

RAFAEL AUGUSTO SATRAPA

INFLUÊNCIA DOS FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À
INSULINA (IGF-I e II), SEUS RECEPTORES (IGFR-I e II), PROTEÍNAS
LIGANTES (IGFBP-2 e 4) E PAPP-A NA AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA AO
ESTRESSE TÉRMICO DE EMBRIÕES BOVINOS (NELORE *vs* HOLANDÊS)
PRODUZIDOS *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação do Instituto de Biociências de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista -
UNESP, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas, Área
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

BOTUCATU - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Satrapa, Rafael Augusto.

Influência dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e II), seus receptores (IGFR-I e II), proteínas ligantes (IGFBP-2 e 4) e PAPP-A na aquisição de tolerância ao estresse térmico calórico de embriões bovinos (Nelore vs Holandês) produzidos *in vitro* / Rafael Augusto Satrapa. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2011

Orientador: Ciro Moraes Barros

Capes: 21005001

1. Bovino - Embrião. 2. Farmacologia molecular. 3. Apoptose.

Palavras-chave: Apoptose; Bovino; Embrião; Estresse térmico; IGF.

Dedicatória

Dedico este trabalho

À minha esposa **Débora**, que sempre me apóia irrestritamente nas minhas decisões, me revigora nos momentos de fraqueza e é cúmplice nas minhas jornadas. A força incondicional do amor que nos une transcende o que as palavras são capazes de descrever.

Ao meu pai **Rodolpho**, às minhas irmãs **Gisele, Patrícia e Raquel**, aos meus cunhados **Marcos, Raylson e Cley**, aos meus sogros **Carlos Alberto e Nívea Mara**, aos meus primos **Rodrigo, Rose, Sérgio e Luciene** e aos meus sobrinhos **João Victor, João Pedro, Gabriel, Davi e Lorenzo**: parecia estar tão distante, mas enfim, chegou. Não o fim, mas somente uma etapa vencida. Agradeço aos meus familiares e os dedico esta tese, pois vocês são o motivo da minha vida, a alegria do meu dia e a força de que preciso.

Especialmente à minha **mãe Thereza e minhas avós Gisela e Rafaela** (*in memoriam*), pois elas deixaram não só a saudade para quem fica, mas sim os ensinamentos que me fizeram conquistar tudo que tenho até hoje. No amanhã, elas farão falta, mas suas vozes aconchegantes estarão sempre me guiando em bons caminhos.

Agradecimientos

Especialmente ao meu orientador, Professor Dr. Ciro Moraes Barros: exemplo de profissionalismo e ética científica. Ensinou-me a questionar, a procurar a resposta para a dúvida; mas, sobretudo, ensinou-me a ter paixão pela pesquisa;

À minha esposa Débora. Agradeço por ter sido companheira e carinhosa nos momentos de alegria. Eu te amo por ter sido ainda mais companheira e carinhosa nos momentos de dificuldades;

A todos os meus familiares, principalmente à Rodolpho, Gisele, Marcos, Patrícia, Raylson, Raquel, Cley, Rodrigo, Rose, Sérgio e Luciene. É impossível expressar em palavras o quanto eu os amo! Essa é mais uma de nossas vitórias;

À família Avellaneda Penatti: Anacleto, Wanda, Carlos Alberto, Nívea Mara, Marco Aurélio, Carlos Alberto, Eliana, Natália e Heitor. Considero-lhes minha família e agradeço muito pela colaboração e pela torcida;

Aos meus amigos Walter, Guta, Bruno, Vanessa, Vinícius, Dani, Diego, Dani, Leo, Mariana, Fernanda, Juliano: obrigado pelas conversas, boas risadas e, sobretudo pela amizade. Agradeço, especialmente, aos amigos Eduardo, Renato, Cíntia, Thaís, Anthony, Pegorer, Raquel, Henrique e Janahi pelo auxílio no desenvolvimento do experimento e pela amizade demonstrada. Aos amigos de pós-graduação Ronaldo, Rafaela, Carol, Patrícia, Celso, Rúbia, Ester, Felipe, Paula, Antônio, José Renato, Cicília: vocês fazem parte desta conquista;

Ao meu grande amigo Eduardo Razza: “o verdadeiro amigo é aquele que te conhece tal como és, acompanha-te em teus lucros e teus fracassos, celebra tuas alegrias, compartilha tua dor e jamais te julga por teus erros.” Sei que posso contar com você nos momentos difíceis e nos chopps aos finais de semana.

Aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pelos ensinamentos, pela amizade criada e pelos momentos agradáveis que passamos juntos;

Ao professor Josmar Mazucheli do Departamento de Estatística da Universidade Estadual de Maringá, pela realização da análise estatística deste trabalho. Obrigado pela paciência e disponibilidade prestada;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia: Ana Cristina Murcia de Souza, Janete Teixeira, Luiz Antônio de Oliveira e Paulo César Mioni. Obrigado pela amizade e pelos bons momentos compartilhados;

À Senhora Ione Yoneda Botelho, por permitir que o experimento fosse realizado em sua propriedade (fazenda “Botelho”). Aos Frigoríficos “Frigol” e “Mondelli” por permitirem as coletas dos ovários utilizados no experimento;

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

MUITO OBRIGADO!

Sumário

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Capítulo 1 pag. 14

Introdução e Objetivo pag. 15

Revisão de Literatura pag. 21

Referências Bibliográficas pag. 35

Capítulo 2 pag. 49

Resumo pag. 51

Introdução pag. 52

Material e Método pag. 54

Resultados pag. 59

Discussão e Conclusão pag. 63

Referências pag. 66

Capítulo 3 pag. 71

Resumo pag. 73

Introdução pag. 74

Material e Método pag. 76

Resultados pag. 81

Discussão e Conclusão pag. 84

Referências pag. 88

Listas

Lista de Abreviaturas

ACNB - Associação dos Criadores de Nelore do Brasil;

BSA - albumina sérica bovina;

CO₂ - gás carbônico;

COCs - (*cumulus oocytes complexes*): complexo cúmulos – oócito;

ET - estresse térmico calórico;

FSH - hormônio folículo estimulante;

g - Força gravitacional;

G - Gauge (unidade de medida de calibre);

HPB - Holandês (a) Preto e Branco;

hpi - horas pós-inseminação;

LH - hormônio luteinizante;

mg – miligrama;

mL - mililitro;

mm - milímetros;

mM - milimolar;

N₂ - nitrogênio;

NaCl - cloreto de sódio;

O₂ - oxigênio;

PHE - Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina;

PIV - produção de embriões *in vitro*;

rpm - rotações por minuto;

SOF - (synthetic oviduct fluid): fluído sintético de oviduto;

TCM - (tissue culture médium): meio para cultivo tecidual;

UI - unidades internacionais;

US – Ultrassom;

µg – micrograma;

µL - microlitro

Lista de Figuras

Capítulo 2

Figura 1. Taxas (Média \pm EPM) de clivagem (CLI), mórula (MO), blastocisto (BI) e blastocisto eclodido (Be) de embriões dos grupos SFB (5% de SFB + 0 ng/mL de IGF-I), IGF (0% de SFB + 100 ng/mL de IGF-I), SFB+IGF (5% de SFB + 100 ng/mL de IGF) e controle (0% de SFB + 0 ng/mL de IGF-I).....pag. 60

Figura 2. Taxas de blastocistos de embrião das raças Nelore ou Holandesa Preto e Branco (HPB), cultivados na presença (+ IGF) ou ausência (- IGF) de IGF-I e mantidos a 39 °C ou submetidos ao ET de 41°C por 9h, 96 hpi.....pag. 61

Figura 3. Taxa de apoptose (Média \pm EPM) de embriões das raças Nelore ou Holandesa Preto e Branco (HPB), cultivados na presença (+ IGF) ou ausência (- IGF) de IGF-I e mantidos a 39 °C ou submetidos ao ET de 41°C por 9h, 96 hpi.....pag. 63

Capítulo 3

Figura 1. Expressão gênica de IGF-I e II e seus receptores nos “*pools*” de oócitos provenientes de ovários de vacas das raças Nelore e Holandesa Preto e Branco (HPB).....pag. 81

Figura 2. Expressão gênica das IGFBP-2 e 4 nos “*pools*” de oócitos provenientes de ovários de vacas das raças Nelore e Holandesa Preto e Branco (HPB).....pag. 82

Figura 3. Expressão gênica da PAPP-A nos “*pools*” de oócitos provenientes de ovários de vacas das raças Nelore e Holandesa Preto e Branco (HPB).....pag. 82

Figura 4. Expressão gênica do IGF-I em “*pools*” (n=5) de blastocistos provenientes de ovários de vacas das raças Nelore (N) e Holandesa Preto e Branco (H), submetidos ou não ao estresse térmico (ET).....pag. 83

Figura 5. Expressão gênica das IGFBP-2 e 4 em “*pools*” (n=5) de blastocistos provenientes de ovários de vacas das raças Nelore (N) e Holandesa Preto e Branco (H), submetidos ou não ao estresse térmico (ET).....pag. 83

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1. Taxas de clivagem (CLI), mórula (MO) e blastocisto (BL) de embriões de vacas das raças Nelore ou Holandês Preto e Branco (HPB), tratados (+ IGF) ou não (- IGF) com IGF-I recombinante humana no meio de cultivo e mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse térmico (ET) de 41 °C por 9 h, 96 hpi.....pag. 62

Tabela 2. Média (\pm EPM) do número total de células e da taxa de apoptose de embriões das raças Nelore ou Holandês Preto e Branco (HPB), tratados (+ IGF) ou não (- IGF) com IGF-I recombinante humana no meio de cultivo e mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse térmico (ET) de 41 °C por 9 h, 96 hpi.....pag. 63

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

Revisão da Literatura

Referências Bibliográficas

Introdução e Objetivos

INTRODUÇÃO

Acima de 50% do rebanho bovino mundial se encontra nos trópicos e é submetido a temperaturas mais altas do que animais que habitam climas temperados. A raça Nelore é a raça zebuína (*Bos indicus*) predominante no Brasil (90 milhões de cabeças; ACNB, 2006) e está se tornando mais popular em outros países tropicais e subtropicais da América do Sul e no mundo (Barros & Nogueira, 2001; Bo *et al.*, 2003), devido a sua maior resistência a altas temperaturas, umidade e parasitas, quando comparada às raças derivadas do gado europeu (*Bos taurus*, Hansen, 2004; Barros *et al.*, 2006).

Os processos reprodutivos em mamíferos, machos e fêmeas, são muito sensíveis às alterações pela hipertermia, com as conseqüências mais pronunciadas sendo a redução quantitativa e qualitativa da produção de esperma nos machos e queda da fertilidade nas fêmeas. A infertilidade dos machos ocasionada pelo estresse térmico (ET) pode ser eliminada por meio da inseminação artificial com sêmen coletado e congelado em ambiente adequado (Hansen *et al.*, 2001).

Nas fêmeas, esta situação é mais complicada (Hansen *et al.*, 2001). Está bem documentado que a exposição de fêmeas de mamíferos ao ET aumenta a mortalidade embrionária (Thatcher & Hansen, 1993). A maior causa da redução na sobrevivência embrionária induzida pelo ET pode ser originada pelos efeitos adversos das temperaturas elevadas no desenvolvimento dos zigotos e dos embriões (Ealy *et al.*, 1993).

Existem diferenças genéticas na resistência ao ET, com as raças adaptadas apresentando menores temperaturas durante o ET do que raças não adaptadas (McDowell *et al.*, 1953; Finch, 1986; Gaughan *et al.*, 1999; Hammond *et al.*, 2004). Devido ao gado zebuino ser termotolerante, as conseqüências da exposição ao ET na produção de leite e carne são menores para o gado *Bos indicus* do que para o *Bos taurus* (Hansen, 2004). Assim, se comparado com o gado europeu, o gado zebuino sofre redução menos severa na ingestão alimentar (Allen *et al.*, 1963; Seif *et al.*, 1979), taxa de crescimento (O'Bannon *et al.*, 1955, Cartwright, 1955), produção de leite (Johnson, 1965) e funções reprodutivas (Johnston *et al.*, 1963; Skinner & Louw, 1966; Rocha *et al.*, 1998) em resposta ao ET.

A fase de pré-implantação representa um período extremamente dinâmico da embriogênese, no qual o embrião se desenvolve a partir de uma única célula, dependente do controle genético da transcrição materna, para um conjunto de células altamente ativa metabólica e sinteticamente, possuindo controle genético próprio. Durante esse período o embrião passa por várias divisões celulares, ativa o genoma embrionário, sofre compactação, forma um epitélio de transporte, diferencia-se em dois tipos celulares distintos e desenvolve a cavidade da blastocela. Essas funções requerem a regulação precisa de várias funções celulares como a homeostasia, metabolismo e expressão gênica (Lane, 2001).

A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do genoma embrionário é ainda inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é um aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre (Paula-Lopes & Hansen, 2002). Utilizando sistema de cultivo *in vitro*, Rocha *et al.* (1998); Al-Katanani & Hansen (2002), mostraram que a temperatura elevada reduziu a sobrevivência dos embriões em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário.

Os efeitos do ET sobre a viabilidade do embrião diminuem de acordo com o avanço da prenhez (Biggers *et al.*, 1987; Ealy & Hansen, 1994; Edwards & Hansen, 1997; Hansen, 1999; Edwards *et al.*, 2001), sendo mínimos a partir do terceiro dia em bovinos (Ealy *et al.*, 1993). Uma possível explicação para esse fenômeno é que os embriões se tornam mais resistentes aos efeitos negativos do ET à medida que avançam no seu desenvolvimento (Edwards & Hansen, 1997).

Paula-Lopes *et al.* (2003) observaram que embriões (≥ 9 células) de raça resistente ao calor (Brahman), se desenvolveram melhor até o estágio de blastocisto após ET (41 °C por 6 horas) do que embriões de raças sensíveis ao calor (Holandesa e Angus). De forma similar, embriões da raça Nelore (zebuíno) são mais resistentes ao ET do que embriões mestiços (oócito taurino

x sêmen zebuíno; Barros *et al.*, 2002) ou taurinos (HPB, Barros *et al.*, 2006) desenvolvidos *in vitro*.

Os mecanismos celulares envolvidos no fenômeno da termotolerância estão sendo estudados e um dos aspectos explorados é que a resposta termoprotetora do embrião envolve a produção das proteínas conhecidas como HSP (heat shock proteins). A indução da produção de HSP(s) em resposta ao estresse serve para proteger as células contra a agressão, aumentando a recuperação e induzindo um estado de resistência a um subsequente estresse (Neuer *et al.*, 2000). HSP(s) são preferencialmente expressas em resposta a um grupo de injúrias, incluindo a hipertermia, metais pesados, etanol, inflamação e infecção. Sua produção é aumentada durante o cultivo de embriões *in vitro* e estão entre as primeiras proteínas produzidas durante o crescimento de embriões de mamíferos (Neuer *et al.*, 2000). A ação das HSP(s) é atribuída a uma ativa participação na minimização de interações incorretas entre as moléculas, mantendo-as em seu estado natural e reparando ou promovendo a degradação de proteínas alteradas (Neuer *et al.*, 2000). Além disso, as HSP(s) podem modular a apoptose celular, que é um dos mecanismos envolvidos na proteção embrionária durante a exposição ao ET (Al-Katanani & Hansen, 2002; Neuber *et al.*, 2002).

