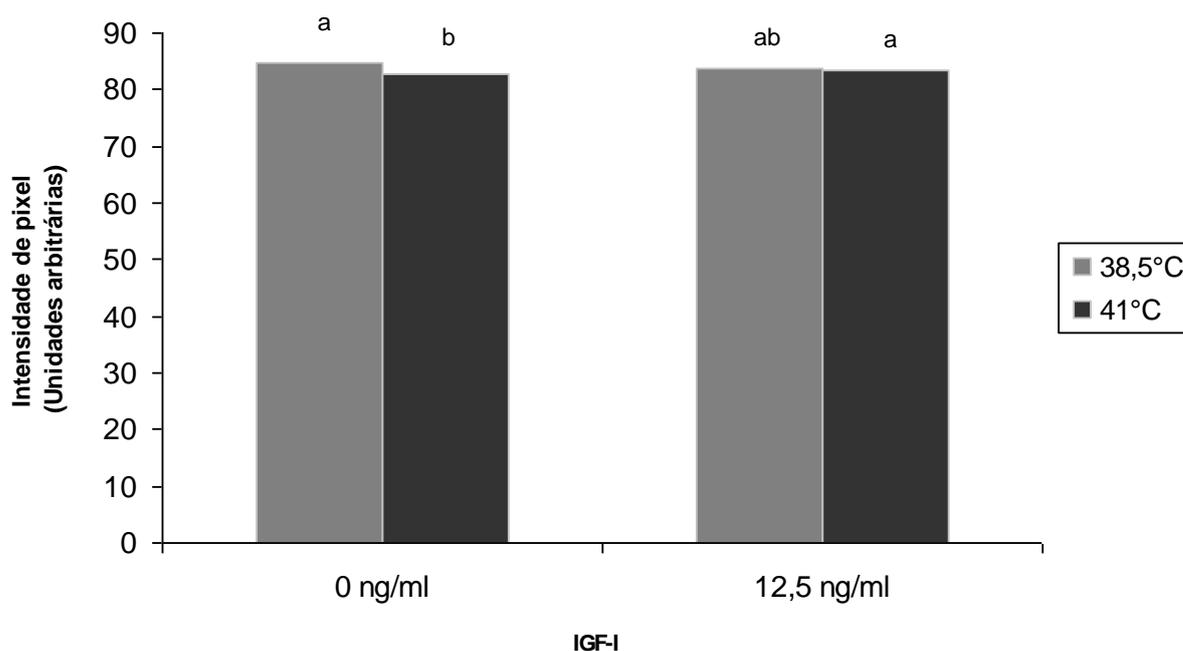


Figura 23: Efeito do choque térmico e do IGF-I na atividade mitocondrial. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados são medianas.

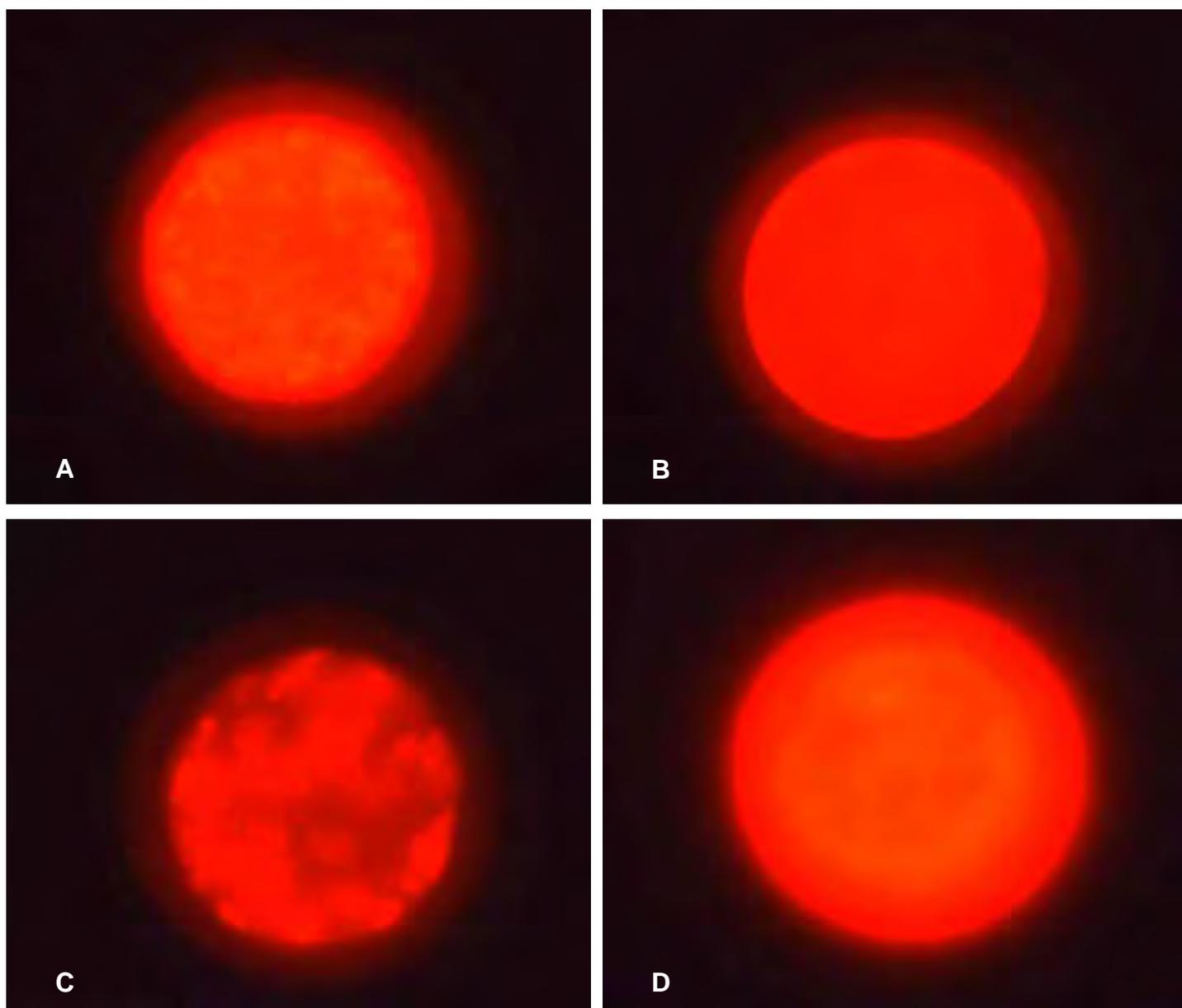


Figura 24: Imagens representativas de oócitos VG submetidos ao ensaio de mitotracker red obtidas com microscopia de fluorescência. Oócitos tratados com 0 ng/ml IGF-I a 38,5°C (A), 12,5 ng/ml IGF-I a 38,5°C (B), 0 ng/ml de IGF-I a 41°C (C) e 12,5 ng/ml IGF-I a 41°C (D).



## 6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de modelos *in vitro* para estudo dos efeitos diretos da temperatura em oócitos VG é de difícil abordagem, pois a remoção de oócitos do seu ambiente folicular priva os mesmos dos fatores inibitórios e possibilita a retoma a meiose até o estágio MII (Pincus e Enzmann, 1935). Dessa forma, a primeira etapa do presente estudo visou desenvolver o modelo de bloqueio meiótico *in vitro* para avaliação dos efeitos diretos da temperatura em oócitos VG. Para tanto foram testadas concentrações crescentes de roscovitina que inibe de forma específica e reversível a atividade da subunidade catalítica (p34<sup>cdc2</sup>/CDK1) do MPF (Mermillod et al., 2000; Ponderato 2002; Kubelka 2000, Adona 2008 a, b). A eficiência do bloqueio meiótico com 50, 75, 100, 150 e 200 µM roscovitina foi baixa em todas as concentrações testadas. Ao final do período de 14 horas a porcentagem de oócitos em VG foi reduzida. Estes resultados estão de acordo com literatura recente em que a eficiência do bloqueio meiótico com roscovitina é controverso.

A baixa eficiência do bloqueio meiótico com roscovitina foi demonstrada em diferentes espécies. Barretto et al., (2007) demonstraram que a porcentagem de oócitos bovinos em VG foi de 32,4% após 16 horas de cultivo em 25 µM de roscovitina. Em suínos, a inibição de oócitos em VG com 10-50 µM de roscovitina não foi eficaz resultando em taxas de bloqueio de 19-34%, respectivamente. No entanto, quando concentrações mais altas foram testadas houve aumento na porcentagem de oócitos em VG de 83–91% para as doses de 80–120 µM (Ju et al., 2003). Em ovinos, o uso de 100 µM de roscovitina não inibiu, mas atrasou a progressão meiótica por um período de 24 horas. Nesse experimento, 18% dos oócitos estavam em quebra da vesícula germinativa, 36% em MI e 24% chegaram em MII após 24 horas de cultivo (Crocomo et al., 2010).

O bloqueio meiótico com roscovitina é modulado de maneira dose-dependente (Mermillod et al., 2000; Ju et al., 2003; Coy et al., 2005; Albarracín et al., 2005). Quando oócitos bovinos foram cultivados na presença de concentrações crescentes (12,5; 25; 50 e 100 µM) de roscovitina por 24 horas a concentração de 25 µM já foi suficiente para induzir bloqueio meiótico máximo de 83% (Mermillod et al., 2000). Da mesma forma, Coy et al., 2005 demonstraram que concentrações de 12,5; 25 e 50 µM/I S-roscovitina por 24 horas resultou em 52; 87,6; 96,8% dos oócitos em VG. O cultivo de oócitos de novilhas prepuberes com doses crescentes de

roscovitina apresentou taxas de bloqueios dose-dependente. As doses de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  de roscovitina mativeram 2,9 e 18,8% dos oócitos em VG, enquanto que em doses mais altas como 50 e 100  $\mu\text{M}$  a taxa de bloqueio foi de 64,6 e 63,2%, respectivamente (Albarracín et al., 2005).