A apoptose nos mamíferos tem um papel importante no controle da qualidade do desenvolvimento embrionário, uma vez que, através desse mecanismo são eliminadas células danificadas, não funcionais e anormais. Por outro lado, a habilidade do embrião inicial sobreviver em temperaturas elevadas pode estar ligada à diminuição da taxa de apoptose (Paula-Lopes & Hansen, 2002), com conseqüente aumento no número de células nos embriões, ou ao desenvolvimento de mecanismos termoprotetores bioquímicos como, por exemplo, as proteínas HSP, antioxidantes como a glutathione (Malayer & Hansen, 1990; Edwards & Hansen, 1997) e fatores de crescimento como o IGF-1 (Jousan & Hansen, 2004, 2006).

Sartorelli *et al.* (2006) observaram que o estresse térmico aumentou a taxa de apoptose em embriões tanto da raça Nelore quanto da raça Angus. Além disso, a porcentagem de células apoptóticas, 120 horas após a inseminação, foi mais elevada nos embriões da raça Angus, quando comparados aos da raça Nelore.

Outros mecanismos que podem influenciar os fenômenos da termoproteção são os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), que foram identificados no líquido folicular (Spicer & Echterkamp, 1995), em secreções uterinas (Geisert *et al.*, 1991), no trato reprodutivo feminino (Schmidt *et al.*, 1994; Brigstock *et al.*, 1996; Gabler *et al.*, 1997) bem como em oócitos e embriões bovinos (Yoshida *et al.*, 1998; Yaseen *et al.*, 2001; Lonergan *et al.*, 2000, 2003). Além disso, foi demonstrado que, em vacas da raça Brahman, as concentrações plasmáticas de IGF-I e IGFBP (Simpson *et al.*, 1994), bem como a concentração sanguínea de IGF-1 total (Alvarez *et al.*, 2000) são mais elevadas do que em vacas da raça Angus.

O transporte e a função dos IGFs são modulados pelas interações de pelo menos seis proteínas de ligação a fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFBPs), que estão presentes em muitos líquidos extracelulares e em embriões em fases adiantadas de desenvolvimento (Heyner *et al.*, 1993; Kaye & Harvey, 1995; Winger *et al.*, 1997; Luciano *et al.*, 2000). As IGFs aumentam a proliferação celular, a mitogênese e a atividade de hormônios esteróides (Adashi *et al.*, 1985; Kamada *et al.*, 1992). Tanto os IGFs tipos 1 e 2, como seus receptores (IGFR-1 e IGFR-2), são expressos durante todo o desenvolvimento de embriões bovinos e ovinos produzidos *in vitro* (Schultz, *et al.*, 1992; Watson *et al.*, 1992, 1994; Winger *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1998). Além disso, a expressão das IGFBPs (tipos 1, 2, 3, 4, 5, 6) foi demonstrada em embriões de ratos (Schultz *et al.*, 1992; Schüller *et al.*, 1993) e de bovinos (Winger *et al.*, 1997; Sawai *et al.*, 2005).

Os efeitos benéficos do IGF-1 no desenvolvimento embrionário, tanto na presença quanto na ausência de estresse, têm sido demonstrados em várias espécies. A adição de IGF-1 ao meio de cultura proporcionou um aumento no número de mórulas e blastocistos, bem como reduziu a incidência de apoptose embrionária em várias espécies (Lighten *et al.*, 1998; Herrler *et al.*, 1998; Fabian *et al.*, 2004), inclusive em bovinos (Matsui *et al.*, 1995; Lonergan *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 2002; Makarevich *et al.*, 2002; Jousan & Hansen, 2004).

Além de aumentar a taxa de blastocisto, Block *et al.* (2003) demonstraram também um aumento nas taxas de prenhez e nascimento de embriões produzidos *in vitro* tratados com IGF-1 e transferidos para vacas holandesas em lactação submetidas a estresse térmico.

OBJETIVOS

Objetivo geral: estudar *in vitro* e de forma comparativa a resistência ao estresse térmico (ET) de embriões das raças Nelore (NEL) e Holandesa Preto e Branco (HPB).

Objetivos específicos:

Capítulo 2:

- 1) verificar se a adição de IGF-I ao meio de cultivo, na ausência de soro fetal bovino (SFB), é capaz de manter as taxas de produção embrionária semelhantes às obtidas em meio de cultivo com SFB;
- 2) verificar *in vitro* e de forma comparativa (NEL vs HPB) a influência da adição de IGF-I ao meio de cultivo no desenvolvimento de embriões submetidos ao ET;
- 3) verificar *in vitro* e de forma comparativa (NEL vs HPB) a influência do ET na taxa de apoptose de embriões bovinos;

Capítulo 3

- 4) determinar a expressão dos RNAm dos IGF-I e II, seus receptores (IGFR-I e II), as proteínas ligantes (IGFBP-2 e 4) e PAPP-A em oócitos e blastocistos bovinos (NEL vs HPB), submetidos ou não ao ET.

HIPÓTESES A SEREM TESTADAS

- 1) a adição de IGF-I ao meio de cultivo, na ausência de SFB, é capaz de manter as taxas de produção embrionária semelhantes às obtidas em meio de cultivo com SFB;
- 2) a adição de IGF-I ao meio de cultivo é mais eficiente em diminuir ou efeitos deletérios do ET em embriões da raça HPB quando comparados a embriões da raça Nelore;
- 3) o efeito deletério do ET no desenvolvimento embrionário e na taxa de apoptose é mais acentuado em embriões da raça HPB, quando comparados a embriões da raça Nelore;
- 4) verificar se o sistema IGF está mais expresso tanto em oócitos como em blastocistos provenientes de vacas da raça Nelore, quando comparados aos da raça Holandesa Preto e Branco (HPB), submetidos ou não ao ET.

Revisão da Literatura

EFEITOS DELETÉRIOS DO ESTRESSE TÉRMICO CALÓRICO (ET)

Estudos *in vivo*

Os bovinos, mamíferos pertencentes à família *Bovidae*, são divididos em dois gêneros: *Bos taurus*, que abrange o gado europeu e *Bos indicus*, gado originalmente encontrado na Índia, Ásia e África, também conhecido como gado zebu ou indiano. Esses gêneros são constituídos por várias raças com características para produção de carne (gado de corte), leite (gado leiteiro) ou para dupla aptidão (Albright & Arave, 1997; Getty, 1986; Santiago, 1985).

Acima de 50% do rebanho bovino mundial se encontra nos trópicos (Wolfenson *et al.*, 2000), onde fatores estressantes como as altas temperaturas e umidades em certos períodos do ano, a sub-alimentação crônica, os riscos de doenças e de parasitas, notavelmente são maiores do que em regiões de clima temperado (Hansen, 2004; Barros *et al.*, 2006). Nestas condições ambientais, às raças zebuínas são as que predominam, devido a sua maior adaptação em relação às raças européias.

Nos mamíferos, os processos reprodutivos são sensíveis às alterações por hipertermia, resultando em redução da qualidade e quantidade de espermatozóide nos machos e queda da fertilidade nas fêmeas (Hansen *et al.*, 2001). A infertilidade dos machos ocasionada pelo ET pode ser eliminada por meio da inseminação artificial. Nas fêmeas esta situação é mais complicada (Hansen *et al.*, 2001).

Está bem documentado que a exposição de fêmeas de mamíferos ao ET aumenta a mortalidade embrionária (Thatcher & Hansen, 1993). A maior causa da redução da sobrevivência embrionária induzida pelo ET pode ser originada pelos efeitos adversos das temperaturas elevadas no desenvolvimento dos zigotos e dos embriões (Ealy *et al.*, 1993). Putney *et al.* (1989) observaram que a exposição de novilhas HPB ao ET entre o primeiro estro e a inseminação aumentou a proporção de embriões anormais e com desenvolvimento retardado quando comparados a novilhas mantidas em termo-neutralidade.

A fase de pré-implantação embrionária corresponde a um período extremamente dinâmico da embriogênese onde o embrião se desenvolve de uma única célula quiescente sobre o controle genético de transcrição materna,

para um grupo de células altamente ativo tanto na função metabólica como na síntese protéica, sobre o seu próprio controle genético. Durante esse período o embrião deve passar por várias divisões celulares, ativar o genoma embrionário, sofrer compactação celular, formar um epitélio de transporte, diferenciar-se em dois tipos celulares e desenvolver a cavidade chamada de blastocele. Essas funções requerem a regulação precisa de várias funções celulares como a homeostasia, o metabolismo e a expressão gênica (Lane, 2001).

O desenvolvimento do embrião no período pré-implantação é muito suscetível a interrupção, principalmente pelo ET (Putney *et al.*, 1989; Badinga *et al.*, 1993; Edwards & Hansen, 1997; Rocha *et al.*, 1998; Paula-Lopes *et al.*, 2001; Zeron *et al.*, 2001). Em rebanhos criados nos Estados Unidos da América, o aumento na temperatura de 29,7 °C em abril para 33,9 °C em julho foi associado com um declínio nas taxas de concepção no primeiro serviço de 25% para 7% (Cavestany *et al.*, 1985).

Durante os períodos sazonais de ET, a fertilidade declina resultando em menores taxas de concepção (Thatcher & Collier, 1986; Her *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1998a). Na Flórida, as taxas de concepção de vacas em lactação caem de 48% em março para 18% em julho e não se recuperam até novembro (Badinga *et al.*, 1985). Ingraham *et al.* (1976) observaram que as taxas de concepção de vacas leiteiras estão inversamente relacionadas à temperatura ambiente durante a fase folicular. Durante o outono, as taxas de concepção de vacas leiteiras em regiões subtropicais e países de clima quente são menores que no inverno, embora a temperatura ambiente tenha diminuído e as vacas não estejam mais expostas ao ET de verão, indicando a existência de um efeito retardado do ET na fertilidade (Roth *et al.*, 1999, Roth *et al.*, 2001). Além disso, a redução nas taxas de prenhez durante o verão pode atingir valores de 20 a 30% quando comparado ao inverno (Cavestany *et al.*, 1985; Badinga *et al.*, 1985; De Rensis *et al.*, 2002).

A dificuldade dos animais, sob ET, em estabelecer prenhez pode ser decorrente de alterações nos processos fisiológicos em vários níveis. As funções dos oócitos (Lenz *et al.*, 1983) e do embrião inicial (Ealy *et al.*, 1993, 1995) são alteradas por temperaturas elevadas. Para Zeron *et al.*, (2001) uma possível explicação para os efeitos da temperatura ambiente no

desenvolvimento embrionário está na modificação das propriedades físicas e bioquímicas das membranas celulares. Esses autores, ao avaliarem o efeito da estação do ano na dinâmica folicular, viabilidade do oócito e possíveis interações com as propriedades físicas e bioquímicas das suas membranas, encontraram diferenças na morfologia de oócitos no inverno e verão, e uma maior porcentagem de ácidos graxos saturados presente nos oócitos durante o verão, enquanto que a porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados era maior em oócitos e células da granulosa durante o inverno. Essas alterações podem levar a mudanças nas propriedades bioquímicas das membranas e, conseqüentemente, influenciar na funcionalidade e fertilidade dos oócitos. Contudo, Edwards & Hansen (1996) sugerem que as células do *cumulus* podem fornecer termoprotetores extracelulares ou produzir moléculas regulatórias que causem a ativação de mecanismos de proteção térmica do oócito.

Além disso, o ET pode comprometer o desenvolvimento embrionário por reduzir o fluxo de sangue uterino e aumentar a temperatura uterina (Gwazdauskas *et al.*, 1975; Roman-Ponce *et al.*, 1978), reduzir as concentrações plasmáticas de estradiol (Gwazdauskas *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 1998a; Wilson *et al.*, 1998b), e por alterar a secreção de proteínas uterinas (Malayer *et al.*, 1988; Malayer & Hansen, 1990). Estas alterações inibem o desenvolvimento embrionário (Rivera & Hansen, 2001), aumentam a perda do embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento, reduzem o sucesso da inseminação artificial e da produção de embriões por superovulação (Gordon *et al.*, 1987; Alfujairi *et al.*, 1993). O ET pode promover o aumento da secreção de prostaglandina pelo endométrio e promover luteólise prematura em decorrência da dificuldade do embrião gerar sinais bioquímicos que sinalizam a gestação (Putney *et al.*, 1988; Putney *et al.*, 1989).

Adicionalmente, o ET altera o padrão de desenvolvimento folicular em bovinos (Roth *et al.*, 2000), diminui o tamanho do folículo dominante da primeira e segunda ondas foliculares do ciclo estral (Badinga *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1998a; Wilson *et al.*, 1998b) e deprime a dominância folicular (Badinga *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1998b; Guzeloglu *et al.*, 2001). Conseqüentemente, mais de um folículo dominante poderia se desenvolver no período pré-ovulatório, resultando em dupla ovulação (Kornmatitsuk *et al.*,

2008; Ryan & Boland 1991). Em estudo realizado por Torres Júnior *et al.* (2008), vacas da raça Gir (*Bos indicus*) foram submetidas ao ET e apresentaram efeito retardado sobre a função reprodutiva, manifestando maior incidência de folículos grandes e codominância folicular, reduzindo a duração do ciclo estral, concentração de progesterona (P_4) e capacidade de desenvolvimento do oócito. As alterações no desenvolvimento folicular durante o ET provavelmente afetam outros eventos reprodutivos como a secreção de gonadotrofinas (Gilad *et al.*, 1993), desenvolvimento do corpo lúteo (Wolfenson *et al.*, 1993) e consequentemente secreção de P_4 (Breuel *et al.*, 1993).

Os efeitos da alta temperatura ambiente nas funções reprodutivas são exacerbados pelo aumento na produção de calor metabólico associado à lactação (Sartori *et al.*, 2002) e pelo aumento da umidade relativa (Bianca, 1965; West, 2003). Vacas em lactação são mais suscetíveis ao ET do que novilhas (Cavestany *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 1998b; Pires *et al.*, 2001) e uma explicação seria o fato de que o calor metabólico produzido pelas vacas em lactação promove hipertermia durante o verão, enquanto que em novilhas a produção de calor metabólico é menor e, provavelmente, não apresentam hipertermia nas mesmas temperaturas ambientais que as vacas (Wilson *et al.*, 1998b).

Pires *et al.* (2001), trabalhando com animais puros de origem (PO) da raça HPB no estado de Minas Gerais, relataram influência positiva do verão (época das chuvas) nas taxas de prenhez de novilhas (85,4% no verão e 78,3% no inverno). Por outro lado, as taxas de prenhez de vacas em lactação foram 45,7 e 71,2% no verão e no inverno, respectivamente, demonstrando um efeito negativo do aumento da temperatura (verão) na fertilidade das vacas.

A resistência ao ET está possivelmente relacionada com características genéticas e raciais do animal. Desta forma, raças adaptadas apresentam menores temperaturas corpóreas durante o ET do que raças não adaptadas (Hammond *et al.*, 1996, 1998; Gaughan *et al.*, 1999). A habilidade de raças adaptadas em regular a temperatura corpórea durante o ET é o resultado de menores taxas metabólicas, bem como maior capacidade de perda de calor (Hansen, 2004), contribuindo assim para a maior fertilidade desses animais (Hansen, 1999). Entre as raças zebuínas e européias, há diferenças quanto à resistência ao ET. O gado zebuino possui maior capacidade de regular a

temperatura corporal em resposta ao ET do que o gado de origem européia (Hansen, 2004).

Evidências comprovam que raças adaptadas a climas quentes adquirem genes que protegem suas células contra os efeitos deletérios do ET (Hansen, 2004). A influência do ET sobre as células pode ser observada nas raças HPB e Brahman, onde ocorre uma maior redução na síntese de DNA das células endometriais de vacas HPB do que em vacas Brahman (Malayer & Hansen, 1990). Adicionalmente, a exposição a elevadas temperaturas exerce um efeito menos deletério sobre os linfócitos de raças adaptadas ao calor (Brahman e Senepol) do que sobre os linfócitos de raças não adaptadas (Angus; Kamwanja *et al.*, 1994; Paula-Lopes *et al.*, 2003).

Dikmen *et al.* (2009) demonstraram que a regulação da temperatura corpórea em vacas em lactação pode ser influenciada pela heterose. Neste estudo foi avaliado o efeito do genótipo na capacidade de termorregulação em vacas das raças HPB, Jersey, mestiças (Sueca Vermelha x HPB) e mestiças (Jersey x HPB). Os resultados apontaram que vacas mestiças (Jersey x HPB) apresentaram maior capacidade de termorregulação em relação às outras raças, evidenciando assim, o efeito da heterose sobre a termorregulação. Além disso, Pegorer *et al.* (2007) observaram que, durante o verão, a inseminação artificial de vacas HPB com touros da raça Gir resultou em taxas de prenhez mais elevadas do que a IA com touros HPB. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Prayaga (2003), o qual demonstrou que o cruzamento entre raças zebuínas e taurinas apresenta melhor adaptabilidade as condições ambientais do que o cruzamento apenas entre raças taurinas. Desta forma, é provável que a capacidade de termorregulação possa ser melhorada através de cruzamentos adequados e pela exploração da heterose.

Estudos *in vitro*

Trabalhos *in vitro* demonstram que a exposição do oócito ou do embrião ao ET influencia no seu subsequente desenvolvimento. Oócitos de vacas HPB, aspirados durante o verão, apresentaram menor capacidade de desenvolvimento até a fase de blastocisto após a fertilização *in vitro*, comparado a oócitos obtidos durante o inverno (Rocha *et al.*, 1998; Al-Katanani

& Hansen 2002). Além disso, a exposição do complexo *cumulus*-oócito (COCs) de bovinos a elevadas temperaturas nas primeiras 12 horas de maturação *in vitro* comprometem arquitetura do citoesqueleto, reduzem a maturação nuclear do oócito (Roth & Hansen, 2005), alteram a síntese de novas proteínas (Edwards & Hansen, 1996, 1997), promove o aumento de radicais livres (Lawrence *et al.*, 2004) e induzem o oócito à apoptose (Roth & Hansen, 2004). Estes efeitos deletérios diminuem a capacidade do oócito se desenvolver a blastocisto após a fertilização *in vitro* (Edwards *et al.*, 1997).

Edwards & Hansen (1996) observaram que a exposição de oócitos ao ET de 41 °C por 12 horas reduziu seu desenvolvimento até a fase de blastocisto (30% vs 10% para oócitos cultivados a 39 e 41 °C, respectivamente). Resultados semelhantes foram relatados em outro experimento realizado por Edwards & Hansen (1997, 35% vs 18% para oócitos cultivados a 39 e 41 °C, respectivamente). Além disso, Rivera & Hansen (2001) verificaram que o ET a 41 °C, aplicado durante a fertilização e nos estágios de uma ou duas células, prejudica o desenvolvimento embrionário.

Experimentos realizados *in vitro*, nos quais embriões bovinos foram expostos a um padrão de temperatura ambiente semelhante àquele experimentado por vacas leiteiras em fase de lactação na Flórida, submetidas ao ET (EUA; temperatura variando de 38,5 a 40,5 °C, durante 8 dias de cultivo *in vitro*; Rivera & Hansen, 2001) ou na região sudeste de Queensland (Austrália, temperatura variando de 39,5 a 41,0 °C, durante as primeiras 48h de cultivo *in vitro*; Sugiyama *et al.* 2007), mostraram desenvolvimento reduzido até a fase de blastocisto. Desta forma, estes estudos demonstram que as altas temperaturas em determinadas épocas do ano podem influenciar negativamente na produção embrionária.

Vários estudos demonstram que embriões *Bos indicus* e *Bos taurus* adaptados (Romosinuano) são menos afetados por elevadas temperaturas do que embriões *Bos taurus* não adaptados (HPB e Angus, Block *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2006). Paula-Lopes *et al.* (2001) observaram que embriões de raça resistente ao calor (Brahman) se desenvolveram melhor após o ET do que embriões de raças sensíveis ao calor (HPB e Angus). De forma similar, Barros *et al.* (2002) e Monteiro *et al.* (2009) observaram que embriões da raça Nelore foram mais resistentes ao ET que embriões mestiços (oócito taurino x sêmen

zebuíno) desenvolvidos *in vitro*. Hernández-Céron *et al.* (2004) mostraram que embriões Brahman e Romosinuano são mais resistentes ao ET que embriões da raça Angus, onde os embriões Angus, Brahman e Romosinuano cultivados a 38,5 e 41 °C tiveram taxa de formação de blastocistos de 30,3±4,6%, 25,1±4,6% e 28,3±4,1% contra 4,9±4,6%, 13,6±4,6% e 17,5±4,1%, respectivamente.

Não está claro se existem diferenças entre as raças na aquisição de termotolerância antes da ativação do genoma embrionário (8 a 16 células). Krininger *et al.* (2003) determinaram que embriões das raças Brahman e HPB, quando submetidos ao ET de 41 °C no estágio de 2 a 8 células, não apresentaram diferenças nas taxas de blastocisto. Entretanto, observaram que houve uma tendência dos embriões da raça Brahman se desenvolverem mais rapidamente do que os embriões da raça HPB.

A aquisição de termotolerância embrionária pode ser conferida pelo oócito, pelo espermatozóide ou por ambos, como demonstram alguns estudos. Nabhan *et al.* (2010), utilizando oócitos provenientes de vacas HPB puras, fertilizados com sêmen de touros zebuíno (n=6; raça Gir) e taurino (n=6; raça HPB), não evidenciaram o efeito da raça do touro, após o ET. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Saito (2006) que também utilizaram seis touros das raças Gir e HPB para fertilizar oócitos de vacas HPB e não observaram diferenças significativas nas taxas de blastocisto e blastocisto eclodido entre os touros Gir e HPB, demonstrando não haver influência da raça do touro na aquisição de termotolerância. O efeito da raça do touro na sensibilidade embrionária ao ET também não foi evidenciado por Block *et al.* (2002) que utilizaram sete touros das raças Angus e Brahman na fertilização de oócito HPB submetendo-os ao ET (96hpi, 41 °C, 6 horas). Todos estes experimentos sugerem que o oócito tem um papel crucial na termotolerância embrionária. Por outro lado, Eberhardt *et al.* (2009) observaram que oócitos de vacas HPB, fertilizados com sêmen Nelore (n=2), são mais resistentes ao ET do que oócitos HPB fertilizados com sêmen Angus, indicando que, além do oócito, a raça do touro também pode influenciar a resistência do embrião ao ET.

O fato de Eberhardt *et al.* (2009) terem utilizado apenas dois touros para cada raça, pode ter influenciado os resultados, ou seja, o efeito do touro em si

pode ter sido preponderante em relação a influência da raça (*Bos indicus* vs *Bos taurus*) na resistência ao ET. De fato, vários estudos mostram que a produção *in vitro* de embriões pode variar de 0 a 36% de acordo com o touro utilizado (Lacandra *et al.*, 1993; Lazzari & Galli, 1993; Parrish *et al.*, 1986). Palma & Sinowatz (2004) testaram 63 touros na produção de embriões *in vitro* e observaram que houve variações de touro para touro nas taxas de clivagem (36,3 a 93,4%) e de blastocisto (6,9 a 51,2%). Estes dados são indicativos de que há diferenças entre touros quanto a sua capacidade de fertilização (Hillery *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1990).

Papel dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) em oócitos e embriões bovinos

A família de fatores de crescimento semelhante à insulina é formada pelos fatores de crescimento IGF-I e IGF-II. Ambos são polipeptídeos estruturalmente relacionados à pró-insulina e apresentam receptores específicos na superfície celular. O IGF circula no plasma ligado a proteínas específicas, as proteínas de ligação ao IGF (do inglês IGF-binding proteins - IGFBP), que têm como função levar o IGF às suas células alvos (Kane *et al.*, 1997). O transporte e a função dos IGFs são modulados pelas interações de pelo menos seis IGFBPs.

Os membros da família IGF desempenham papel importante na função ovariana e desenvolvimento embrionário. Receptores de IGF-I estão presentes em COCs (Nuttinck *et al.*, 2004) e embriões no estágio de pré-implantação (Lonergan *et al.*, 2000) sugerindo a importância deste fator de crescimento na função oocitária e embrionária.

As ações do IGF são muitas, sendo geralmente efeitos anabólicos no metabolismo de proteínas e carboidratos. Seus efeitos mais conhecidos são: na progressão do ciclo celular, estimulando a síntese de DNA e replicação celular; na proliferação celular, devido ao fato de diversos tipos celular terem mostrado uma resposta mitogênica à estimulação com IGF-I; na apoptose, por ter a capacidade de, em certas células, inibir a morte celular; na função celular, por regular a secreção hormonal e potencializar a função em diversos tipos celulares; na diferenciação celular, por induzir a expressão de determinados

genes e levar a célula a se diferenciar (Jones & Clemmons, 1995; Adashi *et al.*, 1985).

Tanto as IGFs tipos I e II, como seus receptores (IGFR-I e IGFR-II), são expressos em oócitos e durante todo o desenvolvimento de embriões bovinos e ovinos produzidos *in vitro* (Winger *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1998). Além disso, a expressão das IGFBPs (1 a 6) foi demonstrada em oócitos (Yoshida *et al.*, 1998; Lonergan *et al.*, 2000, 2003) e embriões de ratos e bovinos (Winger *et al.*, 1997; Sawai *et al.*, 2005; Heyner *et al.*, 1993; Kaye & Harvey 1995; Winger *et al.*, 1997; Luciano *et al.*, 2000). Sabe-se que a redução das proteínas ligantes de IGF (IGFBPs) tem sido associada a aumento da atividade proteolítica da proteína sérica A associada à prenhez (PAPP-A, Monget *et al.*, 2003). A PAPP-A é responsável pela degradação de IGFBPs, levando ao aumento da biodisponibilidade de IGF livre (Monget *et al.*, 2003).

Vários autores demonstraram que o sistema IGF desempenha importante papel na foliculogênese, participando do crescimento, dominância, desvio e maturação folicular (Fortune *et al.*, 2004; Gutiérrez-Adán *et al.*, 2000; Louhio *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2002) e oocitária (Itoh *et al.*, 2002; Walters *et al.*, 2006; Lorenzo *et al.*, 1994; Sirotkin *et al.*, 2000). Os IGFs são sinérgicos ao FSH na promoção de crescimento folicular e produção de estradiol [57]. Apesar do mecanismo preciso para a seleção do folículo dominante ainda não estar completamente elucidado, sabe-se que durante este evento além do possível papel do LH e seus receptores, estão também envolvidos os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs), que parecem desempenhar papel importante neste processo. Os IGFs são sinérgicos ao FSH na promoção de crescimento folicular e produção de estradiol (Fortune *et al.*, 2004). O aumento nas concentrações intrafolicular deste esteróide, bem como os de ativina A e a diminuição dos níveis de IGFBP-2 e 4 estão relacionados à dominância folicular (Ginther *et al.*, 2002; Kojima *et al.*, 2003).

A redução das proteínas ligantes de IGF (IGFBPs) tem sido associada a aumento da atividade proteolítica da PAPP-A (Monget *et al.*, 2003) e a expressão de seu RNAm é mais abundante no folículo dominante em crescimento nos bovinos do que em folículos pequenos não selecionados (Fayad *et al.*, 2004, Fortune *et al.*, 2004). Além disso, a PAPP-A é responsável

pela degradação IGFBP-2, levando ao aumento da biodisponibilidade de IGF (Monget *et al.*, 2003). Embora não se tenha encontrado diferenças nas concentrações de IGF total de folículos dominantes em relação aos subordinados (De La Sota *et al.*, 1996), a concentração de IGF-I livre foi maior no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, mesmo antes da observação de diferenças no diâmetro e na concentração de estradiol (Beg *et al.*, 2002). Essas observações, sugerem a existência de um sistema modulador da disponibilidade de IGF intra-folicular, diferencialmente regulado em folículos dominantes e subordinados, o que permitiria ao maior folículo, ter uma dominância bioquímica antes do estabelecimento da dominância morfológica (Fortune *et al.*, 2004).

Austin *et al.* (2001) propuseram que as primeiras mudanças intrafoliculares que distinguem o folículo destinado a tornar-se dominante dos outros folículos em crescimento seria a capacidade aumentada em produzir estradiol e a manutenção de baixos níveis de IGFbps. Portanto, o sistema IGF parece desempenhar papel crítico no desvio folicular e na aquisição de dominância pelo folículo (Fortune *et al.*, 2004).

A viabilidade e o grau de capacitação atingido por um folículo são, em grande parte, refletidos pela composição bioquímica do fluido presente em sua cavidade antral. Os produtos resultantes do metabolismo das células do COCs, da granulosa mural, e mesmo da teca são difundidos pelo fluido folicular, fornecendo um panorama da atividade esteroideogênica e da biodisponibilidade de fatores de crescimento. Estudos em folículos bovinos demonstraram que existe uma forte relação entre as concentrações de IGF-I livre e de estradiol presentes no fluido folicular e a capacidade desses folículos atingirem a dominância e a capacitação final préovulação (Beg *et al.*, 2002; Ginther *et al.*, 2001; Rivera *et al.*, 2001; Rivera *et al.*, 2001; Austin *et al.*, 2001; Mihm *et al.*, 2000). Além disso, componentes do sistema IGF expressos em oócitos participam acelerando o processo de maturação nuclear e favorecendo a competência oocitária (Itoh *et al.*, 2002; Walters *et al.*, 2006; Lorenzo *et al.*, 1994; Sirotkin *et al.*, 2000; Sakaguchi *et al.*, 2002).

Experimentos *in vitro* demonstraram que a suplementação do meio de MIV com 100 ng de IGF-I/mL acelerou a maturação nuclear (Sakaguchi *et al.*, 2002) e reduziu a apoptose em CCOs bovinos (Kolle *et al.*, 2002).

A exposição de vacas produtoras de leite ao estresse térmico *in vivo* diminui 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 & Scaramuzzi, 2003).