A eficiência do bloqueio meiótico com roscovitina parece depender do tipo de meio e condições de cultivo utilizadas, além de outros fatores ainda não esclarecidos. O uso de hormônios ou SFB no meio de inibição meiótica está relacionado a uma menor taxa de bloqueio (Barreto et al., 2007; Albarracín et al., 2005), porém, no presente experimento a roscovitina não inibiu a progressão meiótica mesmo em meio definido baseado em TCM-199-bicarbonato contendo 1 mg/ml de PVA.

Visto que a roscovitina apresentou baixa taxa de bloqueio, outro bloqueador meiótico testado foi a butirolactona, que inibe seletivamente as quinases CDK2 e CDK1 (Kitagawa et al., 1993). Estas enzimas desempenham importantes funções na progressão celular da fase G1 para S e da fase G2 para a fase M, respectivamente, em células de mamíferos (Kitagawa et al., 1993).

Para o estabelecimento do modelo de bloqueio meiótico foram avaliadas diferentes concentrações de butirolactona (0; 12,5, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) e duas condições de cultivo (0 ou 3 mg/ml BSA) durante o período de 14 horas. Nesse experimento, todas as concentrações de butirolactona foram igualmente eficientes em manter os oócitos em VG, exceto a dose mais baixa de 12,5  $\mu\text{M}$  de butirolactona na presença de BSA. Estes resultados estão de acordo com o que foi descrito por Kubelka et al. 2000 e Adona et al. 2008 (b) em que a indução do bloqueio meiótico com butirolactona foi dependente da concentração do inibidor e da condição de cultivo. A presença de BSA no meio exigiu doses mais altas de butirolactona para manter o bloqueio meiótico, sendo esta dose maior do que aquela necessária para manter o bloqueio em meio contendo PVA. De maneira similar, quando as concentrações de 100, 50 e 25  $\mu\text{M}$  de butirolactona foram avaliadas em meio com BSA foi observado efeito dose-resposta do inibidor. No entanto, quando concentrações mais baixas de 10, 15, 20 e 25  $\mu\text{M}$  de butirolactona foram avaliadas em meio sem BSA, todas as concentrações testadas foram igualmente eficientes em manter os oócitos em VG, demonstrando o papel modulador da BSA na ação da droga (Adona et al., 2008 (b)). Os autores sugerem que a butirolactona pode se ligar ao BSA, reduzindo a disponibilidade deste fator no meio (Kubelka et al., 2000).

No presente estudo o meio de inibição meiótica na ausência de butirolactona induziu cerca de 50% de bloqueio meiótico demonstrando o papel da condição de cultivo no bloqueio. Outro estudo realizado recentemente também demonstrou que o uso de meio definido ( $\alpha$ -MEM suplementado com PVA, insulina, IGF-1, androstenediona, aminoácidos não essenciais, transferrina e selênio de sódio) foi capaz de bloquear a progressão meiótica com 70% de oócitos em VG após 24 horas de cultivo sem a adição de nenhum bloqueador meiótico (Oliveira e Silva et al., 2011).

Uma vez determinada a dose de butirolactona e condição de cultivo necessária para manter alta porcentagem de oócitos VG, experimentos foram conduzidos para avaliar a reversibilidade do bloqueio meiótico. Nesse experimento observou-se que as taxas de maturação nuclear (porcentagem de MII) foram similares para todos os tratamentos testados e o controle laboratorial (MIV), exceto para a dose de 100  $\mu$ M de butirolactona. Nessa dose a reversão foi nula, indicando possível efeito tóxico desta concentração quando em meio sem BSA. Da mesma forma, Adona et al., 2008 (b) demonstraram a capacidade de reversão de oócitos bloqueados por 24 horas em meio contendo 10  $\mu$ M de butirolactona sem BSA ou 100  $\mu$ M de butirolactona com BSA. Em oócitos suínos, o uso de 12,5  $\mu$ M de butirolactona em meio com PVA e EGF também não afetou a taxa de MII após a MIV (Wu et al., 2002).

Dessa forma, o modelo de bloqueio meiótico estabelecido foi baseado na dose mais baixa de butirolactona (12,5  $\mu$ M), para evitar toxicidade deste inibidor, em meio de inibição sem BSA. O sucesso do bloqueio meiótico com 12,5  $\mu$ M de butirolactona foi previamente demonstrado em oócitos de suínos (Wu et al., 2002). No presente estudo o modelo de bloqueio meiótico utilizado em todos os experimentos posteriores apresentou eficácia demonstrada pela alta taxa de bloqueio meiótico associada às taxas de reversão (porcentagem de MII), clivagem e desenvolvimento embrionário similares aquelas observadas no grupo controle laboratorial (MIV).

Os efeitos do choque térmico fisiológico de 41°C em oócitos bovinos no estágio de VG foram demonstrados na competência de desenvolvimento oocitária e nas alterações celulares induzidas pela temperatura elevada. A exposição de oócitos bovinos na fase de VG ao choque térmico de 41°C reduziu as taxas de clivagem no

dia 3 e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto nos dias 8 e 9 após a fertilização *in vitro*. Além disso, o choque térmico aumentou a incidência de oócitos TUNEL-positivo, indicando pela primeira vez o aumento na fragmentação de DNA característica de apoptose em oócitos VG. Da mesma forma, estudos anteriores já haviam demonstrado que a exposição de oócitos bovinos a temperatura elevada durante a MIV aumenta a proporção de oócitos TUNEL-positivo (Roth e Hansen, 2004 (a); 2005; Ispada et al., 2010) e diminui o desenvolvimento embrionário subsequente (Roth e Hansen, 2004 (a); 2004 (b); Ju et al., 1999).

A susceptibilidade de oócitos VG aos efeitos diretos da temperatura elevada foi previamente demonstrada em 2004 por Payton e colaboradores. Neste estudo os oócitos foram cultivados na presença do inibidor p34<sup>cdc2</sup>/cyclina B dependente de quinase (roscovitina- 50 µM). Quando o choque térmico foi aplicado a oócitos em VG por 6 e 12 horas, não houve efeito na taxa de clivagem, porém foi observada redução no desenvolvimento embrionário até os estádios de 8 a 16 células e blastocistos, respectivamente. Os efeitos deletérios do choque térmico na taxa de clivagem são inconsistentes entre os diferentes estudos (Ju et al., 2005; Gendelman et al., 2010; Risolia et al., 2011). É possível que esta variação deva-se ao efeito do choque térmico na cinética das divisões mitóticas, resultando em retardo na clivagem (Gendelman et al., 2010).

No presente experimento o choque térmico causou diminuição da atividade mitocondrial em oócitos VG. Resultados similares foram demonstrados em oócitos bovinos submetidos ao choque térmico durante a MIV. Nestes estudos o choque térmico diminuiu a atividade mitocondrial (Ispada et al., 2011) e o PMM oocitária (Soto e Smith, 2009). Este efeito deletério da temperatura pode estar relacionado a perda de competência oocitária e/ou início da ativação da cascata de apoptose. Já foi demonstrado que a quantidade de mitocôndrias ativas no oócito pode ser usada como parâmetro de maturação citoplasmática oocitária. Em suínos (El Shourbagy et al., 2006) e bovinos (Stojkovic et al., 2001; Tarazona et al., 2006) a maior quantidade de mitocôndrias ativas está positivamente correlacionada a alta competência de desenvolvimento oocitária.

As mitocôndrias são organelas envolvidas na síntese de ATP, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sinalização de cálcio, e apoptose (Ramalho-Santos et al., 2009) exercendo papel importante no metabolismo energético do oócito pela produção de ATP necessária aos processos fertilização e

desenvolvimento embrionário pré-implantacional (Wilding et al., 2001). A função mitocondrial tem sido usada como marcador de qualidade oocitária, pois mudanças na fisiologia da mitocôndria durante a maturação do oócito podem resultar em produção excessiva de ROS, a qual associada a produção oxidativa de energia e excesso de cálcio pode desencadear abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e subsequente apoptose (Inoue et al., 2004; Wang et al., 2009). Durante os estádios iniciais da apoptose, as proteínas pró-apoptóticas, como a Bax e a Bak, aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, levando à liberação de pequenas moléculas pró-apoptóticas do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol e subsequente ativação de apoptose (Patterson et al., 2000).

O aumento na porcentagem de oócitos TUNEL-positivo e a diminuição da atividade mitocondrial sugerem que a exposição de oócitos VG aos efeitos diretos do choque térmico pode desencadear a cascata de apoptose, levando a uma posterior diminuição do desenvolvimento embrionário.

O choque térmico por 14 horas, entretanto, não causou aumento da atividade de caspases do grupo II (-3, -2, -7), diferindo de resultados encontrados anteriormente. Roth e Hansen, 2004 (a) demonstraram que o choque térmico por um período de 12 horas seguido por 10 horas a 38,5°C causou um aumento da atividade de caspases do grupo II. Nesse experimento, entretanto, a detecção da atividade das enzimas caspase foi feita após 24 horas de MIV, enquanto no atual experimento a detecção foi feita imediatamente após o período de 14 horas de choque térmico. Diante dessa diferença de metodologia, a hipótese é que o período de 14 horas utilizado nesse experimento tenha sido insuficiente para causar o pico de ativação das caspases do grupo II após o choque térmico, visto que esse só acontece na fase final da cascata de ativação da apoptose.