A identificação de RNAm para receptores de IGF-I em embriões bovinos em desenvolvimento, já a partir do estágio de uma célula (Izadyar *et al.*, 2000), e de RNAm de IGF-I em embriões bovinos (Lonergan *et al.*, 2000) sugere que este fator deve influenciar o desenvolvimento embrionário desde o seu início, principalmente pela função de estimular a proliferação celular (Herrler *et al.*, 1998; Lighten *et al.*, 1998), bem como reduzir os efeitos deletérios do estresse térmico (Herrler *et al.*, 1998; Spanos *et al.*, 2000).

Os efeitos benéficos do IGF-I no desenvolvimento embrionário, tanto na presença quanto na ausência de estresse, têm sido demonstrados em várias espécies. A adição de IGF-I ao meio de cultura proporcionou um aumento na taxa de produção de mórulas e blastocistos (Palma *et al.*, 1997; Prella *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002; Herrler *et al.*, 1998; Block *et al.*, 2003; Sirisathien *et al.*, 2003) e no número de células no estágio de blastocisto (Moreira *et al.*, 2002; Byrne *et al.*, 2002; Sirisathien & Brackett, 2003; Sirisathien *et al.*, 2003), bem como reduziu a incidência de apoptose embrionária em humanos (Lighten *et al.*, 1998), em coelhos (Herrler *et al.*, 1998), em ratos (Lin *et al.*, 2003; Fabian *et al.*, 2004) e em bovinos (Lonergan *et al.*, 1996; Moreira, *et al.* 2002; Jousan & Hansen, 2004, Byrne *et al.*, 2002; Makarevich *et al.*, 2002).

A qualidade do embrião é sensivelmente afetada pelos fatores de crescimento à que estão submetidos os oócitos durante a fase de crescimento folicular (Sirard *et al.*, 2006). A suplementação do meio CIV com IGF-I tornou blastocistos mais resistentes à temperatura elevada, aumentando a taxa de prenhez após a transferência de embriões para vacas Holandesas expostas ao estresse térmico *in vivo* (Block *et al.*, 2003).

Além de aumentar a taxa de blastocisto Block & Hansen (2007) demonstraram também um aumento nas taxas de prenhez e nascimento de embriões produzidos *in vitro* tratados com IGF-I e transferidos para vacas holandesas em lactação submetidas a estresse térmico calórico.

Morte Celular Programada - Apoptose

Um dos processos envolvidos na proteção de embriões expostos ao ET é a apoptose. A apoptose nos mamíferos tem um importante papel no controle da qualidade do desenvolvimento embrionário, uma vez que, através desse mecanismo são eliminadas células danificadas, não funcionais e anormais (Paula-Lopes & Hansen, 2002).

Por volta da metade de século 19, muitas observações indicavam que a morte celular tinha um papel importante durante os processos fisiológicos dos organismos multicelulares, particularmente durante a embriogênese e a metamorfose (Lockshin & Zakeri, 2001). O termo morte celular programada foi introduzido em 1964, propondo que a morte celular durante o desenvolvimento não é um acidente da natureza e sim uma sequência de passos programados (Lockshin & Williams, 1965a,b).

Entre os genes reguladores da apoptose, existem duas importantes famílias: o gene supressor tumoral p53 e a família do gene Bcl-2. O gene p53 está envolvido em vários eventos, incluindo a pausa no ciclo celular, estimulação do reparo celular e apoptose. Quando o DNA celular é danificado, o p53 induz uma pausa temporária no ciclo celular, na fase G1, dando à célula tempo suficiente para que ele repare o seu DNA. Se o DNA está muito lesado para ser reparado, o p53 inicia a morte celular através da ativação do complexo de receptores Faz e Bax (membro pro-apoptótico da família de genes Bcl-2) na membrana mitocondrial, levando à ativação da caspase-3. Dessa forma, o p53 previne o desenvolvimento posterior e reprodução de uma célula com genoma danificado. A família de genes Bcl-2 é outro sistema regulador da resposta apoptótica. Os genes Bcl-2 e suas proteínas correspondentes podem inibir o processo apoptótico ou propagá-lo. Fatores anti-morte da família Bcl-2 previnem a liberação do citocromo c da mitocôndria, estabilizando dessa forma o potencial de membrana mitocondrial. No entanto, membros pro-apoptóticos da família Bcl2 propagam a permeabilidade de membrana e o desbalanço iônico, levando à liberação do citocromo c. No citosol, o citocromo c ativa a caspase-9 na presença de uma proteína denominada fator ativador de apoptose. A caspase-9, por sua vez, estimula a caspase-3, que possui um papel central na execução da apoptose (Afford & Randhawa, 2000).

Existem vários fatores que alteram os padrões fisiológicos de apoptose. Dentre eles, a hipertermia tem sido indicada como indutora de teratogênias pela ativação do processo apoptótico em tecidos embrionários importantes (Brill *et al.*, 1999). Em geral, o estresse celular ativa o caminho mitocondrial, alterando a razão entre as proteínas pró-apoptóticas e as anti-apoptóticas (Motyl, 1999).

Dessa forma, a habilidade do embrião inicial sobreviver em elevadas temperaturas pode estar ligada ao aumento da taxa de apoptose (Paula-Lopes & Hansen, 2002), como resposta adaptativa ao dano celular induzido pela temperatura elevada, ou ao desenvolvimento de mecanismos termoprotetores bioquímicos como, por exemplo, as proteínas do choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP), antioxidantes como a glutatona (Malayer & Hansen, 1990; Edwards & Hansen, 1997) e fatores de crescimento como o IGF-I (Jousan & Hansen, 2004).

A resposta termoprotetora do embrião envolve a produção das proteínas conhecidas como HSP (heat shock proteins). A indução da produção de HSP(s) em resposta ao estresse serve para proteger as células contra a agressão, aumentando a recuperação e induzindo um estado de resistência a um subsequente estresse (Neuer *et al.*, 2000). HSP(s) são preferencialmente expressas em resposta a um grupo de injúrias, incluindo a hipertermia, metais pesados, etanol, inflamação e infecção. Sua produção é aumentada durante o cultivo de embriões *in vitro* e estão entre as primeiras proteínas produzidas durante o crescimento de embriões de mamíferos (Neuer *et al.*, 2000). A ação das HSP(s) é atribuída a uma participação ativa na minimização de interações incorretas entre as moléculas, mantendo-as em seu estado natural e reparando ou promovendo a degradação de proteínas alteradas (Neuer *et al.*, 2000). Além disso, as HSP(s) podem modular a apoptose celular, que é um dos mecanismos envolvidos na proteção embrionária durante a exposição ao ET (Al-Katanani & Hansen, 2002; Neuber *et al.*, 2000).

Referências

Bibliográficas

- ADASHI, E.Y., RESNICK, C.E., D'ERCOLE, A.J., SVOBODA, M.E., VAN WYK, J.J. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. **Endocr. Rev.**, v.6, p.400-20, 1985.
- AFFORD, S., RANDHAWA, S. Apoptosis. **Mol. Pathol.**, v.53, p.55-63, 2000.
- ALBRIGHT, J.L., ARAVE, C.W. The behavior of cattle. **Wallingford: Cab International**, p:1-18, 1997.
- ALFUJAIRI, M.M., ALIBRAHIM, R.M., ELNOUTY, F.D. Seasonal variations in superovulatory responses of Holstein cows treated with pregnant mare serum gonadotrophin in Saudi Arabia. **J. Reprod. Fertil.**, v.11, p.75, 1993(abstract).
- AL-KATANANI, Y.M., HANSEN, P.J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Mol. Reprod. Dev.**, v.62, p.174-80, 2002.
- ALLEN, T.E., PAN, Y.S., HAYMAN, R. The effect of feeding on the evaporative heat loss and body temperature in Zebu and Jersey heifers. **J. Agric. Res.**, v. 14, p. 580-93, 1963.
- ALVAREZ, P., SPICER, L.J., CHASE, JR. C.C., PAYTON, M.E., HAMILTON, T.D., STEWART, R.E., HAMMOND, A.C., OLSON, T.A., WETTEMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **J. Anim. Sci.**, v.78, p.1291-302, 2000.
- ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL - ACNB 2006. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br>>. Acessado em 27nov.2006.
- AUSTIN, E.J., MIHM, M., EVANS, A.C.O., KNIGHT, P.G., IRELAND, J.L.H., IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v.64, p.839-48, 2001.
- 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. **J. Dairy. Sci.**, v.68, p.78-85, 1985.
- BADINGA, L., THATCHER, W.W., DIAS, T., DROST, M., WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v39, p.797-810, 1993.
- BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483-1496, 2001.
- BARROS, C.M., MONTEIRO, F.M., MELLO, D.S., CARVALHO, L.M., TEIXEIRA, A.B., TRINCA, L.A., FREITAS, E.C. Resistance of *Bos indicus* to heat shock, compared to crossbred or *Bos Taurus*, at early stages of *in vitro* embryo development. **International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants**, 6th, Scotland, p.A4, 2002.
- BARROS, C.M., PEGORER, M.F., VASCONCELOS, J.L., EBERHARDT, B.G., MONTEIRO, F.M. Importance of sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. **Theriogenology**, v.65, p.210-8, 2006.

- BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K., GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biol. Reprod.**, v.66, p.120-6, 2002.
- BIANCA, W. Reviews of the progress of dairy science. Section A: physiology. Cattle in a hot environment. **J. Dairy. Res.**, v.32, p.291-345, 1965.
- BIGGERS, B.G., GEISERT, R.O., WETTEMAN, R.P., BUCHANAN, O.S. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. **J. Anim. Sci.**, v. 64, p. 1512-1518, 1987.
- BLOCK, J., CHASE, JR. C.C., HANSEN, P.J. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal versus paternal contribution. **Mol. Reprod. Dev.**, v.63, p.32-37, 2002.
- BLOCK, J., DROST, M., MONSON, R.L., RUTLEDGE, J.J., RIVERA, R.M., PAULA-LOPES, F.F., OCON, O.M., KRININGER, III 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. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.1590-602, 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.1518-29, 2007.
- BO, G.A., BARUSELI, P.S., MARTINEZ, M.F. Patern and manipulation of follicular development. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, p. 307-326, 2003.
- BREUEL, K.K., LEWIS, P.E., SCHRICK, F.N., LISHMAN, A.W., INSKEEP, E.K., BUTCHER, R.L. Factors Affecting Fertility in the Postpartum Cow: Role of the Oocyte and Follicle in Conception Rate. **Biol. Reprod.**, v.48, p.655-61, 1993.
- BRIGSTOCK, D.R., KIM, G.Y., STEFFEN, C.L., LIU, A., VEGUNTA, R.K., ISMAIL, N.H. High molecular mass forms of epidermal growth factor in pig uterine secretions. **J. Reprod. Fertil.**, v. 108, p. 313-20, 1996.
- BRILL, A., TORCHINSKY, A., CARP, H., TODER, V. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.16, p.512-9, 1999.
- BUHI, W.C., ALVAREZ, J.M., KOUBA, A.J. Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.52, p.285-300, 1997.
- BYRNE, A.T., SOUTHGATE, J., BRISON, D.R., LEESE, H.J. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. **Mol. Reprod. Dev.**, v.62, p.489-95, 2002.
- CARTWRIGHT, T.C. Responses of beef cattle to high ambient temperatures. **J. Anim. Sci.**, v. 14, p. 350-62, 1955.
- CAVESTANY, D., EL-WISHY, A.B., FOOTE, R.H. Effect of season and high environmental temperature on fertility of holstein cattle. **J. Dairy. Sci.**, v.68, p.1471-8, 1985.
- DE LA SOTA, R.L., SIMMEN, F.A., DIAZ, T., THATCHER, W.W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biol Reprod.**, v.55, p.803-12, 1996.

- DE RENSIS, F., MARCONI, P., CAPELLI, T., GATTI, F., FACCIOLONGO, F., FRANZINI, S. Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrous synchronization and fixed time A.I. after the induction of an LH surge with Gonadotropin releasing hormone (GnRH) or human chorionic gonadotropin (hCG). **Theriogenology**, v.58, p.1675-87, 2002.
- DE RENSIS, F., SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow--a review. **Theriogenology**, v.60, p.1139,51, 2003.
- DÍAZ-CUETO, L., GERTON, G.L. The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. **Arch. Med. Res.**, v.32, p.619-26, 2001.
- DIKMEN, S., MARTINS, L., PONTES, E., HANSEN, P.J. Genotype effects on body temperature in dairy cows under grazing conditions in a hot climate including evidence for heterosis. **Int. J. Biometeorol**, v.53, p.327-31, 2009.
- EALY, A.D., DROST, M., HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **J. Dairy. Sci.**, v.76, p.2899-905, 1993.
- EALY, A.D., HANSEN, P.J. Induced thermotolerance during early development of murine and bovine embryos. **J. Cell. Physiol.**, v. 160, p. 463-8, 1994.
- EALY, A.D., HOWELL, J.L., MONTERROSO, V.H., ARÉCHIGA, C.F., HANSEN, P.J. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. **J. Anim. Sci.**, v.73, p.1401-7, 1995.
- EBERHARDT, B.G., SATRAPA, R.A., CAPINZAIKI, C.R., TRINCA, L.A., BARROS, C.M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Anim. Reprod. Sci.**, v.114, p.54-61, 2009.
- EDWARDS, J.L., HANSEN, P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biol. Reprod.**, v.55, p.341-6, 1996.
- EDWARDS, J.L., EALY, A.D., MONTERROSO, V.H., HANSEN, P.J. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.48, p.25-33, 1997.
- EDWARDS, J.L., HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.138-45, 1997.
- EDWARDS, J.L., KING, W.A, KAWARSKY, S.J., EAL Y, A.D.. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP 70 and glutathione. **Theriogenology**, v. 55, p. 209-23, 2001.
- FABIAN, D., IL'KOVÁ, 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.745-55, 2004.
- FAYAD, T., LÉVESQUE, V., SIROIS, J., SILVERSIDES, D.W., LUSSIER, J.G. Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. **Biol. Reprod.**, v.70, p.523-33, 2004.
- FINCH, V.A Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in

- the tropics. **J. Anim. Sci.**, v. 62, p. 531-42, 1986.
- FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.109-126, 2004.
- GABLER, C., LAUER, B., EINSPANIER, A., SCHAMS, D., EINSPANIER, R. Detection of mRNA and immunoreactive proteins for acidic and basic fibroblast growth factor and expression of the fibroblast growth factor receptors in the bovine oviduct. **J. Reprod. Fertil.**, v. 109, p. 213-21, 1997.
- GAUGHAN, J.B., MADER, T.L., HOLT, S.M., JOSEY, M.J., ROWAN, K.J. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **J. Anim. Sci.**, v.77, p.2398-2405, 1999.
- GEISERT, R.D., LEE, C.Y., SIMMEN, F.A., ZAVY, M. T., FLISS, A.E., BAZER, F.W., SIMMEN, R.C. Expression of messenger RNAs encoding insulin- like growth factor 1, II, and insulin- like growth factor binding protein- 2 in bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 975-83, 1991.
- GETTY, R. Anatomia dos animais domésticos. 5.ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, v.1, p.1134, 1986.
- GILAD, E., MEIDAN, R., BERMAN, A., GRABER, Y., WOLFENSON, D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.99, p.315-21, 1993.
- GINTHER, O.J., BEG, M.A., BERGFELT, D.R., DONADEU, F.X., KOT, K. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.*, v.65, p.638-47, 2001.
- GINTHER, 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. **Biol. Reprod.**, v.67, p.14-9, 2002.
- GORDON, I., BOLAND, M.P., MCGOVERN, H., LYNN, G. Effect of season on superovulatory responses and embryo quality in Holstein cattle in Saudi Arabia. **Theriogenology.**, v.27, p.231, 1987(abstract).
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A., OTER, M., MARTÍNEZ-MADRID, B., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J. Differential expression of two genes located on the x chromosome between male and female in vitro produced bovine embryos at the blastocyst stage. **Mol. Reprod. Dev.**, v.55, p.146-151, 2000.
- GUZELOGLU, A., AMBROSE, J.D., KASSA, T., DIAZ, T., THATCHER, M.J., THATCHER, W.W. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v.66, p.15-34, 2001.
- GWAZDAUSKAS, F.C., WILCOX, C.J., THATCHER, W.W. Environmental and management factors affecting conception rate in a subtropical climate. **J. Dairy. Sci.**, v.58, p.88-92, 1975.
- GWAZDAUSKAS, F.C., THATCHER, W.W., KIDDY, C.A., PAAPE, M.J., WILCOX, C.J. Hormonal pattern during heat stress following the salt induced luteal regression in heifers. **Theriogenology.**, v.16, p.271-85, 1981.
- HAMMOND, A.C., OLSON, T.A., CHASE, JR. C.C., BOWERS, E.J., RANDEL, R.D., MURPHY, C.N., VOGT, D.W., TEWOLDE, A. Heat tolerance in two

- tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.295-303, 1996.
- HAMMOND, A.C., CHASE, JR. C.C., BOWERS, E.J., OLSON, T.A., RANDEL, R.D. Heat tolerance in Tuli-, Senepol-, and Brahman-sired F1 Angus heifers in Florida. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.1568-77, 1998.
- HAMMOND, A.C., CHASE, JR. C.C., BOWERS, E.J., OLSON, T.A., RANDEL, R.D., HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v.83-84, p.349-360, 2004.
- HANSEN, P.J. Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the mammalian preimplantation embryo from heat shock. **Ann. Rev. Biomed. Sci.**, v.1, p.5-29, 1999.
- HANSEN, P.J., DROST, M., RIVERA, R.M., PAULA-LOPES, F.F., AL-KATANANI, 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.
- HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.349-60, 2004.
- HARDY, K., SPANOS, S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. **J. Endocrinol.**, v.172, p.221-36, 2002.
- HER, E., WOLFENSON, D., FLAMENBAUN, I., FOLMAN, Y., KAIM, M., BERMAN, A. Thermal productive, and reproductive responses of high yielding cows exposed to short-term cooling in Summer. **J. Dairy. Sci.**, v.71, p.1085-92, 1988.
- HERNÁNDEZ-CERÓN, J., CHASE, JR. C.C., HANSEN, P.J. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. **J. Dairy. Sci.**, v.87, p.53-8, 2004.
- HERRLER, A., KRUSCHE, C.A., BEIER, H.M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biol. Reprod.**, v.59, p.1302-10, 1998.
- HEYNER, S., SHI, C., GARSIDE, W.T., SMITH, R.M. Functions of the IGFs in early mammalian development. **Mol. Reprod. Dev.**, v.35, p.421-6, 1993.
- HILLERY, F.L., PARRISH, J.J., FIRST NL. . Bull specific effect on fertilization and embryo development *in vitro*. **Theriogenology**, v.33, p.249, 1990[abstract].
- INGRAHAM, R.H., STANLEY, R.W., WAGNER, W. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein caws in Hawaii. **J. Dairy. Sci.**, v.59, p.2086-90, 1976.
- ITOH, T., KACCHI, M., ABE, H., SENDAI, Y., HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1099-105, 2002.
- IZADYAR, F., VAN TOL, H.T., HAGE, W.G., BEVERS, M.M. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. **Mol. Reprod. Dev.**, v.57, p.247-55, 2000.
- JOHNSON, H.D. Environmental temperature and lactation (with special reference to

- cattle). **Int. J. Biometeorol.**, v. 9, p. 103-16, 1965.
- JOHNSTON, J.E., NAELAPAA, H., FRYE, J.B. Physiological responses of Holstein, Brown Swiss and Red Sindhi crossbreed bulls exposed to high temperatures and humidities. **J. Anim. Sci.**, v. 22, p. 432-6, 1963.
- JONES, J.I., CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr. Rev.**, v.16, p.3-34, 1995.
- JOUSAN, F.D., HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biol. Reprod.**, v.71, p.1665-1650, 2004.
- 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. **Mol Reprod. Dev.**, v. 74(2), p. 189-196, 2006.
- KAMADA, S., KUBOTA, T., TAGUCHI, M., HO, W.R., SAKAMOTO, S. ASO, T. Effect of insulin-like growth factor-II on proliferation and differentiation of ovarian granulosa cells. **Horm. Res.**, v. 37, p. 141-9, 1992.
- KAMWANJA, L.A., CHASE, JR. C.C., GUTIERREZ, J.A., GUERRIERO, JR. V., OLSON, T.A., HAMMOND, A.C., HANSEN, P.J. Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.438-44, 1994.
- KANE, M.T., MORGAN, P.M., COONAN, C. Peptide growth factors and preimplantation development. **Hum. Reprod. Update.**, v.3, p.137-57, 1997.
- KAYE, P.L., HARVEY, M.B. The role of growth factors in preimplantation development. **Prog. Growth Factor Res.**, v.6, p.1-24, 1995.
- KOJIMA, F.N., BERGFELD, E.G., WEHRMAN, M.E., CUPP, A.S., FIKE, K.E., MARISCAL-AGUAYO, D.V., SANCHEZ-TORRES, T., GARCIA-WINDER, M., CLOPTON, D.T., ROBERTS, A.J., KINDER, J.E. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. **Anim. Reprod. Sci.**, v.77, p.187-211, 2003.
- KÖLLE, S., STOJKOVIC, M., BOIE, G., WOLF, E., SINOWATZ, F. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.61, p.18-6, 2002.
- KORNMATITSUK, B., CHANTARAPRATEEP, P., KORNMATITSUK, S., KINDAHL, H. Different Types of postpartum luteal activity affected by the exposure of heat stress and subsequent reproductive performance in holstein lactating cows. **Reprod. Dom. Anim.**, v.43, p.515-9, 2008.
- KRININGER, III C.E., BLOCK, J., AL-KATANANI, Y.M., RIVERA, R.M., CHASE, JR. C.C., HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.13-24, 2003.
- LACANDRA, G.M., DELL'AGUILA, M.E., FUSCO, S., SCIORCI, R.L., PERRONE, P., MINOIA, P. *In vitro* fertility test of bull semen. In: The 13th **International Congress on Animal Reproduction**, Sydney, p.656-8, 1993.

- LANE, M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. **Theriogenology**, v.55, p.225-36, 2001.
- LAWRENCE, J.L., PAYTON, R.R., GODKIN, J.D., SAXTON, A.M., SCHRICK, F.N., EDWARDS, J.L. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. **J. Dairy. Sci.**, v.87, p.2449-54, 2004.
- LAZZARI, G., GALLI, C. Bull effect on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured into ligated oviduct of the sheep. In: **The 9th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association**, Lyon; p.224, 1993[abstract].
- LENZ, R.W., BALL, G.D., LEIBFRIED, R.L.A.X., FIRST, N.L. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. **Biol. Reprod.**, v.29, p.173-9, 1983.
- LIGHTEN, A.D., MOORE, G.E., WINSTON, R.M.L., HARDY, K. Routine addition of human insulin-like growth factor-1 ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. **Human Reprod.**, v. 13, p. 3144–50, 1998.
- LIN, T.C., YEN, J.M., GONG, K.B., HSU, T.T., CHEN, L.R. IGF-1/IGFBP-1 increases blastocyst formation and total blastocyst cell number in mouse embryo culture and facilitates the establishment of a stem-cell line. **BMC Cell. Biol.**, v.4, p.14, 2003.
- LOCKSHIN, R.A., WILLIAM, C.M. Programmed cell death. 3. Neural control of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmooths. **J. Insect. Physiol.**, v.11, p.601-10, 1965a.
- LOCKSHIN, R.A., WILLIAMS, C.M. Programmed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkmooth. **J. Insect. Physiol.**, v.11, p.123-33, 1965b.
- LOCKSHIN, R.A., ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v.2, p.545-50, 2001.
- LONERGAN, P., CAROLAN, C., VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., KHATIR, H., MERMILLO, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.54, p.1420-9, 1996.
- LONERGAN, P., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., PINTADO, B., FAIR, T., WARD, F., FUENTE, J.D., BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.57, p.146-52, 2000.
- LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., MOREIRA, P.M., PINTADO, B., de la FUENTE, J., BOLAND, M.P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Biol. Reprod.**, v.69, p.1424-31, 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.

- LOUHIO, H., HOVATTA, O., SJOBERG, J., TUURI, T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. **Molecular Human Reproduction**, v.6, p.694-8, 2000.
- LUCIANO, A.M., MODINA, S., GANDOLFI, F., LAURIA, A., ARMSTRONG, D.T. Effect of cell-to-cell contact on *in vitro* deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. **Biol. Reprod.**, v.63, p.1280-5, 2000.
- 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. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 386–92, 2002.
- MALAYER, J.R., HANSEN, P.J., BUHI, W.C. Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. **J. Exp. Zool.**, v.248, p.345-53, 1988.
- MALAYER, J.R., HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in heat shock-induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.266-80, 1990.
- MATSUI, M., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., KANAGAWA, H. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 57, p. 1109-11, 1995.
- MCDOWELL, RE., LEE, D.H.K., FOHRMAN, M.H. The relationship of surface area to heat tolerance in Jerseys and Sindhi-Jersey (F1) crossbred cows. **J. Anim. Sci.**, v. 12, p. 747-56, 1953.
- MIHM, M., AUSTIN, E.J., GOOD, T.E.M., IRELAND, J.L.H., KNIGHT, P.G., ROCHE, J.F., IRELAND, J.J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biol. Reprod.**, v.63, p.811-19, 2000.
- 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. **Biol. Reprod.**, v.68, p.77-86, 2003.
- MONTEIRO F, FERREIRA M, POTIENS J, EBERHARDT B, TRINCA L, BARROS C. Influence of Superovulatory Protocols on *In vitro* Production of Nellore (*Bos indicus*) Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.860-4, 2009.
- MOREIRA, F., PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J., BADINGA, L., THATCHER, W.W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, p.895-907, 2002.
- MOTYL, T. Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2-related proteins. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.39, p.49-59, 1999.
- NABHAN, T., SATRAPA, R.A., SIMOES, R.A.L., SILVA, C.F., RAZZA, E.M., PUELKER, R.Z., TRINCA, L., BARROS, C.M. Influence of the breed of bull (*Bos indicus*, *Bos taurus*) in tolerance to heat shock in bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.302, 2010.

- NEUBER, E., LUETJENS, C.M., CHAN, A.W.S., SCHATTEN, G.P. Analysis for DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v. 57, p. 2193-2202, 2002.
- NEUER, A., SPANDORFER, S.D., GIRALDO, P., DIETERLE, S., ROSENWAKS, Z., WITKIN, S.S. The role of heat shock proteins in reproduction. **Hum. Reprod. Update.**, v.6, p.149-59, 2000.
- 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. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.27, p.179-95, 2004.
- O'BANNON, E.B., CORNELISON, P.R., RAGSDALE, A.C., BRODY, S. Relative growth rates at 80 and 50 °F of Santa Gertrudis, Brahman and Shorthorn heifers. **J. Anim. Sci.**, v. 14, p. 1187 (abstract), 1955.
- PALMA, G.A., MÜLLER, M., BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v.110, p.347-53, 1997.
- PALMA, G.A., SINOWATZ, F. Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. **Anat. Histol. Embryol.**, v.33, p.257-62, 2004.
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., CRITSER, E.S., EYESTONE, W.H., FIRST, N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.25, p.591-600, 1986.
- PAULA-LOPES, F.F., CHASE, JR. C.C., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER, I.C.E., RIVERA, R.M., TEKIN, S., MAJEWSKI, I.A.C., OCON, O.M., OLSON, T.A., HANSEN, P.J. Breed differences in resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock. **Theriogenology**, v.55, p.436 2001. [Abstract]
- PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biol. Reprod.**, v.66, p.1169-77, 2002.
- PAULA-LOPES, F.F., CHASE, JR. C.C., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER, C.E., RIVERA, R.M., TEKIN, S., MAJEWSKI, A.C., OCON, O.M., OLSON, T.A., HANSEN, P.J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction.**, v.125, p.285-94, 2003.
- PEGORER, M.F., VASCONCELOS, J.L., TRINCA, L.A., HANSEN, P.J., BARROS, C.M. Influence of sire and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactating Holstein cows during summer heat stress. **Theriogenology**, v.67, p.692-7, 2007.
- PIRES, M.F.A., SARTUNINO, H.M., CAMPOS, A.T., TEODORO, R.L. Taxa de gestação em fêmeas da raça holandesa confinadas em *Free Stall*, no verão e inverno. **Reunião anual SBZ**, 38, 2001, Piracicaba. Anais. Piracicaba 2001.

- PRAYAGA, K.C. Evaluation of beef cattle genotypes and estimation of direct and maternal genetic effects in a tropical environment. 2. Adaptive and temperament traits. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.54, p.1027-38, 2003.
- PRELLE, K., STOJKOVIC, M., BOXHAMMER, K., MOTLIK, J., EWALD, D., ARNOLD, G.J., WOLF, E. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and long R(3)IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors *in vitro* produced bovine embryos. **Endocrinology**, v.142, p.1309-16, 2001.
- PUTNEY, D.J., MALAYER, J.R., GROSS, T.S., THATCHER, W.W., HANSEN, P.J., DROST, M. Heat Stress-Induced Alterations in the Synthesis and Secretion of Proteins and Prostaglandins by Cultured Bovine Conceptuses and Uterine Endometrium. **Biol. Reprod.**, v.39, p.717-28, 1988.
- PUTNEY, D.J., DROST, M., THATCHER, W.W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenology**, v.31, p.765-78, 1989.
- RIVERA, R.M., HANSEN, P.J. Development of cultured bovine embryos after exposure to increased temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v.121, p.107-15, 2001.
- RIVERA, G.M., CHANDRASEKHER, Y.A., EVANS, A.C.O., GIUDICE, L.C., FORTUNE, J.E. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biol. Reprod.**, v.65, p.102-111, 2001.
- RIVERA, G.M., FORTUNE, J.E. Development of co-dominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone –dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biol. Reprod.**, v.65, p.112-118, 2001.
- ROCHA, A., RANDEL, R.D., BROUSSARD, J.R., LIM, J.M., BLAIR, R.M., ROUSSEL, J.D., GODKE, R.A., HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.49, p.657-65, 1998.
- ROMAN-PONCE, H., THATCHER, W.W., CATON, D., BARRON, D.H., WILCOX, C.J. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **J. Anim. Sci.**, v.46, p.175-80, 1978.
- ROTH, Z., ARAV, A., BOR, A., ZERON, Y., OCHERETNY, A., WOLFENSON, D. Enhanced removal of impaired follicles improves the quality of oocytes collected in the autumn from summer heat-stressed cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.23, p.32, 1999(abstract).
- 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. **J. Reprod. Fertil.**, v.120, p.83-90, 2000.
- ROTH, Z., MEIDAN, R., SHAHAM-ALBALANCY, A., BRAW-TAL, R., WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **J. Reprod. Fertil.**, v.121, p.745-51, 2001.