Outra possibilidade para a baixa atividade das enzimas caspases em oócitos expostos ao choque térmico seria a ativação da apoptose via caspase independente. Em 1996 foi descoberta uma flavoproteína conhecida como AIF que tem participação na via mitocondrial da ativação da apoptose (Susin et al., 1996). Ela induz a condensação da cromatina e fragmentação do DNA em fragmentos de 50 Kb (Bröker et al., 2005), independente da ativação de caspases (Susin et al., 1999). Sabendo que, no presente experimento, o choque térmico aumentou a fragmentação de DNA e diminuiu a atividade mitocondrial sem aumentar a atividade de caspases do

grupo II, é possível que em oócitos VG a via de ativação da apoptose seja caspase independente.

A progressão meiótica oocitária foi avaliada 10 horas após a retirada do oócito da condição de bloqueio com butirolactona. Em bovinos, o oócito recomeça o ciclo celular progredindo da prófase I até MII em um período de 18 a 24 horas após a retirada do mesmo do folículo antral. Oócitos em VG podem ser encontrados desde a retirada do folículo até 6,6 h depois e alcançam MI entre 10,3 e 15,4 h (Sirard et al., 1989). Levando em conta esses períodos de desenvolvimento, é esperado que com 10 horas de maturação após o bloqueio meiótico a maioria dos oócitos encontre-se em MI. No entanto, a exposição de oócitos VG ao choque térmico afetou a progressão meiótica subsequente. A porcentagem de oócitos em MI foi reduzida quando oócitos foram submetidos ao choque térmico sob condição de bloqueio meiótico por 14 horas e maturados por 10 horas a 38,5°C. Esse resultado condiz com os estudos em que o choque térmico durante as primeiras 12 (Roth et al., 2005) ou 14 horas (Ispada et al., 2010) da MIV reduzem a quantidade de oócitos que atingem o estágio de MII após 24 horas de maturação. Essa alteração na cinética da progressão meiótica pode ser resultado da desorganização dos microtúbulos do citoesqueleto e consequente desaranjo na formação da placa metafásica (Tseng et al., 2004; Ju et al., 2005).

No presente estudo a abordagem utilizada a fim de reverter o efeito deletério do choque térmico na função e competência de oócitos VG foi o uso de fatores de crescimento/sobrevivência, tais como, o IGF-I. Os experimentos indicaram que o IGF-I exerceu efeito dose-dependente e termoprotetor na sobrevivência e competência de oócitos VG expostos ao choque térmico. A dose de 12,5 ng/ml de IGF-I reverteu os efeitos deletérios causados pela temperatura elevada. O IGF-I resgatou a competência oocitária, a atividade mitocondrial e tendeu a diminuir a alta porcentagem de apoptose oocitária induzida pela temperatura elevada. Em contraste, doses mais altas de IGF-I (50 e 100 ng/ml) não alteraram estes parâmetros. O papel termoprotetor do IGF-I na função oocitária já foi demonstrado durante a maturação *in vitro*, entretanto os resultados são controversos. Segundo Ispada et al. (2010 e 2011) a dose de 100 ng/ml de IGF-I reverteu os efeitos deletérios do choque térmico na apoptose oocitária e atividade mitocondrial. Em contraste, Zhandi et al. (2009) demonstraram que a dose de 100 ng/ml de IGF-I potencializou os efeitos negativos do choque térmico na competência e apoptose

oocitária, indicando efeito negativo do IGF-I. Além disso, a dose de 100 ng/ml de IGF-I não reverteu os efeitos negativos do choque térmico na competência de desenvolvimento do oócito (Risolia et al., 2011).

Existem indícios de que o IGF-I pode aumentar o número de mitocôndrias ativas no oócito, pois a suplementação de somatotropina recombinante bovina (rBST) ao meio de MIV de oócitos bovinos na presença de células da granulosa aumentou a atividade mitocondrial (Kuzmina et al., 2007). De fato, a suplementação do meio de inibição meiótica com IGF-I reverteu os efeitos negativos do choque térmico na atividade mitocondrial, porém não alterou a atividade de caspases do grupo II. Wasielak e Bogacki, 2007 demonstraram que a suplementação do meio de maturação com 100 ng/ml de IGF-I durante um período de 24 horas diminuiu a porcentagem de oócitos com alta atividade de caspases quando comparado ao controle sem IGF-I e ao controle 0 hora (logo após a retirada do folículo). Esses resultados sustentam a hipótese de que o período de 14 horas de exposição ao choque térmico pode ter sido insuficiente para detectar o pico de aumento na atividade das caspases após o choque térmico ou a possibilidade de oócitos VG ativarem a apoptose por via independente de caspases (Susin et al., 1999).

As ações do IGF-I na função oocitária são mediadas pelo receptor IGF-IR presente em oócitos (Yoshida et al., 1998), e células do cumulus (Nuttinck et al., 2004; Yoshida et al., 1998). O RNAm do IGF-I foi expresso em oócitos VG (Yoshida et al. (1998), células do cumulus e CCOs (Nuttinck et al., 2004) sugerindo a importância deste fator de crescimento na função oocitária. A concentração fisiológica de IGF-I no fluido folicular varia durante o ciclo estral. Concentrações altas de 243 e 177 ng/ml de IGF-I total foram encontradas nos dois maiores folículos e no pool de folículos pequenos (< 4 mm), respectivamente (Echternkamp et al., 1990). Em novilhas, a concentração de IGF-I total foi de 160, 179, 219 ng/ml de IGF-I nos folículos pequenos, médios e grandes, respectivamente (Spicer e Enright, 1991). A concentração de IGF-I livre, entretanto, é de aproximadamente 12 ng/ml para o folículo dominante e subordinado na hora do desvio (folículo dominante atinge 8,5 mm), sendo que após o desvio a concentração de IGF-I livre aumenta para próximo de 17 ng/ml no folículo dominante e diminuiu para aproximadamente 5 ng/ml no folículo subordinado (Ginther et al., 2002). Em éguas, o IGF-I livre no fluido folicular de folículos pequenos e médios variou em torno de 1,6 e 1,9 ng/ml, respectivamente, na fase folicular, enquanto o folículo dominante apresentou

concentração média 25,1 ng/ml (Spicer et al, 2005). Os baixos valores de IGF-I livre no fluido folicular justificam a eficiência da concentração de 12,5 ng/ml. Essa concentração esta próxima da concentração de IGF-I livre fisiológica (Ginther et al.,2002; Spicer et al, 2005), sendo que concentrações mais altas como 100 ng/ml podem estar acima dos valores fisiológicos.

Além de reduzir a apoptose embrionária espontânea, o IGF-I minimiza a apoptose induzida por vários outros fatores estressantes como radiação ultravioleta em embriões (Herrler et al., 1998) e TNF- $\alpha$  (Byrne et al., 2002). Além disso, a adição de 100 ng/ml de IGF-I durante o cultivo de embriões expostos a altas temperaturas *in vitro* resgatou o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, aumentou o número total de células dos blastocistos através da ativação da cascata da proteína quinase ativadora de mitose (MAPKK), diminuiu a alta porcentagem de apoptose causada pelo choque térmico (Jousan e Hansen, 2004), aumentou a taxa de gestação após transferência para vacas expostas ao estresse térmico *in vivo* (Block e Hansen, 2007; Block et al., 2003) e alterou a expressão de genes envolvidos com a apoptose, proteção contra os radicais livres e desenvolvimento (Bonilla et al., 2011).

A exposição de oócitos ao choque térmico na presença de 12,5 ng/ml de IGF-I aumentou a taxa de blastocistos no D8 e D9 quando comparado aos oócitos submetidos ao choque térmico na ausência de IGF-I. É possível que a dose de 12,5 ng/ml IGF-I acelere o desenvolvimento embrionário quando os oócitos são expostos ao choque térmico. Esta alteração na cinética de desenvolvimento, entretanto, não resultou em maior taxa de eclosão no D9 de cultivo e nem em maior número de células por blastocistos.

Contrário aos resultados encontrados anteriormente em embriões submetidos a altas temperaturas durante a CIV, nem o choque térmico e nem a adição de IGF-I no meio de cultivo de oócitos VG alteraram a porcentagem de blastômeros TUNEL-positivo e nem o número total de blastômeros por embrião. Os efeitos do estresse térmico em oócitos VG foram vistos de forma imediata como a diminuição da atividade mitocondrial e o aumento da porcentagem de oócitos TUNEL-positivo. Esses efeitos imediatos alteraram o desenvolvimento subsequente indicado pela diminuição da porcentagem de blastocistos, mas não alteraram a qualidade desses embriões indicado pelo número total de células e a porcentagem de blastômeros TUNEL-positivo. Da mesma forma, o IGF-I em baixas doses exerceu seus efeitos de

forma imediata recuperando o desenvolvimento posterior por diminuir a porcentagem de oócitos TUNEL-positivo e aumentar a atividade mitocondrial, porém não alterou a qualidade desses embriões produzidos.

*In vitro*, a suplementação do meio de cultivo com uma dose suprafisiológica de IGF-I (1000 ng/ml) não alterou a taxa de blastocisto, mas aumentou o índice para TUNEL (Velazquez et al., 2011 (a)). *In vivo*, a administração de 1 µg de IGF-I intraovariano reduziu a taxa de blastocistos e de blastocistos viáveis em vacas magras (Velazquez et al., 2011 (b)). Esses resultados sugerem que doses suprafisiológicas causam efeitos deletérios no desenvolvimento de oócitos ou embriões. Embora não se saiba a causa desse efeito deletério, já foi demonstrado não está relacionada com o *downregulation* dos receptores de IGF-I (Velazquez et al., 2011 (a)).



## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que:

1) doses crescentes de roscovitina em meio definido não são eficazes em bloquear a progressão meiótica.

2) baixas doses de butirolactona (12,5  $\mu$ M) já são suficientes para bloquear a meiose de forma eficaz e reversível, desde que na ausência de BSA.

3) a exposição de oócitos bovinos no estágio de VG ao choque térmico de 41°C por 14 horas altera a função oocitária por:

- Reduzir a atividade mitocondrial;
- Desencadear a cascata de apoptose possivelmente por via caspase independente, por aumentar a fragmentação de DNA sem alterar a atividade de caspases do grupo II;
- Reduzir a competência oocitária;

4) concentrações fisiológicas de IGF-I (12,5 ng/ml) revertem os efeitos negativos causados pelo choque térmico no oócito VG.



## REFERÊNCIAS

ABERDAM, E.; HANSKI, E.; DEKEL, N. Maintenance of meiotic arrest in isolated rat oocytes by the invasive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Biology of Reproduction*, v. 36, p. 530–535, 1987.

ADAMS, J.M.; CORY, S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Science*, v.26, p. 61-66, 2001.

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. *Animal Reproduction Science* v.104, 389–397, 2008 (a).

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Animal Reproduction Science*, v. 108, p. 49–65, 2008 (b)

AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Effect of season and exposure to heat stress oocyte competence in Holstein cows. *Journal of 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 nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2611–2616, 1999.

ALBARRACÍN, J. L.; MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T. Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. *Theriogenology*, v. 64, p. 1740- 1755, 2005.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, 1983.

ANDERIESZ, C.; FONG, C.Y.; BONGSO, A.; TROUNSON, A.O. Regulation of human and mouse oocyte maturation *in vitro* with 6-dimethylaminopurine. *Human Reproduction*, v. 15, n 2, p. 379-388, 2000.

Anuário da Pecuária Brasileira (ANUALPEC). São Paulo: Instituto FNP, 2007. 368p.

ARION, D.; MEIJER, L.; BRIZUELA, L.; BEACH, D. Cdc2 Is a Component of the M Phase-Specific Histone H1 Kinase: Evidence for Identity with MPF. *Cell*, v. 55, p. 371-378, 1988.

ARMSTRONG, D.V. Symposium: Nutrition and heat stress. Heat Stress Interaction with Shade and Cooling. *Journal of Dairy Science*, v. 77, p. 2044-2050, 1994.

ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Effect of Dietary Energy and Protein on Bovine Follicular Dynamics and Embryo Production *In Vitro*: Associations with the Ovarian Insulin-Like Growth Factor System. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 1624–1632, 2001.

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, p. 797-810, 1993.

BADINGA, L.; COLLIER, R.J.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *Journal of Dairy Science*, v. 68, p. 78-85, 1985.

BAKER, J.; LIU, J.P.; ROBERTSON, E.J.; EFSTRATIADIS, A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75 73–82, 1993.

BAKER, T.G.; FRANCHI, L.L. The fine structure of chromosomes in bovine primordial oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 14, p. 511-513, 1967.

BARRETTO, L.S.S.; CAIADO CASTRO, V.S.D.; GARCIA, J.M.; MINGOTI, G.Z. Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 202–207, 2007.

BERMAN, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; MAMEN, M.; HERZ, Z.; WOLFENSON, D.; ARIELI, A.; GRABER, Y. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical environment. *Journal of Dairy Science*, v. 68, p. 1488–1495, 1985.

BIGGERS, J.D.; WHITTINGHAM, D.G.; DONAHUE, R.P. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Zoology*, v. 58, p. 560- 567, 1967.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 60, p. 1679–1690, 2003.

BLOCK, J.; DROST, M.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J.; RIVERA, R.M.; PAULA-LOPES, F.F.; OCON, O.M.; KRININGER, C.E.; LIU, J.; HANSEN, P.J. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of *in vitro*-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *Journal of Animal Science*, vol. 81 no. 6 1590-1602, 2003

BLOCK, J.; HANSEN, P.J. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of *in vitro* produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 67, p. 1518–1529, 2007.

BLOCK, J.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; HERRMANN, D.; HANSEN, P.J. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, p. 895- 903, 2008.

BOATRRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*, v. 15, p. 725-731, 2003.

BONILLA, A.Q.S.; OLIVEIRA, L.J.; OZAWA, M.; NEWSOM, E.M.; LUCY, M.C.; HANSEN, P. J. Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 332, p. 170–179, 2011.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, v. 39, p. 615-647, 2003.

BRAW-TAL, R.; PEN, S.; ROTH, Z. Ovarian cysts in high-yielding dairy cows. *Theriogenology*, v. 72, p. 690–698, 2009.

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

BUDIARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell Development Biology*, v. 15, p.269-290, 1999.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Effects of insulin-like growth factors I and II on tumour-necrosis-factor-a-induced apoptosis in early

murine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v.14, n.2, p. 79 – 83, 2002 (a).

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, S.R.; LEESE, H.J. Regulation of Apoptosis in the Bovine Blastocyst by Insulin and the Insulin-Like Growth Factor (IGF) Superfamily. *Molecular Reproduction and Development*, v. 62, p. 489- 495, 2002 (b).

CAIN, L.; CHATTERJEE, S.; COLLINS, T.J. *In vitro* folliculogenesis of rat preantral follicles. *Endocrinology* , v.136, n.8, p.3369-3377, 1995.

CAIN, L.; CHATTERJEE, S.; COLLINS, T.J. *In vitro* folliculogenesis of rat preantral follicles. *Endocrinology*, v.136, n.8, p.3369-3377, 1995.

CALARCO, P.G. The Role of Microfilaments in Early Meiotic Maturation of Mouse Oocytes. *Microscopy and Microanalysis*, v. 11, p. 146- 153, 2005.

CAMPBELL, J.R.; LASLEY, J.F. The science of animals that serve humanity. McGraw-Hill Science (ed.), 1985.

CANIPARI, R.; PALOMBI, F.; RIMINUCCI, M.; MANGIA, F. Early programming of maturation competence in mouse oogenesis. *Developmental Biology*, v.102, p. 519-524. 1984.

CHAI, J.; DU, C.; WU, J.W.; KYRIN, S.; WANG, X.; SHI, Y. Structural and Biochemical basis of apoptotic activation by smac/ DIABLO. *Nature*. v. 406, p. 855-862, 2000.

CLEMMONS, D.R. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Molecular Cell Endocrinology*, v. 140, p. 19-24, 1998.

CONTI, M.; ANDERSEN, C.B.; RICHARD, F.J.; SHITSUKAWA, K.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 145, p. 9–14, 1998.

COUCOUVANIS, E.C.; SHERWOOD, S.W.; CARSWELL-CRUMPTON, C.; SPACK, E.G.; JONES, P.P. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Experimental Cell Research*, v.209, p. 238–247, 1993.

COY, P.; ROMAR, R.; PAYTON, R.; MCCANN, L.; SAXTON, A.M.; EDWARDS, J.L. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of

roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Reproduction*, v 129, p. 19–26, 2005.

CROCOMO, L.F.; GUASTALI, M.D.; SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; MAGALHÃES, L.O.; CHAVIER, C.; SAKASHITA, S.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. *In vitro* meiotic delay of ovine oocytes using roscovitine. In: XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2010, Porto de Galinhas - Pernambuco. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2010. v. 38. p. S751-S751

CUMMINS, J.M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 115S p. S23–S29, 2004.

DAUGAS, E.; NOCHY, D.; RAVAGNAN, L.; LOEFFLER, M.; SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Apoptosis inducing factor: an ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis regulation. *FEBS Letters*, v. 476, p. 118–123, 2000.

DE AZEVEDO, W. J.; CANDURI, F.; DA SILVEIRA, N. Structural basis for inhibition of cyclin-dependent kinase 9 by flavopiridol. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 293, p. 566–571, 2002.

DE LOOS, F.; KASTROP, P.; VAN BENEDEN, T. H. KRUIP, T. A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development*, v.28, p. 255-259, 1991.

DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow- a review. *Theriogenology*, v. 60, p. 1139-1151, 2003.

DE ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. Bases da biologia celular e molecular. 3ª ed. Guanabara Koogan, 2001. 418p.

DE SOUSA, P.A.; MARTINS DA SILVA, S.J.; ANDERSON, R.A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. *Cloning and Stem Cells*, v. 6, n. 4, p. 375-385, 2004.

DESHMUKH, M.; KUIDA, K.; JOHNSON, E.M.J. Caspase inhibition extends the commitment of neuronal death beyond cytochrome c release to the point of mitochondrial depolarization. *The Journal of Cell Biology*, v. 150, p. 131-143, 2000.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, v. 102, p. 33-42, 2000.

DUNLAP, S.E.; VINCENT, C.K. Influence of postbreeding thermal stress on conception rate in beef cattle. *Journal of Animal Science*, v. 32, p. 1216-1218, 1971.

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.

EARNSHAW, W.C. Nuclear changes in apoptosis. *Current opinion in cell biology*, v. 7, p. 337-343, 1995.

ECHTERNKAMP, S.E.; SPICER, L.J.; GREGORY, K. E.; CANNING, S. F., HAMMOND, J.M.H. Concentrations of insulin-like-growth Factor I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biology of Reproduction*, v. 43, p. 8-19, 1990.

EDWARDS, J.L.; SAXTON, A.M.; LAWRENCE, J.L.; PAYTON, R.R.; DUNLAP, J.R. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens *in vitro* maturation in bovine oocytes. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 4326–4333, 2005.