- ROTH, Z., HANSEN, P.J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biol. Reprod.**, v.71, p.1898-906, 2004.
- 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.235-44, 2005.
- RYAN, D.P., BOLAND, M.P. Frequency of twin births among Holstein Friesian cows in a warm dry climate. **Theriogenology.**, v.36, p.1-10, 1991.
- SAITO, D.Y. Estudo da influência da raça do touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*) na resistência de embriões bovinos ao estresse térmico calórico *in vitro*, no estágio inicial de desenvolvimento. **Instituto de Biociências**. Botucatu: UNESP, p.42, 2006.
- 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.135-42, 2002.
- SANTIAGO, A.A. O Zebu na Índia, Brasil e no mundo. **Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola**, p.706, 1985.
- SARTORELLI, E.S., SATRAPA, R.A., BARCELOS, A.C.Z., POTIENS, J.R., BARROS, C.M. Influência do estresse térmico na taxa de apoptose de embriões bovinos (*indicus* vs. *taurus*) produzidos *in vitro* e na capacidade dos mesmos originarem gestações. **Acta Sci. Vet.**, v. 34, p. 476, 2006.
- SARTORI, R., SARTOR-BERGFELT, R., MERTENS, A.S., GUENTHER, J.N., PARRISH, J.J., WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J. Dairy. Sci.**, v.85, p.2803-12, 2002.
- SAWAI, K., KAGEYAMA, S., MORIYASU, S., HIRAYAMA, H., MINAMIHASHI, A., ONOE, S. Analysis of mRNA transcripts for insulin-like growth factor receptors and binding proteins in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. **Cloning Stem Cells**, v.7, p.189-98, 2005.
- SCHMIDT, A., EINSPANIER, R., AMSELGRUBER, W., SI NOWATZ, F., SCHAMS, D. Expression of insulin-like growth factor- I (IGF-I) in the bovine oviduct during the oestrous cycle. **Exp. Clin. Endoc.**, v. 102, p. 364-369, 1994.
- SCHULLER, A.G., VAN NECK, J.W., LINDENBERGH-KORTLEVE, D.J., GROFFEN, C., DE JONG, I., ZWARTHOFF, E.C., DROP, S.L. Gene expression of the IGF binding proteins during post-implantation embryogenesis of the mouse; comparison with the expression of IGF-I and -II and their receptors in rodent and human. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 343, p. 267-277, 1993.
- SCHULTZ, G.A., HOGAN, A., WATSON, A.J., SMITH, R.M. HEYNER, S. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transport: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. **Reprod. Fertil. Develop.**, v. 4, p. 361-371, 1992.
- SEIF, S.M., JOHNSON, H.D., LIPPINCOTT, A.C. The effects of heat exposure (31 °C) on Zebu and Scottish Highland cattle. **Int. J. Biometeorol.**, v. 23, p. 914, 1979.

- SHI, D.S., LU, K.H., GORDON, I. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. **Theriogenology**, v.33, p.324, 1990[abstract].
- SIMPSON, R.B., CHASE JR, C.C., SPICER, L.J., VERNON, R.K., HAMMOND, A.C., RAE, D.O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **J. Reprod. Fertil.**, v. 102, p. 483-492, 1994.
- SIRARD, M.A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-36, 2006.
- SIRISATHIEN, S., HERNANDEZ-FONSECA, H.J., BRACKETT, B.G. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. **Anim. Reprod. Sci.**, v.77, p.21-32, 2003.
- SIRISATHIEN, S., BRACKETT, B.G. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. **Mol. Reprod. Dev.**, v.62, p.51-56, 2003.
- SIROTKIN, A.V., DUKESOVA, J., MAKAREVICH, A.V., KUBEK, A., BULLA, J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. **Reproduction, Nutrition, Development.**, v.40, p.559-69, 2000.
- SKINNER, J.O., LOUW, G.N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **J. Appl. Physiol.**, v. 21, p. 1784-90, 1966.
- SPANOS, S., BECKER, D.L., WINSTON, R.M., HARDY, K. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. **Biol. Reprod.**, v.63, p.1413-20, 2000.
- SPICER, L.J., ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Dom. Anim. Endoc.**, v. 12, p. 223-245, 1995.
- SUGIYAMA, S., MCGOWAN, M., PHILLIPS, N., KAFI, M., YOUNG, M. Effects of increased ambient temperature during IVM and/or IVF on the *in vitro* development of bovine zygotes. **Reprod. Domest. Anim.**, v.42, p.271-4, 2007.
- THATCHER, W.W., COLLIER, R.J. Effects of climate on bovine reproduction. In: Morrow, D.A (Ed) Current therapy in **Theriogenology**, Philadelphia W.B Saunders CO v.2, p.301-9, 1986.
- THATCHER, W.W., HANSEN, P.J. Environment and reproduction. **Reprod. Domestic. Anim.** Amsterdam: Elsevier World Animals Science Series, v. 9, p. 433-57, 1993.
- TORRES-JÚNIOR, J.R., 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., de 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, p.155-66, 2008.
- WALTERS, K.A., BINNIE, J.P., CAMPBELL, B.K., ARMSTRONG, D.G., TELFER, E.E. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. **Reproduction.**, v.131, p.515-23, 2006.

- WATSON, A.J., HOGAN, A., HAHNEL, A., WIEMER, E., SCHULTZ, G.A. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. **Mol. Reprod. Develop.**, v. 31, p. 87–95, 1992.
- WATSON, A.J., WATSON, P.H., ARCELLANA-PANLILIO, M., WARNES, D., WALKER, S.K., SCHULTZ, G.A., ARMSTRONG, D.T., SEAMARK, R.F. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 725–733, 1994.
- WEST, J.W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **J. Dairy. Sci.**, v.86, p.2131-44, 2003.
- WILSON, S.J., KIRBY, C.J., KOENIGSFELD, A.T., KEISLER, D.H., LUCY, M.C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. **J. Dairy. Sci.**, v.81, p.2132-8, 1998a.
- 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. **J. Dairy. Sci.**, v.81, p.2124-31, 1998b.
- WINGER, Q.A., de los RIOS, P., HAN, V.K., ARMSTRONG, D.T., HILL, D.J., WATSON, A.J. Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of “embryotrophic” insulin-like growth factor circuits. **Biol. Reprod.**, v.56, p.1415-23, 1997.
- WOLFENSON, D., LUFT, O., BERMAN, A., MEIDAN, R. Effects of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin F₂ production in bovine luteal cells. **Anim. Reprod. Sci.**, v.32, p.27-40, 1993.
- WOLFENSON, D., Roth, Z., Meidan, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.535-547, 2000.
- YASEEN, M.A., WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., CARNWATH, J.W., NIEMANN, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different *in vitro* systems. **Reproduction**, v.122, p.601-10, 2001.
- 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*. **J. Vet. Med. Sci.**, v.60, p.549-54, 1998.
- ZERON, Y., OCHERETNY, A., KEDAR, O., BOROCHOV, A., SKLAN, D., ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **J. Reprod. Fertil.**, v.121, p.447-54, 2001.
- ZHAO, J., TAVERNE, M.A., VAN DER WEIJDEN, G.C., BEVERS, M.M., VAN DEN, H.R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.287-96, 2001.

CAPÍTULO 2

O IGF-I aumenta a produção *in vitro* e protege os embriões dos efeitos deletérios do estresse térmico nas raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*)

Este artigo científico está de acordo com as normas para publicação na Theriogenology, exceto a apresentação das figuras, tabelas e o idioma

1 **O IGF-I aumenta a produção *in vitro* e protege os embriões dos efeitos**
2 **deletérios do estresse térmico nas raças Nelore (*Bos indicus*) e**
3 **Holandesa (*Bos taurus*)**

4
5
6
7 **Running title:**

8 O IGF-I na produção *in vitro* de embriões

9
10
11
12 Satrapa, R.A.¹; Razza, E.M.¹; Silva, C.F.¹; Simões, R.A.L.¹; Nabhan, T.¹;
13 Ticianelli, J.S.¹; Mazucheli, J.²; Barros, C.M.^{1a}

14
15
16
17
18
19
20
21
22 ¹Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu,
23 Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo; ²Departamento de
24 Estatística, Universidade Estadual de Maringá - PR, Brasil

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36 ^aAutor para correspondência: Ciro Moraes Barros; fax: +55 14 38116253; cmb Barros@ibb.unesp.br

37 **Resumo**

38

39 A fim de melhor compreender as diferenças entre zebuínos e taurinos em relação
40 à resistência ao estresse térmico (ET), objetivou-se com o presente trabalho: (1)
41 verificar se a adição de IGF-I ao meio de cultivo, na ausência de Soro Fetal Bovino
42 (SFB), seria capaz de manter as taxas de produção embrionária semelhantes às que
43 obtidas em meio de cultivo com SFB; (2) verificar se a adição de IGF-I ao meio de
44 cultivo é mais eficiente em diminuir os efeitos deletérios do ET em embriões da raça
45 Holandesa preto e branco (HPB) quando comparados aos da raça Nelore; (3) verificar se
46 o efeito deletério do ET no desenvolvimento embrionário e na taxa de apoptose é mais
47 acentuado em embriões da raça HPB, quando comparado aos da raça Nelore. No
48 experimento 1, oócitos de vacas aneladas oriundas de matadouro foram maturados,
49 fertilizados com sêmen de touros da raça Nelore e, 10 horas pós inseminação (hpi), os
50 embriões foram distribuídos ao acaso em quatro grupos, de acordo com a composição
51 do meio de cultivo: SFB (5% de SFB + 0 ng/mL de IGF-I; n=165); IGF (0% de SFB +
52 100 ng/mL de IGF-I; n=163); SFB+IGF (5% de SFB + 100 ng/mL de IGF; n=169) e
53 controle (0% de SFB + 0 ng/mL de IGF-I; n=168). Foram avaliadas as taxas de
54 clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido. Nos experimentos 2 e 3, oócitos de
55 vacas Nelore e HPB oriundas de matadouro foram maturados em meio TCM 199,
56 fertilizados com sêmen de touros das raças Nelore (n=6) e HPB (n=6), respectivamente,
57 e cultivados em meio SOF (synthetic oviduct fluid, na ausência de SFB) até o estágio de
58 blastocisto. Dadas 10 hpi, os embriões foram distribuídos ao acaso em quatro grupos:
59 controle (cultivados na ausência de IGF a 39 °C); ET (cultivados na ausência de IGF e
60 expostos a 41 °C, 96 hpi, por 9 horas, retornando a seguir para 39 °C); IGF (cultivados
61 na presença de IGF a 39 °C) e ET/IGF (IGF e ET). No experimento 2 foram avaliadas as
62 taxas de clivagem, mórula e blastocistos e no experimento 3 avaliou-se a taxa de
63 apoptose celular dos embriões. Os dados foram analisados pelo Proc GENMOD do SAS
64 (SAS, 1999), utilizando-se os testes de regressão logística e de regressão Binomial-
65 Negativa. No experimento 1, a taxa de blastocisto foi semelhante ($p>0,05$) entre os
66 grupos SFB ($40,6\pm 3,4$) e IGF ($36,2\pm 5,6$). No experimento 2, o ET diminuiu as taxas de
67 blastocisto, independente do tratamento com IGF, na raça Nelore ($29,6\%$ vs $24,1\%$) e
68 principalmente na raça HPB ($20,1\%$ vs $15,5\%$). A adição de IGF-I no meio de cultivo,
69 independente do ET, promoveu aumento ($p<0,05$) nas taxas de produção de blastocisto
70 tanto na raça Nelore ($23,3\%$ vs $29,9\%$) quanto na raça HPB ($15,7\%$ vs $21,4\%$). No
71 experimento 3, o ET, independente do tratamento com IGF, aumentou
72 significativamente a taxa de apoptose na raça Nelore ($3,3\pm 0,2$ vs $4,1\pm 0,3$) e
73 principalmente na raça HPB ($4,8\pm 0,3$ vs $6,0\pm 0,4$). Conclui-se que: a) a adição de IGF-I
74 ao meio de cultivo pode ser utilizada em substituição ao SFB; b) a adição de IGF-I no
75 meio de cultivo de embriões de ambas as raças melhorou a produção embrionária e
76 diminuiu a incidência de apoptose; c) a raça HPB foi mais sensível aos efeitos deletérios
77 do ET do que a raça Nelore, ou seja, apresentou diminuição mais acentuada na produção
78 de blastocisto, bem como maior incidência de apoptose.

79

80 Palavras-chave: IGF, bovino, embrião, estresse térmico, apoptose, FIV

81 **Introdução**

82

83 Acima de 50% do rebanho bovino mundial se encontra nos trópicos e é
84 submetido a temperaturas mais altas do que animais que habitam climas
85 temperados. A raça Nelore é a raça zebuína (*Bos indicus*) predominante no
86 Brasil (90 milhões de cabeças; [1]) e está se tornando mais popular em outros
87 países tropicais e subtropicais da América do Sul e no mundo [2, 3] devido,
88 entre outros fatores, pela sua maior resistência a altas temperaturas, umidade
89 e parasitas, quando comparada às raças derivadas do gado europeu (*Bos*
90 *taurus*, [4, 5]).

91 Os processos reprodutivos em mamíferos, machos e fêmeas, são muito
92 sensíveis às alterações, principalmente pelo aumento da temperatura
93 ambiente, levando a uma redução quantitativa e qualitativa da produção de
94 esperma nos machos e queda da fertilidade nas fêmeas [6].

95 Existem diferenças genéticas na resistência ao estresse térmico (ET), com
96 as raças adaptadas apresentando menores temperaturas corporais do que
97 raças não adaptadas [6-9]. Devido ao gado zebuino ser termotolerante, as
98 consequências da exposição ao ET na queda de produção de leite e carne são
99 menores para o gado *Bos indicus* do que para o *Bos taurus* [4].

100 A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é
101 limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do
102 genoma embrionário está ainda inativa. Esse período de baixa atividade
103 transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente
104 sensíveis a certas formas de estresse como, por exemplo, o ET calórico, pelo
105 aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre [10].
106 Utilizando um sistema de cultivo *in vitro*, Rocha et al. [11] e Al-Katanani &
107 Hansen [12], mostraram que a temperatura elevada reduziu a sobrevivência
108 dos embriões em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário.

109 Paula-Lopes et al. [13] observaram que embriões (≥ 9 células) de raça
110 resistente ao calor (Brahman), se desenvolveram melhor até o estágio de
111 blastocisto após ET (41 °C por 6 horas) do que embriões de raças sensíveis ao
112 calor (Holandesa e Angus). De forma similar, embriões da raça Nelore
113 (zebuino) são mais resistentes ao ET do que embriões mestiços (oócito taurino
114 x sêmen zebuino; [14]) ou taurinos (HPB, [5]) desenvolvidos *in vitro*.

115 Um dos aspectos envolvidos no fenômeno da termotolerância do embrião
116 envolve a produção das proteínas conhecidas como HSP (heat shock proteins).
117 A indução da produção de HSP(s) em resposta ao estresse serve para proteger
118 as células contra a agressão, aumentando a recuperação e induzindo um
119 estado de resistência a um subseqüente estresse [15]. HSP(s) são
120 preferencialmente expressas em resposta a um grupo de injúrias, incluindo a
121 hipertermia [16, 17], estresse oxidativo [18, 19], metais pesados, etanol,
122 inflamação e infecção. Sua produção é aumentada durante o cultivo *in vitro* de
123 embriões e estão entre as primeiras proteínas produzidas durante o
124 crescimento de embriões de mamíferos [15]. A ação das HSP(s) é atribuída a
125 uma ativa participação na minimização de interações incorretas entre as
126 moléculas, mantendo-as em seu estado natural e reparando ou promovendo a
127 degradação de proteínas alteradas [15]. Além disso, as HSP(s) podem modular
128 a apoptose celular, que é um dos mecanismos envolvidos na proteção
129 embrionária durante a exposição ao ET [12, 20].

130 A apoptose nos mamíferos tem um papel importante no controle da
131 qualidade do desenvolvimento embrionário, uma vez que através desse
132 mecanismo são eliminadas células danificadas, não funcionais e anormais. Por
133 outro lado, a capacidade do embrião inicial sobreviver em temperaturas
134 elevadas pode estar ligada à diminuição da taxa de apoptose [10], com
135 conseqüente aumento no número de células nos embriões, ou ao
136 desenvolvimento de mecanismos termoprotetores bioquímicos como, por
137 exemplo, as proteínas HSP, antioxidantes como a glutathiona [21, 22] e fatores
138 de crescimento como o IGF-I [16, 17].

139 Sartorelli *et al.* [23] observaram que o estresse térmico aumentou a taxa
140 de apoptose em embriões tanto da raça Nelore quanto da raça Angus. Além
141 disso, a porcentagem de células apoptóticas observada 120 hpi foi mais
142 elevada nos embriões da raça Angus quando comparados aos da raça Nelore.

143 Os efeitos benéficos do IGF-I no desenvolvimento embrionário, tanto na
144 presença quanto na ausência de estresse, têm sido demonstrados em várias
145 espécies. A adição de IGF-I ao meio de cultura proporcionou um aumento no
146 número de mórulas e blastocistos, bem como reduziu a incidência de apoptose
147 embrionária em várias espécies [24-26], inclusive em bovinos [16, 27-33].

148 Além de aumentar a taxa de blastocisto, alguns trabalhos [34-37]
149 demonstraram também um aumento nas taxas de prenhez e nascimento de
150 embriões produzidos *in vitro* tratados com IGF-I e transferidos para vacas
151 holandesas em lactação submetidas a estresse térmico.

152 Considerando-se a predominância do gado Nelore no Brasil devido, entre
153 outros fatores, a elevada resistência ao ET, objetivou-se com o presente
154 trabalho testar as seguintes hipóteses: a) a adição de IGF-I ao meio de cultivo,
155 na ausência de SFB, é capaz de manter as taxas de produção embrionária
156 semelhantes às aquelas obtidas em meio de cultivo com SFB; b) a adição de IGF-I
157 ao meio de cultivo é mais eficiente em diminuir ou efeitos deletérios do ET em
158 embriões da raça HPB quando comparados a embriões da raça Nelore; c) o
159 efeito deletério do ET no desenvolvimento embrionário e na taxa de apoptose é
160 mais acentuado em embriões da raça HPB, quando comparados a embriões da
161 raça Nelore.

162

163 **Material e Método**

164

165 ***Produção in vitro de embriões***

166

167 Todos os reagentes e meios foram adquiridos dos Laboratórios Sigma-
168 Aldrich (St. Louis, MO, USA), Gibco (Langley, OK, USA; soro fetal bovino),
169 Vivimed (Ribeirão Preto, SP, Brasil; Choriomon[®]) e Hertape Calier (Juatuba,
170 MG, Brasil; Pluset[®]).

171

172 ***Recuperação e classificação dos oócitos***

173

174 O processo de produção *in vitro* de embriões baseou-se na técnica
175 descrita por Eberhardt et al. [37]. Os ovários coletados nos frigoríficos foram
176 transportados em recipientes térmicos contendo solução salina (NaCl 0,9%)
177 mantida em uma temperatura entre 30 e 37 °C.

178 As aspirações foliculares foram realizadas em dias aleatórios do ciclo
179 estral, utilizando-se uma seringa de 10 mL e agulha 19 G. Os folículos de
180 tamanho entre 3-8 mm foram puncionados e os complexos *cumulus*-oócitos
181 (COCs) imaturos depositados em tubos cônicos (Corning[®]) estéreis imersos em

182 Banho Maria à 37 °C. Após a sedimentação, os oócitos foram classificados em
183 quatro categorias, de acordo com suas características celulares [38]: I) oócitos
184 com citoplasma homogêneo, circundados por três ou mais camadas compactas
185 de células do *cumulus*; II) oócitos com menos de três camadas de células do
186 *cumulus* ou parcialmente desnudos, porém com granulação homogênea no
187 citoplasma; III) oócitos circundados apenas por células da corona radiata; IV)
188 oócitos desnudos.

189

190 *Maturação in vitro*

191

192 Os COCs classificados nas categorias I, II e III foram lavados três vezes
193 em meio TCM 199 com HEPES contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 2
194 µg/mL de piruvato e 75 µg/mL de gentamicina. Posteriormente, os oócitos
195 foram lavados duas a três vezes no meio de maturação e distribuídos em 4
196 gotas contendo 90 µL de meio de maturação, com uma média de 25 oócitos
197 por gota, cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri (Corning®)
198 de 35 x 10 mm. O meio de maturação utilizado foi o TCM 199 com bicarbonato
199 contendo 10% de SFB, 2 µg/mL de piruvato, 75 µg/mL de gentamicina, 20
200 µg/mL de FSH (Pluset®) e 10 UI/mL de LH (Choriomon®). Os meios,
201 preparados com 2 horas de antecedência, foram mantidos a 39 °C em
202 incubadora. A maturação do COCs foi realizada em incubadora a 39 °C (5 %
203 de CO₂ em ar), durante 22 - 24 horas.

204

205 *Preparo do sêmen e fertilização in vitro*

206

207 O descongelamento do sêmen foi realizado em água a 37 °C por 30
208 segundos. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a superfície do gradiente
209 de Percoll com densidade descontínua (2 mL a 45% sobre 2 mL a 90%) em
210 tubo cônico de 15 mL e centrifugado a 900 x g por 30 minutos.

211 Durante a centrifugação do sêmen, os oócitos já maturados foram
212 lavados três vezes no meio TCM 199 com HEPES e uma vez no meio de
213 fertilização, antes de serem transferidos para gotas do mesmo meio de
214 fertilização cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri de 35 mm
215 x 10 mm.

216 Após a centrifugação, os espermatozóides viáveis obtidos do sedimento
217 foram submetidos à avaliação de motilidade (lâmina e lamínula) e concentração
218 (câmara de Neubauer) e diluídos em volume apropriado do meio de fertilização
219 para se obter uma concentração de 1×10^6 espermatozóides/mL.

220 Em seguida, foi realizada a fertilização dos oócitos utilizando 10 μ L de
221 sêmen diluído por gota. O processo de fertilização foi realizado por 10 a 12
222 horas a 39 °C em 5% de CO₂ em ar. O meio de fertilização era composto por
223 TALP-FIV suplementados com 6 mg/mL BSA livre de ácidos graxos, 2 μ L/mL
224 de piruvato, 75 μ g/mL de gentamicina, 11 μ g/mL de heparina e 44 μ L/mL de
225 solução de Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina (PHE).

226

227 *Desnudamento e cultivo in vitro dos embriões*

228

229 De 10 a 12 hpi os prováveis zigotos foram transferidos do meio de
230 fertilização para tubos cônicos com 1mL de meio TCM 199 com HEPES,
231 descrito anteriormente, os quais foram submetidos à agitação no vortex
232 (Phoenix[®], AP-56) a 3000 rpm durante 3 a 5 minutos para remoção das células
233 do *cumulus* circundante e também dos espermatozóides associados. Em
234 seguida, os prováveis zigotos foram lavados duas vezes em meio TCM 199
235 com HEPES e por último, uma vez em meio de cultivo, sendo então
236 transferidos para gotas de cultivo de 90 μ L (20 a 25 oócitos por gota), cobertas
237 com óleo mineral, em placas de Petri de 35 mm. Utilizou-se o meio de cultivo
238 SOF ("synthetic oviduct fluid"; Holm, 1999), acrescido de SFB (25%; somente
239 no experimento 1, não sendo utilizado nos experimentos 2 e 3), BSA (5%) e
240 piruvato de sódio (0,2%).

241 Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas
242 em sacos plásticos contendo uma mistura gasosa de 5 % de O₂, 5 % de CO₂ e
243 90 % de N₂ (White Martins, São Paulo, SP, Brasil). As trocas parciais do meio
244 de cultivo foram realizadas a cada 48 horas, quando foram retirados 50 μ L de
245 meio já presente, juntamente com estruturas degeneradas, e acrescentou-se
246 50 μ L de meio de cultivo fresco em cada gota.

247

248

249

250 **Análise estatística**

251

252 Os dados foram analisados pelo Proc GENMOD do SAS [39]. Foi
253 utilizado o teste de regressão logística e de regressão Binomial-Negativa para
254 as análises de produção *in vitro* e da taxa de apoptose, respectivamente.
255 Foram estudados o efeito da raça, do tratamento, do estresse térmico, número
256 de células, apoptose e suas interações. As diferenças foram consideradas
257 significativas quando o $p < 0,05$ e como tendência quando $p > 0,05$ e $< 0,1$.

258

259 **Experimento 1. Efeito da adição de IGF-I ao meio de cultivo no** 260 **desenvolvimento de embriões produzidos na ausência de soro fetal** 261 **bovino (SFB)**

262

263 Foram utilizados ovários de vacas anelradas, coletados no frigorífico
264 “Frigol”, na cidade de Lençóis Paulista (SP), localizado a 47 km do laboratório.
265 O tempo decorrido entre a coleta dos ovários e sua chegada ao laboratório foi
266 de aproximadamente 1 hora.

267

268 Os oócitos de vacas da raça Nelore foram maturados, fertilizados com
269 sêmen de touros da raça Nelore e 10 hpi os embriões foram distribuídos ao
270 acaso em quatro grupos experimentais, de acordo com a composição do meio
271 de cultivo: grupo SFB (5% de SFB + 0 ng/mL de IGF-I; $n=165$); grupo IGF (0%
272 de SFB + 100 ng/mL de IGF-I; $n=163$); grupo SFB+IGF (5% de SFB + 100
273 ng/mL de IGF; $n=169$) e grupo controle (0% de SFB + 0 ng/mL de IGF-I;
274 $n=168$). Em todos os grupos experimentais foram avaliadas as taxas de
275 clivagem (48 hpi), mórula (96 hpi), blastocisto (168 hpi) e blastocisto eclodido
(240 hpi).

276

277 **Experimento 2. Influência da adição de IGF-I ao meio de cultivo no** 278 **desenvolvimento de embriões submetidos ao ET**

279

280 Foram utilizados ovários de vacas Nelore e HPB, coletados no frigorífico
281 “Mondelli”, na cidade de Bauru (SP), localizado a 90 km do laboratório. O
282 tempo decorrido entre a coleta dos ovários e sua chegada ao laboratório foi de
283 aproximadamente 2 horas.

284 Oócitos de vacas Nelore e HPB foram maturados, fertilizados com
285 sêmen de touros das raças Nelore e HPB, respectivamente e foram distribuídos
286 em dois grupos experimentais. No grupo controle, os embriões (≥ 16 células)
287 foram maturados, fertilizados e cultivados em temperatura constante de 39 °C.
288 No grupo ET, os embriões (≥ 16 células; 96 hpi) foram submetidos a ET de 41
289 °C, durante 9 horas consecutivas e, a seguir, voltaram para a temperatura de
290 39 °C. Foram utilizadas seis palhetas de sêmen para cada raça de touro.

291 Os embriões dos grupos controle e ET foram distribuídos ao acaso em
292 dois sub-grupos, onde foram tratados (+ IGF; 100 ng/mL) ou não (- IGF) com
293 IGF-I recombinante humana no meio de cultivo. Foram observadas as taxas de
294 clivagem (48 hpi), mórula (96 hpi) e blastocisto (168 hpi).

295

296 **Experimento 3. Influência da adição de IGF-I ao meio de cultivo na taxa de** 297 **apoptose de embriões submetidos ao ET**

298

299 Foram utilizados ovários de vacas Nelore e HPB coletados no frigorífico
300 “Mondelli”, na cidade de Bauru (SP), localizado a 90 km do laboratório. O
301 tempo decorrido entre a coleta dos ovários no frigorífico “Mondelli” e sua
302 chegada ao laboratório foi de 2 horas.

303 Os oócitos de vacas Nelore e HPB foram maturados, fertilizados com
304 sêmen de touros das raças Nelore e HPB, respectivamente, e foram
305 distribuídos em dois grupos experimentais. No grupo controle, os embriões (\geq
306 16 células) foram maturados, fertilizados e cultivados em temperatura
307 constante de 39 °C. No grupo ET, os embriões (≥ 16 células; 96 hpi), foram
308 submetidos a ET de 41 °C, durante 9 horas consecutivas e, a seguir, voltaram
309 para a temperatura de 39 °C. Foram utilizadas seis palhetas de sêmen para
310 cada raça de touro, em um único ensaio.

311 Os embriões dos grupos controle e ET foram distribuídos ao acaso em
312 dois sub-grupos, onde foram tratados (+ IGF; 100 ng/mL) ou não (- IGF) com
313 IGF-I recombinante humana no meio de cultivo, respectivamente.

314 A técnica do TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated X-
315 dUTP nick end labeling) descrita por Paula-Lopes et al. [10], foi utilizada para
316 detectar a fragmentação de DNA nos estágios finais da apoptose (morte celular

317 programada). Para tanto, após 5 dias de cultivo (120 hpi), os embriões foram
318 coletados do cultivo e lavados em PBS acrescido de 1 mg/mL de polivinil-
319 pirolidona (PVP). Posteriormente foram fixados em solução de paraformaldeído
320 3,7% durante uma hora em temperatura ambiente e novamente lavados em
321 PBS acrescido de PVP, transferindo-os de gota para gota. Após fixação, os
322 embriões foram permeabilizados (0,5% de Triton X-100 e 0,1% citrato de sódio
323 em PBS) por mais uma hora em temperatura ambiente e lavados em PBS
324 acrescido de PVP, transferindo-os de gota para gota. Sob câmara úmida, os
325 embriões do controle positivo foram pré-incubados em solução de DNase (50
326 U/mL) a 37 °C por 1 hora. Em seguida, os embriões do controle positivo foram
327 submetidos à solução de Mix TUNEL durante uma hora a 37 °C sob câmara
328 úmida no escuro. O controle negativo foi incubado na ausência da solução
329 enzimática. Posteriormente foram lavados em PBS acrescido de PVP. Para a
330 visualização do DNA em microscopia de epifluorescência as lâminas foram
331 montadas com Hoechst 33342 diluído em glicerol (1 µg/mL).