ELLIS, H.M.; HORVITZ, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, v. 44, p.817-829, 1986.

EL SHOURBAGY, S. H.; SPIKINGS, E. C.; FREITAS, M.; ST JOHN, J. C. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction*, v. 131, p. 233-245, 2006.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, v. 25, p. 800- 805, 1966.

ERICKSON, B.H. Developmental and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* , v.10, p.97-105, 1966.

FABIAN, D.; LL'LOVÁ, G.; REHÁK, P.; CZIKKOVÁ, S.; BARAN, V.; KOPPEL, J. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v. 61, p. 745 755, 2004.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 203–216, 2003.

FAIR, T.; HITTEL, P.; GREVE, T.; Boland, M. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, v.43, p.503-512, 1996.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine Oocyte Diameter in Relation to Maturational Competence and Transcriptional Activity. *Molecular Reproduction and Development*, v.42, p.437-442, 1995.

FAN, T; HAN, L.; CONG, R.; LIANG, J. CASPASE Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 37, n 11, p. 719–727, 2005.

FERGUSON, D.J.; ANDERSON, T.J. Ultrastructural observations on cell death by apoptosis in the "resting" human breast. *Virchows Arch*, v. 393, p. 193-203, 1981.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after *in vitro* maturation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 145, p. 76–80, 2009.

FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M.R.; FERRAZ, M.L.; ARAÚJO, A.B.; RODRIGUES, C.A.; WATANABE, Y.F.; VIREQUE, A.A.; JOAQUIM, D.C.; SMITH, L.C.; MEIRELLES, F.V.; BARUSELLI, P.S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n 4, p. 2383–2392, 2011.

FIRTH, S.M.; BAXTER, R.C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine Review*, v. 23, p. 824-854, 2002.

FULKA, J.J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. Effect of 6-dimethylaminopurine on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 29:379–84, 1991.

GAUTIER, J.; CHRIS, N.; LOHKA, M.; NURSE, P.; MALLER, J. Purified Maturation-Promoting Factor Contains the Product of a *Xenopus* Homolog of the Fission Yeast Cell Cycle Control Gene *cdc2+*. *Cell*, v. 54, p. 433-439, 1988.

GENDELMAN, M.; AROYO, A.; YAVIN, S.; ROTH, Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, v. 140, p. 73-82, 2010.

GINTER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K. Activin A, Estradiol, and Free Insulin-Like Growth Factor I in Follicular Fluid Preceding the Experimental Assumption of Follicle Dominance in Cattle. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 14–19, 2002.

GOLDSTEIN, J.C.; WATERHOUSE, N.J.; JUIN, P.; EVAN, G.I.; GREEN, D.R. The coordinate release of cytochrome c is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biology*, v. 2, p.156-162, 2000.

GOTTLIEB, R.A. Mitochondria: execution central. *FEBS Letters*, v. 482, p. 6-12, 2000.

GROSS, A.; JOCKEL, J.; WEI, M.C.; KORSMEYER, S.J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *The EMBO Journal*, v. 17, p. 3878-3885, 1998.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science*, v. 82, p. 349-360, 2004.

HANSEN, P.J.; DROST, M.; RIVERA, R.M.; PAULA-LOPES, F.F.; AL-KATANANIT, Y.M.; KRININGER III, C.E.; CHASE JR, C.C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, v. 55, p. 91-103, 2001.

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

HENGARTNER, M.O.; HORTVITZ, H.R.C. *Elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*, v. 76, p. 665- 676, 1994.

HERRLER, A.; KRUSCHE, C.A.; BEIER, H.M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biology of Reproduction*, v.59, n 6, p. 1302-1310, 1998.

HERRLER, A.; KRUSCHE, C.A.; BEIER, H.M. Insulin and Insulin-like Growth Factor-I Promote Rabbit Blastocyst Development and Prevent Apoptosis. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 1302-1310, 1998.

HIRSCH, T.; MARCHETTI, P.; SUSIN, S.A.; DALLAPORTA, B.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, v. 15, p.1573-1581, 1997.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. International review of cytology, v.124, p.43-101, 1991.

HORVITZ, H.R.; ELLIS, H.M.; STERNBERG, P. Programmed cell death in nematode development. Neuroscience Commentaries, v. 1, p.56-65, 1982.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. Journal of Reproduction and Fertility, v. 76, p. 645-656, 1986.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; Greve, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology, v.47, p.23-32, 1997.

IMAI, K.; KOBAYASHI, S.; KANEYAMA, K.; KOJIMA, T.; NAGAI, T. Effects of Butirolactone-I on GVBD in bovine oocytes and subsequent maturation, fertilization and development *in vitro*. Journal of Reproduction and Development, v. 48, n 3, p.249-255, 2002.

INOUE, M.; SATO, E. F.; NISHIKAWA, M.; HIRAMOTO, K.; KASHIWAGI, A.; UTSUMI, K. Free radical theory of apoptosis and metamorphosis. Redox Report, v. 9, p. 237–247, 2004.

ISPADA, J.; LIMA, R. S.; RISOLIA, P. H.; ASSUMPÇÃO, M. E.; VISINTIN, J. A.; PAULA-LOPES, F. F. Insulin-like growth factor-1 exerts a thermoprotective role on mitochondrial function of bovine oocytes exposed to heat shock. Reproduction, Fertility and Development, v. 24, n 1, p. 209, 2011.

ISPADA, J.; LIMA, R.S.; RISOLIA, P.H.B.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A.; PAULA-LOPES, F.F. O efeito do fator de crescimento semelhante a insulina-I na atividade mitocondrial de oócitos bovinos expostos ao estresse térmico. In: XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2011, Cumbuco. Acta ScientiaeVeterinarie, 2011, código 217

JONES, J.I.; CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocrine Review, v. 16, p. 33-34, 1995.

JOUSAN, F.D.; HANSEN, P.J. Insulin-Like Growth Factor-I Promotes Resistance of Bovine Preimplantation Embryos to Heat Shock Through Actions Independent of its Anti-Apoptotic Actions Requiring PI3K Signaling. Molecular Reproduction and Development, v. 74, p.189–196, 2007.

JOUSAN, F.D.; HANSEN, P.J. Insulin-like Growth Factor-I as a Survival Factor for the Bovine Preimplantation Embryo Exposed to Heat Shock. Biology of Reproduction, v. 71, p. 1665–1670, 2004.

JU, J.C.; JIANG, S.; TSENG, J.K.; PARKS, J.E.; YANG, X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 64, p. 1677-1689, 2005.

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 (3), p. 336-340, 1999.

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

JU, J.; TSAY, C.; RUAN, C. Alterations and Reversibility in the Chromatin, Cytoskeleton and Development of Pig Oocytes Treated With Roscovitine. *Molecular Reproduction and Development*, v. 64, p. 482–491, 2003.

KERR, J.F.R. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *The Journal of pathology*, v. 105, p.13-20, 1971.

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

KIM, N.; CHO, S.K.; CHO, S.H.; KIM, E.Y., PARK, S.P.; LIM, J.H. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Zygote*, v. 8, p. 25-32, 2000.

KIRBY, C.J.; ARMSTRONG, J.D.; HUFF, B.G.; STANKO, R.L.; HARVEY, R.W.; HEIMER, E.P; CAMPBELL, R.M. Changes in serum somatotropin, somatotropin mRNA, and serum and follicular insulin-like growth factor-I in response to feed restriction in cows actively immunized against growth hormone-releasing factor. *Journal of Animal Science*, v. 71, p.3033-3042, 1993.

KIRIYAMA, N.; NITTA, K.; SAKAGUCHI, Y.; TAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, Y. Studies on the metabolic products of *Aspergillus terreus* III. Metabolites of the strain IFO 8835 (1). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 25, p. 2593–2601,1977.

KLUCK, R.M.; ESPOSTI, M.D.; PERKINS, G.; RENKEN, C.; KUWANA, T.; BOSSY-WETZEL, E.; GOLDBERG, M.; ALLEN, T.; BARBER, M.J.; GREEN, D.R.; NEWMAYER, D.D. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *The Journal of Cell Biology*, v. 147, p.809-822, 1999.

KONDO, T.; TAKEUCHI, K.; DOI, Y.; YONEMURA, S.; NIGATA, S.; TSUKITA, S. ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis. *Journal of Cell Biology*, v. 139, p. 749-758, 1997.

KOTSUJI, F.; KUBO, M.; TOMINAGA, T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 100, p. 151-156, 1994.

KUBELKA, M.; MOTLÍK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I Reversibly Inhibits Meiotic Maturation of Bovine Oocytes, Without Influencing Chromosome Condensation Activity. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 292-302, 2000.

KUBIAK, J. Z.; WEBER, M.; GERAUD, G.; MARO, B. Cell cycle modification during the transitions between meiotic M-phases in mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, v. 102, p. 457-467, 1992.

KUWANA, T.; BOUCHIER-HAYES, L.; CHIPUK, J.E.; BONZON, C.; SULLIVAN, B.A.; GREEN, D.R.; NEWMAYER, D.D. BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Molecular Cell*, v. 17, p. 525-535, 2005.

KUZMINA, T.I.; HANNELORE, A.L.M.; DENISENKO, V.; TUCHSCHERER, A.; KANITZ, W.; TORNER, H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cytoplasmic maturation of bovine oocytes and their developmental competence *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, v. 53, n 2, p. 309-316, 2007.

LENZ, R.W.; BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L.; AX, R.L. FIRST, N.L. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biology of Reproduction*, v. 29, p.173-179, 1983.

LEFEBVRE, D.; PLAMONDON, P. 2003. Le producteur de lait Québécois, Juin 2003.

LEVESQUE, J.T.; SIRARD, M. Resumption of Meiosis Is Initiated by the Accumulation of Cyclin B in Bovine Oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1427-1436, 1996.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHardjo, I.; SRINIVASULA, S.M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E.S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, v. 91, p. 479-489, 1997.

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

LONERGAN, P.; FAERGE, I.; HYTTEL, P.M.; BOLAND, M.; FAIR, T. Ultrastructural Modifications in Bovine Oocytes Maintained in Meiotic Arrest *In Vitro* Using Roscovitine or Butyrolactone. *Molecular Reproduction and Development*, v. 64, p.369–378, 2003.

LORENZO, P.L.; ILLERA, M.J.; ILLERA J.C.; ILLERA, M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 101, p. 697, 701, 1994.

LUDEWIG, B.; GRAF, D.; GELDERBLUM, H.R.; BECKER, Y.; KROCZEK, R.A.; PAULI, G. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-, but strongly enhanced by interleukin-10. *European Journal Immunology*, v. 25, p. 1943-1950, 1995.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J.J. Growth rates of follicles in the ovary of cow. *Reproduction & Fertility*, v. 81, p. 301-307, 1974.

KITAGAWA, M.; OKABE, T.; OGINO, H.; MATSUMOTO, H.; SUZUKI-TAKAHASHI, I.; KOKUBO, T.; HIGASHI, H.; SAITOH,S.; TAYA, Y. Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene*, v. 8, p. 2425–2432, 1993.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *The American journal of pathology*, v. 146, p. 3-15, 1995.

MAKAREVICH, A.V.; MARKKULA, M. Apoptosis and Cell Proliferation Potential of Bovine Embryos Stimulated with Insulin-Like Growth Factor I During *In Vitro* Maturation and Culture. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 386–392, 2002.

MARTELLO, L. S.; SAVASTANO JÚNIOR, H.; LUZ E SILVA, S.; TITTO, E. A. L. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.1, p.181-191, 2004

MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.A.A.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. 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. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 182, p.1545-1556, 1995.

MARTINELLI JR, C. E.; CUSTÓDIO, R. J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo, v. 52, p. 717-725, 2008.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP Kinase Activities in Bovine Oocytes following Protein Synthesis Inhibition. Reproduction in Domestic Animal, v. 36, p. 183-188, 2001.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High Developmental Competence of Cattle Oocytes Maintained at the Germinal Vesicle Stage for 24 Hours in Culture by Specific Inhibition of MPF Kinase Activity. Molecular Reproduction and Development, v. 55, p.89–95, 2000.

MESSINGER, S.M.; ALBERTINI, D.F. Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte. Journal of Cell Science, v. 100, p. 289-298, 1991.

MONGET, P., MAZERBOURG, S., DELPUECH, T., MAUREL, M.C., MANIÈRE, S., ZAPF, J., LALMANACH, G., OXVIG, C., OVERGAARD, M.T. Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. Journal of Biological and Reproduction, v.68, p.77-86, 2003.

MOTLIK, J., FULKA, J. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. Journal of Experimental Zoology, v. 198, p. 155-162, 1976.

MOTLIK, J.; KOEFOED-JOHNSEN, H.H.; FULKA, J. Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated *In vitro*. Journal of Experimental Zoology, v. 205, p. 377-384, 1978.

NECHUSHTAN, A.; SMITH, C.L.; LAMENSDORF, I.; YOON, S.H.; YOULE, R.J. BAX and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. The Journal of Cell Biology, v. 153, p. 1265-1276, 2001.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. Trends in Biochemical Science, v. 22, p.299-306, 1997.

NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. Domestic Animal Endocrinology, v. 27, p. 179–195, 2004.

OLIVEIRA E SILVA, I.; VASCONCELOS, R.B.; CAETANO, J.V.; GULART, L.V.M.; CAMARGO, L.S.A.; BAOB, S.N.; ROSA E SILVA, A.A.M. Induction of reversible meiosis arrest of bovine oocytes using a two-step procedure under defined and nondefined conditions. *Theriogenology*, v. 75, p. 1115–1124, 2011.

OLIVEIRA, J. C.; Siviero-Miachon, A. A.; Spinola-Castro, A. M.; Belangero, V. M. S.; Guerra-Junior, Gil. Baixa estatura na doença renal crônica: fisiopatologia e tratamento com hormônio de crescimento. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, v. 52, p. 783-791, 2008.

PALMA, G.A.; MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 110, p. 347-353, 1997.

PATTERSON, S.; SPAHR, C.S.; DAUGAS, E.; SUSIN, S.A.; Irinopoulos, T.; Koehler, C.; Kroemer, G. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death and Differentiation*, v. 7, p. 137-144, 2000.

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, n. 4, p. 1169-1177, 2002.

PAULA-LOPES, F. F.; MILAZZOTTO, M.; ASSUMPTÇÃO, M. E. O. A.; VISINTIN, J. A. Heat shock-induced damage in bovine oocytes. In: *International Congress on Animal Reproduction, 2008, Budapest. Reproduction in Domestic Animals*. Berlin : Wiley-Blackwell, 2008. v. 43. p. 208.

PAWSHE, C.H.; APPA RAO, K.B.C.; TOTEY, S.M. Effect of Insulin-Like Growth Factor I and Its Interaction With Gonadotropins on *In Vitro* Maturation and Embryonic Development, Cell Proliferation, and Biosynthetic Activity of Cumulus-Oocyte Complexes and Granulosa Cells in Buffalo. *Molecular Reproduction and Development*, v. 49, p.277–285, 1998.

PAYTON, R.R.; ROMAR, R.; COY, P.; SEXTON, A.M.; LAWRENCE, J.L.; EDWARDS, J. L. 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.

PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1644, p.83-94, 2004.

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

PIRES, M.F.A.; FERREIRA, A.M.; SATURNINO, H.M.; TEODORO, R.L. 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. 57-63, 2002.

POLLARD, J.W.; PACEY, J.; CHENG, S.V.; JORDAN, E.G. Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium. Cell and Tissue Research, v. 249, p. 533-540, 1987.

PONDERATO, N.; CROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Embryonic and Foetal Development of Bovine Oocytes Treated With a Combination of Butyrolactone I and Roscovitine in an Enriched Medium Prior to IVM and IVF. Molecular Reproduction and Development, v. 62, p.513–518, 2002.

PUSHPAKUMARA, P.G.; ROBINSON, R.S.; DEMMERS, K.J.; MANN, G.E.; SINCLAIR, K.D.; WEBB, R.; WATHES, D.C. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrus and during early pregnancy. Reproduction, v. 123, p. 859–868, 2002.

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

PUTNEY, D.J.; MULLINS, S.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; GROSS, T.S. 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, 1989.

QUETGLAS, M.D.; ADONA, P.R.; DE BEM, T.H.C.; PIRES, P.R.L.; LEAL, C.L.V. Effect of Cyclin-dependent Kinase (CDK) Inhibition on Expression, Localization and Activity of Maturation Promoting Factor (MPF) and Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) in Bovine Oocytes. Reproduction in Domestic Animal, v. 45, p. 1074–1081, 2010.

RAMALHO-SANTOS, J.; VARUM, S.; AMARAL, S.; MOTA, P. C.; SOUNA, A. P.; AMARAL, A. Mitochondrial functionality in reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. Human Reproduction Update, v. 15, p.553–572, 2009.

RIME, H.; NEANT, I.; GUERRIER, P.; OZON, R. 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Developmental Biology*, 133:169–79, 1989.

RISOLIA, P. H. B.; LIMA, R. S.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; VISINTIN, J. A.; PAULA-LOPES, F. F O papel do fator de crescimento semelhante a insulina-I na competência de oócitos bovinos expostos ao estresse térmico *in vitro*. In: XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2011, Cumbuco. *Acta Scientiae Veterinarie*, 2011, código 271

ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; GADD, T.S.; LAMMING, G.E.; WATHES, D.C. The expression of the IGF system in the bovine uterus through-out the oestrous cycle and early pregnancy. *Journal of Endocrinology*, v. 165, p. 231-243, 2000.

ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R.; LIM, J.M.; BLAIR, R.M.; ROUSSEL, J.D.; GODKE, R.A.; HANSEN, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, v. 49, p. 657-665, 1998.

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.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*, v. 122, p. 737-744, 2001.

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.

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 (a).

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

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. *Biological Chemistry*, v. 385, p. 449-464, 2004.

RÜSSE I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica*, v.24, p.77-92, 1983.

SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; YAMAUCHI, N.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NAGAI, T.; FIRST, N.L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors *in vitro*. *Reproduction*, v. 123, p. 135–142, 2002.

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

SCHULTZ, R.M., MONTGOMERY, R.R., BELANOFF, J.R. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Developmental Biology*, v. 97, p. 264–273, 1983.

SHABANKAREH, H.K.; ZANDI, M. Developmental potencial of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. *Reproductive Biology*, v. 94, p. 335-340, 2010.

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

SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 40, p. 1257-1263, 1989.

SOTO, P.; SMITH, L. C. BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 76, p. 637-646, 2009.

SPICER, L.J.; ENRIGHT, W.J. Concentrations of insulin-like growth factor I and steroids in follicular fluid of preovulatory bovine ovarian follicles: effect of daily injections of a growth hormone-releasing factor analog and(or) thyrotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 1133-1139, 1991.

SPICER, L.J.; SANTIAGO, C.A.; DAVIDSON, T.R.; BRIDGES, T.S.; CHAMBERLAIN, C.S. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 29, p. 573–581, 2005.

ST-PIERRE, N.R.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p.E52–E77, 2003.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 904-909, 2001.

SUN, Q.Y.; WU, G.M.; LAI, L.; PARK, K.W.; CABOT, R.; CHEONG, H.T.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction*, v. 122, p. 155–163, 2001.

SUN, X.; WANG, W.; KEEFE, D.L. Overheating is detrimental to meiotic spindles within *in vitro* matured human oocytes. *Zygote*, v. 12, p. 65-70, 2004.

SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B. E.; BROTHERS, G. M.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; COSTANTINI, P.; LOEF, M.; LAROCLETTE, N.; GOODLETT, D. R.; AEBERSOLD, R.; SIDEROVSKI, D. P.; PENNINGER, J. M.; KROEMER, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, v. 397, p. 441-446, 1999.

SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; CASTEDO, M.; HIRSCH, T.; MARCHETTL, P.; MACHO, A.; DAUGAS, E.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 184, p. 1331-1341, 1996.

TARAZONA, A.M.; RODRIGUEZ, J.I.; RESTREPO, L.F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced *in Vitro*. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 41, p. 5–11, 2006.

TATAR, M.; BARTKE, A.; ANTEBI, A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science*, v. 299, p. 1346-1351, 2003.

TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PIRES, M.F.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; RAMOS, A.A.; FOLHADELLA, I.M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; SÁ-FILHO, M.F.; PAULA-LOPES, F.F.; BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v. 69(2), p.155-166, 2008.

TSENG, J.K.; CHEN, C.H.; CHOU, P.C.; YEH, S.P.; JU, J.C. Influences of follicular size on parthenogenetic activation and *in vitro* heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes. *Reproduction Domestic Animal*, v. 39, p. 146–153, 2004.

TSENG, J.K.; TANG, P.C.; JU, J.C. *In vitro* thermal stress induces apoptosis and reduces development of porcine parthenotes. *Theriogenology*, v. 66(5), p 1073-1082, 2006.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; LEE, J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Human Reproduction*, v. 10, p. 415–424, 1995.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VELAZQUEZ, M.A.; HERMANN, D.; KUES, W.A.; NIEMANN, H. Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. *Reproduction*, v. 141, p. 91-103, 2011 (a)

VELAZQUEZ, M.A.; HADELER, K.; HERRMANN, D.; KUES, W.A.; ULBRICH, S.; MEYER, H.H.D.; RÉMY, B.; BECKERS, J.; SAUERWEIN, H.; NIEMANN, H. *In vivo* oocyte developmental competence is reduced in lean but not in obese superovulated dairy cows after intraovarian administration of IGF1. *Reproduction*, v. 142, p. 41–52, 2011 (b)

VERHAGEN, A.M.; EKRET, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLLY, L.M.; REID, G. E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; VAUX, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, v. 102, p. 43-53, 2000.

VOSS, J.W.; ROSENFELD, M.G. Anterior pituitary development: short tales from dwarf mice. *Cell*, 70 527–530, 1992.

WANG, J.; SUI, H.; MIAO, D.; LIU, N.; ZHOU, P.; GE, L.; TAN, J. Effects of heat stress during *in vitro* maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. *Reproduction*, v. 137, p. 181–189, 2009.

WANG, L.M.; FENGA, H.L.; MA, Y.ZH.; CANGA, M.; LI, H.J.; YAN, ZH.; ZHOU, P.; WEN, J.X.; BOU SHORGAN; LIU, D.J. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Animal Reproduction Science*, v. 114, p. 99–108, 2009.

WANG, L.; WANG, D.; ZOU, X.; XU, C. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *Journal Zhejiang University- Science B*, v. 10, p.483–492, 2009.

WASIELAK, M.; BOGACKI, M. Apoptosis inhibition by insulin-like Growth Factor I (IGF)-I during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, v. 53, n. 2, p. 419-426, 2007.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. Mammalian ovum. In: Knobil, E.; Neil, J. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994. Cap.3, p.79-123.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. Mammalian ovum. In: Knobil, E.; Neil, J. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. Cap.3, p.79-123, 1994.

WEBB, M.; HOWLETT, S.; MARO, B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, v. 95, p.131-145, 1986.

WESSEL, G.M.; CONNER, S.D.; BERG, L. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. *Development*, v. 129, p. 4315–4325, 2002.

WEST, J.W. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 2131–2144, 2003.

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATTEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO, M. L.; LOMBARDI, L.; PLACIDO, G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*, v. 16, n.5, p. 909-917, 2001.

WILSON, S.J., MARION, R.S., SPAIN, J.N., SPIERS, D.E., KEISLER, D.H., LUCY, M.C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *Journal of Science*, v. 81, p. 2124-2131, 1998.

WU, G.; SUN, Q.; MAO, J.; LAI, L.; MCCAULEY, T.C.; PARK, K.; PRATHER, R.S.; DIDION, B.A., DAY, B.N. High Developmental Competence of Pig Oocytes after Meiotic Inhibition with a Specific M-Phase Promoting Factor Kinase Inhibitor, Butyrolactone I. *Biology of Reproduction*, v.67, p. 179-177, 2002.

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

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, v. 68, p. 251-306, 1980.

XIANG, J.; CHAO, D.T.; KORSMEYER, S.J. BAX-induced cell death may not require interleukin 1  $\beta$ -converting enzyme-like proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.93, p. 14559-14563, 1996.

YAKAR, S.; LIU, J.L.; STANNARD, B.; BUTLER, A.; ACCILI, D.; SAUER, B.; LEROITH, D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 7324–7329, 1999.

YOSHIDA, Y.; MIYAMURA, M.; HAMANO, S.; YOSHIDA, M. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during *in vitro* maturation and after fertilization *in vitro*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 60, n 5, p. 549-554, 1998.

YUAN, J.; SHAHAM, S.; LEDOUX, S.; ELLIS, H.M.; HORTVITZ, H.R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1  $\beta$ -converting enzyme. *Cell*, v. 75, p. 641-652, 1993.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R.A. Cell death during development. *Journal of immunological methods*, v. 265, p. 3-20, 2002.

ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; DALLAPORTA, B.; PETIT, P.X.; KROEMER, G. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 29, p.185-193, 1997.

ZAMZAMI, N.; MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; ZANIN, C.; VAYSSIÈRE, J.L.; PETIT, P.X.; KROEMER, G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 181, p. 1661-1672, 1995.

ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; VELAZQUEZ, M.A.; KORSAWE, K.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation *in vitro*-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. *Theriogenology*, v. 74, p. 75–89, 2010.

ZHANDI, M.; TOWHIDI, A.; NASR-ESFAHANI, M.H.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; ZARE-SHAHNEH, A. Unexpected detrimental effect of Insulin like growth factor-1 on bovine oocyte developmental competence under heat stress. *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*, v. 26, p. 605-611, 2009.

ZHOU, J.; SHU, H.; JOSHI, H.C. Regulation of tubulin synthesis and cell cycle progression in mammalian cells by g-tubulin-mediated microtubule nucleation. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 84, p. 472-483, 2002.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 92, p.57-70, 2001.



## ANEXOS

## Anexo A – MIV

## Meio de fatiamento estoque

Reagente	Quantidade	Marca/código
TCM-199	1 pacote	Gibco/31100-035
Bicarbonato de sódio	2,2 g	Sigma/S-5761
Água MilliQ	1 litro	-

Armazenar a 4°C, Validade: 1 mês

## Meio de fatiamento (uso)

Reagente	Quantidade	Marca/código
Meio de fatiamento estoque	50 ml	-
Soro fetal bovino com heparina	500 µl	-
Solução de penicilina/streptomicina	50 µl	-

Uso diário; Filtrar 0,22 µM

## Soro fetal bovino com heparina

Reagente	Quantidade	Marca/código
Heparina	0,571 ml	Sigma/H-3149
Água MilliQ	1 ml	-

Filtrar 0,22 µm e acrescentar

Soro fetal bovino	50 ml	Nutricell
-------------------	-------	-----------

Armazenar -20°C

## Meio Pré-MIV

Reagente	Quantidade	Marca/código
TCM 199 HEPES	4,5 ml	Gibco/12350-039
Soro fetal bovino	0,5 ml	Gibco/16140-014
Solução de piruvato	10 µl	-
Solução de gentamicina	25 µl	-

Uso diário; Filtrar 0,22 µM

## Meio MIV

Reagente	Quantidade	Marca/código
TCM 199 bicarbonato	4,5 ml	Gibco/11150-026
Soro fetal bovino	0,5 ml	Gibco/16140-014
Solução de piruvato	10 µL	-
Solução de gentamicina	25 µL	-
Solução de FSH	5 µL	-
Solução de LH	50 µL	-
Filtrar 0,22 µm; Uso diário		
Solução de estradiol	5 µL	-

**Meio de Inibição Meiótica (MIM)**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
TCM 199 bicarbonato	5 ml	Gibco/11150-026
Solução de cisteamina	50 µL	-
Solução de piruvato	10 µL	-
Solução de gentamicina	25 µL	-

Uso diário; filtrar 0,22 µm

**Solução de cisteamina**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
TCM 199 bicarbonato	2 ml	Gibco/11150-026
Cisteamina	0,0015 g	Sigma/M-9768-56

Uso diário

**Meio de Bloqueio (MB)**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
TCM 199 bicarbonato	5 ml	Gibco/11150-026
Álcool Polivinílico (PVA)	5 mg	Sigma/P-8136
Solução de piruvato	10 µL	-
Solução de gentamicina	25 µL	-

Uso diário; filtrar 0,22 µm

**Solução de gentamicina 10 mg/ml**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Gentamicina	0,1 g	Sigma/G-1264
NaCl 0,9%	10 ml	Sigma/S-5886

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

**Solução de piruvato 100 Mm**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Piruvato	0,1320 g	Sigma/P-4562
NaCl 0,9%	12 ml	Sigma/S-5886

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

**Solução de estradiol 1 ug/ml**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Estradiol	0,02041 g	Sigma/E-4389
Água MilliQ	1 ml	-

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

## Anexos

**Solução de FSH (estoque)**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Folltropin V	400 mg	Bioniche/PHD075
NaCl 0,9%	2 ml	Sigma/S-5886

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

**Solução de FSH (uso) 0,5 mg/ml**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Solução estoque	50 µL	-
TCM 199 bicarbonato	20 ml	Gibco/11150-026

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

**Solução de LH 700 UI/ml**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Chorulon	5000 UI	Intervet/057176
TCM 199 bicarbonato	7,14 ml	Gibco/11150-026

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

**Solução de penicilina/estreptomicina**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Estreptomicina	3 g	Sigma/S-6501
Penicilina G	1,8105	Sigma/P-3032
NaCl 0,9%	30 ml	Sigma/S-5886

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

**Anexo B- FIV**

<b>Meio Pré-FIV</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
TCM 199 HEPES	10 ml	Gibco/12350-039
BSA-V	0,030 g	Sigma/A-9647
Piruvato estoque	20 µL	-
Gentamicina estoque	50 µL	-

Uso diário; Filtrar em 0,22 µm

<b>Meio FIV</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
TL- STOCK	10 ml	-
BSA- Livre de ácidos graxos	0,060 g	Sigma/A-7511
Piruvato estoque	20 µL	-
Gentamicina estoque	50 µL	-

Uso diário; Filtrar em 0,22 µm

<b>Meio FIV- gota</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Meio FIV	3,640 µL	-
Heparina estoque	40 µL	-
PHE estoque	160 µL	-

Uso diário; Filtrar em 0,22 µm

<b>Solução de Hipotaurina</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Hipotaurina	0,00109 g	Sigma/H-1384
NaCl 0,9%	10 ml	Sigma/S-5886

Usado no PHE

<b>Solução de Epinefrina</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Água MilliQ	50 ml	Sigma/H-1384
Ácido Láctico	125,9 µL	Sigma/L-7900
Na-metabusulfito	0,050 g	Sigma/S-1516
Ajustar o pH para 4,0 com solução 1N de HCl e usar 40 ml para diluir em:		
Epinefrina	0,0018 g	Sigma/E-4250

Usado no PHE

## Anexos

**Solução de Penicilamida**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Penicilamida	0,003 g	Sigma/P-5125
NaCl 0,9%	10 ml	Sigma/S-5886

Usado no PHE

**PHE (uso) proteger da luz**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Solução de penicilamina	2,5 ml	-
Solução de hipotaurina	2,5 ml	-
Solução de epinefrina	2 ml	-
NaCl 0,9%	4 ml	Sigma/S-5886

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses (proteger da luz)

**Solução de heparina 10 mg/ml**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Heparina (175 USP/mg)	0,020 g	Sigma/H-3149
Meio FIV	2 ml	-

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

**Solução de CaCl<sub>2</sub> 1M**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
CaCl <sub>2</sub>	0,735 g	Sigma/C-5670
Água MilliQ	5 ml	-

Armazenar a 4°C(geladeira); Validade: 4 meses

**Solução de MgCl<sub>2</sub> 0,1M**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
MgCl <sub>2</sub>	0,1015 g	Sigma/M-2393
Água MilliQ	5 ml	-

Armazenar a 4°C(geladeira); Validade: 4 meses

**KCl (1M) para solução 10X**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
KCl	0,0745 g	Sigma/P-5405
Água MilliQ	1 ml	-

Usado para solução 10X

## Anexos

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1M) para solução 10X**

Reagente	Quantidade	Marca/código
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0138 g	Sigma/S-0876
Água MilliQ	1 ml	-

Usado para solução 10X

**Solução 10X (final)**

Reagente	Quantidade	Marca/código
KCl (1M)	618 µL	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,1M)	584 µL	-
NaCl	0,9352 g	Sigma/S-5886
HEPES	0,476 g	Sigma/H-0891
Água MilliQ	20 ml	-

Armazenar -20°C; Validade: 6 meses

**TALP STOCK**

Reagente	Quantidade	Marca/código
Água MilliQ	50 ml	-
NaCl	0,3330 g	Sigma/S-5886
KCl	0,0120 g	Sigma/P-5405
*MgCl <sub>2</sub>	0,0050 g	Sigma/M-2393
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,00205 g	Sigma/S-0876
NaHCO <sub>3</sub>	0,1050 g	Sigma/S-8875
*CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0,0150 g	Sigma/C-5670
Phenol Red	0,0005 g	Sigma/P-4633
Ac. Lácticosyr	71,5 µl	Sigma/L-7900
Hepes	-----	Sigma/H-0891

Armazenar 4°C; Filtrar 0,22 µm; Validade: 15 dias

**TALP SÊMEN**

Reagente	Quantidade	Marca/código
Água MilliQ	50 ml	-
NaCl	0,2910 g	Sigma/S-5886
KCl	0,0115g	Sigma/P-5405
*MgCl <sub>2</sub>	0,0040 g	Sigma/M-2393
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,00175 g	Sigma/S-0876
NaHCO <sub>3</sub>	0,1050 g	Sigma/S-8875
*CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0,015 g	Sigma/C-5670
Phenol Red	0,0005 g	Sigma/P-4633
Ac. Lácticosyr	155 µl	Sigma/L-7900
Hepes	0,1190 g	Sigma/H-0891

Armazenar 4°C; Filtrar 0,22 µm; Validade: 15 dias

<b>Percoll 90%</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Percoll	0,9 ml	Sigma/P-1644
Solução 10X	100 µl	-
CaCl <sub>2</sub> 1M	2 µl	-
MgCl <sub>2</sub> 0,1M	3,9 µl	-
Ac. Láctico (lactato de Na)	3,7 µl	Sigma/L-7900
NaHCO <sub>3</sub>	0,0021g	Sigma/S-8875
Percoll 45%= 300 µL 90% + 300 µL TALP SÊMEN		
Uso diário		

### **Preparação do sêmen pela técnica de Percoll**

- Descongelar o sêmen 37°C por 30 segundos;
- Adicionar lentamente o sêmen na parte superior do gradiente;
- Centrifugar a 9000 rcf por 5 minutos;
- Retirar 100 µl do pellet e adicionar em 400 µl de meio FIV;
- Centrifugar a 9000 rcf por 2,5 minutos;
- Pegar 100 µl do pellet;
- Fazer a concentração e a motilidade;
- Fecundar.

**Anexo C- CIV**

<b>KSOM</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
KSOM	1,8 ml	Millipore – MR-107-D
Soro fetal bovino	180 µl	Gibco/16140-014
Gentamicinaestoque	0,45 µl	-
Aminoácidosnãoessenciais 100X	9 µl	Sigma/M-7145

Uso diário; Filtrar em 0,22 µm

**Anexo D- Soluções para coloração****PBS 0,2M em 0,9% NaCl**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	34,83 g	Sigma/P-5655
NaCl	9 g	Sigma/S-5886
Água MilliQ	1 L	-

Armazenar 4°C

**PBS 10 M em 0,9% NaCl**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,742 g	Sigma/P-5655
NaCl	9 g	Sigma/S-5886
Água MilliQ	1 L	-

Armazenar 4°C

**Solução de permeabilização 0,1% (v/v) Triton X**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
PBS (10 mM)	100 ml	-
Triton X-100	0,1 ml	Sigma/X-100

Armazenar 4°C

**PBS-PVP**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
PBS (10 mM)	100 ml	-
PVP	0,1 g	Sigma/P0930

Armazenar 4°C

**Hoechst 33342 (estoque- 5mg/ml)**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Hoechst 33342	5 mg	Sigma/B-2261
PBS (10 mM)	1 ml	-

Armazenar -20°C

**Hoechst 33342**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca/código</b>
Hoechst 33342 estoque	1 µL	-
PBS-PVP	1 ml	-

Uso diário

**Paraformaldeído estoque (8%)**

Reagente	Quantidade	Marca/código
Paraformaldeído	8 g	EMS/19210
ÀguaMilliQ	100 ml	-
Esquentar e misturar (55-60°C)		
Adicionar 2N de Hidróxido de sódio até a solução clarear		
Filtrar em 0,22 µm e observar se houve precipitação, se a solução precipitar não utilizar		

**Paraformaldeído uso (4%)**

Reagente	Quantidade	Marca/código
Paraformaldeído estoque (8%)	500 µL	-
PBS (0,2 M)	500 µL	-
Uso diário		

**DNase estoque (182 U/ml)**

Reagente	Quantidade	Marca/código
DNase (182 U/µL)	1 µL	Invitrogen/18047-019
PBS-PVP	1 ml	-
Armazenar -20°C		

**DNase uso**

Reagente	Quantidade	Marca/código
DNase estoque (182 u/ml)	27,5 µL	-
PBS-PVP	72,5 µL	-
Uso diário		

**Mito Tracker estoque (1mM)**

Reagente	Quantidade	Marca/código
MitotrackerRed	50 ug	Invitrogen/M-7512
DMSO	94,0698 µL	Sigma/D-5879
Armazenar -20°C		

**Mito Tracker uso (50nM)**

Reagente	Quantidade	Marca/código
MitotrackerRed estoque	0,1 µL	-
TCM 199 HEPES com 0,1%	2 ml	-
PVA		
Uso diário		