332 Com filtro de excitação de 365 nm e de emissão 420 nm os núcleos
333 fluorescentes em azul (corante Hoechst 33342) indicaram células viáveis e com
334 filtro de excitação de 450-490 nm e de emissão 515 nm os núcleos
335 fluorescentes em verde (FITC) indicaram células com fragmentação no DNA.

336

337 **Resultados**

338

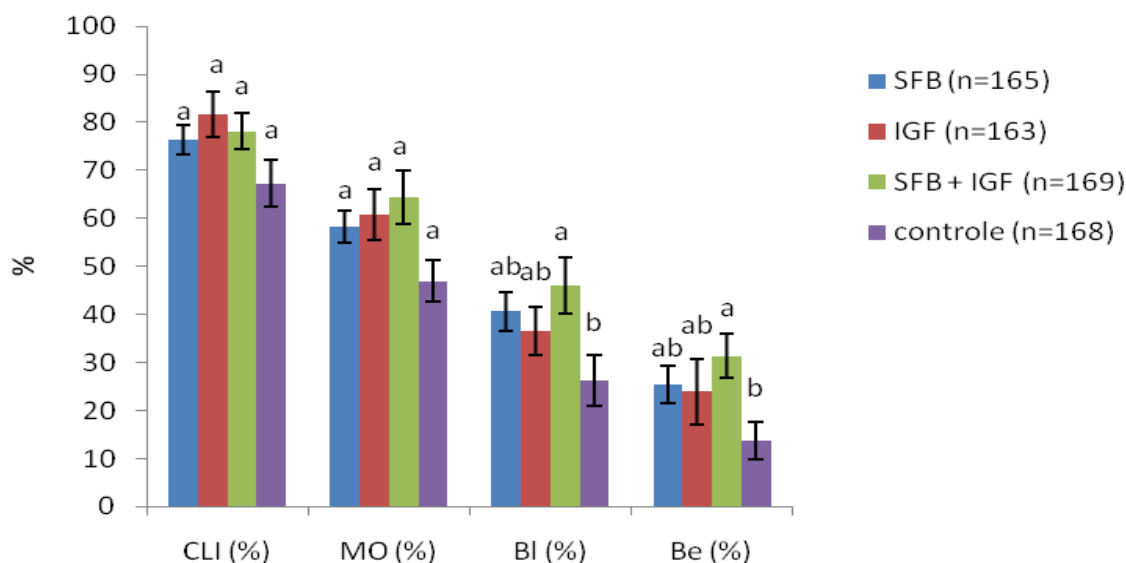
339 **Experimento 1. Efeito da adição de IGF-I no desenvolvimento *in vitro* de** 340 **embriões bovinos produzidos na ausência de SFB**

341

342 Não houve diferença significativa nas taxas de clivagem e mórula entre
343 os quatro grupos experimentais (figura 1). Entretanto, as análises das taxas de
344 blastocisto e blastocisto eclodido mostraram diferenças significativas entre os
345 grupos SFB + IGF e controle (figura 1).

346

347



348

349 Figura 1. Taxas (Média \pm EPM) de clivagem (CLI), mórula (MO), blastocisto (BI) e
 350 blastocisto eclodido (Be) de embriões dos grupos SFB (5% de SFB + 0 ng/mL de IGF-
 351 I), IGF (0% de SFB + 100 ng/mL de IGF-I), SFB+IGF (5% de SFB + 100 ng/mL de IGF)
 352 e controle (0% de SFB + 0 ng/mL de IGF-I). ^{a,b} letras diferentes representam diferenças
 353 significantes ($p < 0,05$).

354

355 Experimento 2. Influência da adição de IGF-I ao meio de cultivo no 356 desenvolvimento de embriões submetidos ao ET

357

358 A adição de IGF-I ao meio de cultivo de embriões das raças Nelore ou
 359 HPB não alterou significativamente as taxas de clivagem, mórula e blastocisto
 360 quando os quatro grupos experimentais foram analisados simultaneamente
 361 (tabela 1). Entretanto, observou-se diferença significativa na taxa de blastocisto
 362 na análise dos efeitos principais (temperatura, tratamento e raça; tabela 1 e
 363 figura 2).

364

365 Tabela 1. Taxas de clivagem (CLI), mórula (MO) e blastocisto (BI) de embriões das raças Nelore
 366 ou Holandesa Preto e Branco (HPB), tratados (+ IGF) ou não (- IGF) com IGF-I recombinante
 367 humana no meio de cultivo e mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse térmico calórico (ET)
 368 de 41°C por 9h, 96hpi.

Raça	Temp. (°C)	Tratamento	Oócito (n)	CLI (%)	MO (%)	BI (%)
Nelore	39	- IGF	101	89,4	68,4	26,3
		+ IGF	95	94,0	77,2	32,6
	41	- IGF	97	81,6	61,2	20,4
		+ IGF	98	83,5	72,0	25,7
HPB	39	- IGF	106	76,1	52,3	18,1
		+ IGF	105	80,1	56,6	23,5
	41	- IGF	118	72,3	53,5	13,3
		+ IGF	112	80,5	55,0	19,4

Efeitos Principais

Temperatura	Nelore	39	196	91,8	72,9	29,6
		41	195	82,6	66,7	24,1*
	HPB	39	211	78,2	54,5	20,1
		41	230	76,5	54,3	15,5**
Tratamento	Nelore	- IGF	198	85,5	64,8	23,3
		+ IGF	193	88,9 ^a	55,8	29,9*
	HPB	- IGF	224	74,2	53,0	15,7
		+ IGF	217	80,4	55,8	21,4**

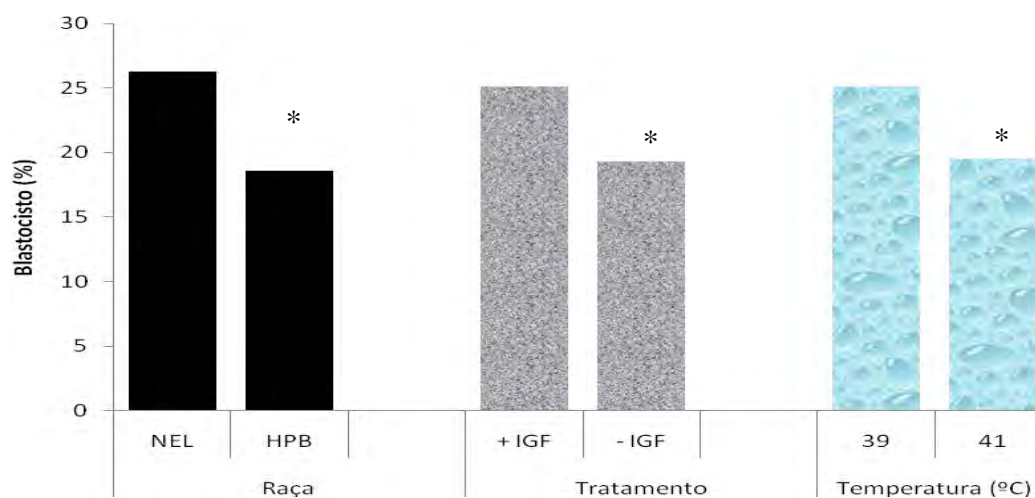
369 * representa diferença significativa ($p < 0,05$) na taxa de blastocisto na raça Nelore

370 **representa diferença significativa ($p < 0,05$) na taxa de blastocisto na raça HPB

371

372

373



374

375 Figura 2. Taxas de blastocistos de embriões das raças Nelore ou Holandesa Preto e
 376 Branco (HPB), cultivados na presença (+ IGF) ou ausência (- IGF) de IGF-I e mantidos
 377 a 39 °C ou submetidos ao ET de 41°C por 9h, 96 hpi. * $p < 0,05$

378 **Experimento 3. Influência da adição de IGF-I ao meio de cultivo na taxa de**
 379 **apoptose em embriões submetidos ao ET**

380

381 O ET não alterou significativamente o número total de blastômeros bem
 382 como a taxa de apoptose nos embriões das raças Nelore ou HPB, quando os
 383 quatro grupos experimentais foram analisados simultaneamente (tabela 2).
 384 Entretanto, quando foram analisados os efeitos principais (temperatura e raça;
 385 tabela 2 e figura 3) observou-se, após o ET, aumento na taxa de apoptose em
 386 ambas as raças, sendo mais evidente na raça HPB quando comparada à raça
 387 Nelore (tabela 2).

388

389

390 Tabela 2. Média (\pm EPM) do número total de células e da taxa de apoptose de embriões das
 391 raças Nelore ou Holandesa Preto e Branco (HPB), tratados (+ IGF) ou não (- IGF) com IGF-I
 392 recombinante humana no meio de cultivo e mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse
 393 térmico calórico (ET) de 41°C por 9h, 96hpi

Raça	Temp. (°C)	Tratamento	≥ 16 células (n)	Número total de células	Apoptose (%)
Nelore	39	- IGF	19	20,1 \pm 1,4	3,5 \pm 0,1
		+ IGF	20	22,7 \pm 1,9	2,9 \pm 0,3
	41	- IGF	19	19,1 \pm 1,0	4,3 \pm 0,2
		+ IGF	19	22,9 \pm 2,4	3,9 \pm 0,2
HPB	39	- IGF	20	18,8 \pm 1,9	5,3 \pm 0,2
		+ IGF	19	21,7 \pm 1,1	4,8 \pm 0,3
	41	- IGF	20	18,6 \pm 1,7	6,8 \pm 0,1
		+ IGF	21	21,4 \pm 1,0	5,6 \pm 0,1

Efeitos Principais

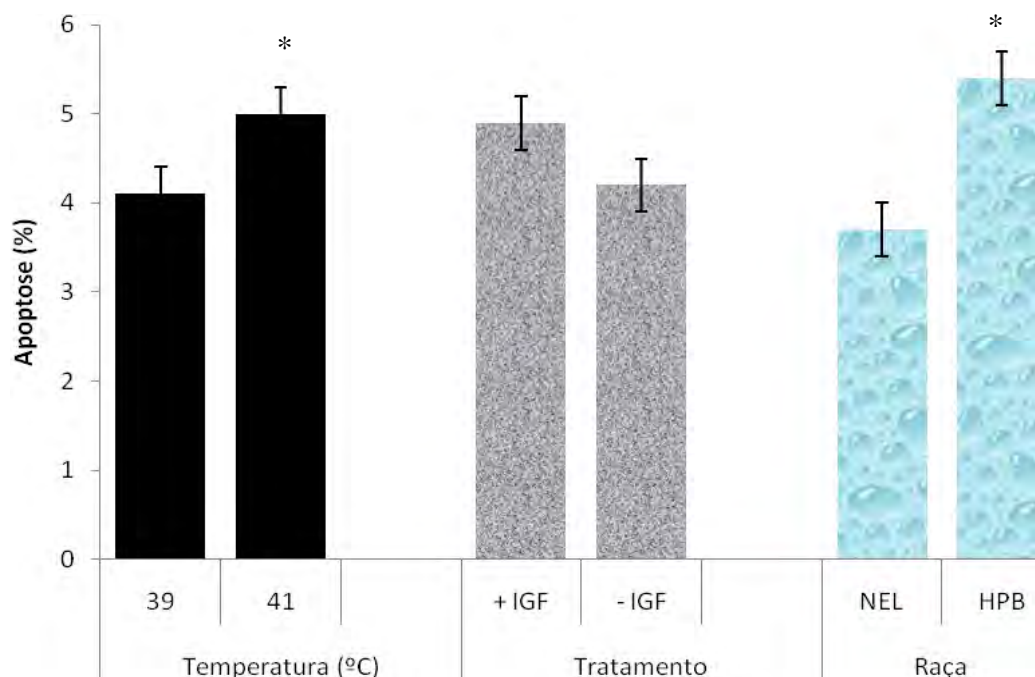
Temperatura	Nelore	39	39	21,4 \pm 1,7	3,3 \pm 0,2
		41	38	21,0 \pm 1,7	4,1 \pm 0,3*
	HPB	39	39	20,3 \pm 1,5	4,8 \pm 0,3
		41	41	20,0 \pm 1,4	6,0 \pm 0,4**
Tratamento	Nelore	- IGF	38	19,6 \pm 1,2	4,0 \pm 0,2
		+ IGF	39	22,8 \pm 2,2	3,3 \pm 0,3
	HPB	- IGF	40	18,7 \pm 1,8	5,8 \pm 0,5
		+ IGF	40	21,6 \pm 1,0	5,0 \pm 0,2

394 * representa diferença significativa ($p < 0,05$) na taxa de apoptose na raça Nelore

395 **representa diferença significativa ($p < 0,05$) na taxa de apoptose na raça HPB

396

397



398

399 Figura 3. Taxa de apoptose (Média \pm EPM) de embriões das raças Nelore ou
 400 Holandesa Preto e Branco (HPB), cultivados na presença (+ IGF) ou ausência
 401 (- IGF) de IGF-I e mantidos a 39 °C ou submetidos ao ET de 41°C por 9h, 96 hpi.
 402 * $p < 0,05$

403

404 **Discussão**

405

406 No presente trabalho, o ET diminuiu o desenvolvimento embrionário
 407 inicial de forma mais evidente na raça HPB quando comparada à Nelore.
 408 Resultados similares obtidos por Paula Lopes et al. [41] ao compararem a
 409 resistência ao ET (41 °C, 6h, 96hpi) entre *Bos indicus* (Brahman) e *Bos taurus*
 410 (HPB e Angus), demonstraram que a porcentagem de blastocisto de embriões
 411 Brahman submetidos ao ET foi significativamente maior do que embriões HPB
 412 e Angus. Da mesma forma, Barros et al. [5] e Eberhardt et al. [37]
 413 demonstraram que embriões *Bos taurus* e mestiços apresentaram maior
 414 sensibilidade ao ET (41 °C, 12 h, 96hpi) quando comparados aos embriões *Bos*
 415 *indicus* e mestiços, resultando na redução das taxas de blastocisto após o ET.
 416 Além disso, Sartorelli et al. [23] verificaram que a taxa de prenhez em
 417 receptoras inovuladas com embriões da raça Nelore submetidos ao ET (41 °C,
 418 12h, 96hpi) foi maior do que em receptoras inovuladas com embriões da raça
 419 Angus submetidos ao ET. Estes resultados indicam que embriões da raça

420 zebuínos tem maior capacidade de sobreviver ao ET nos estágios iniciais de
421 desenvolvimento e estabelecerem prenhez do que embriões taurinos.

422 No presente experimento, a adição de IGF-I no meio de cultivo de
423 embriões de ambas as raças, independente do ET, não afetou os primeiros
424 estágios do desenvolvimento embrionário (taxas de clivagem e mórula),
425 corroborando estudos anteriores [30, 32, 36, 42]. Sirisathien et al. [32]
426 sugeriram que a clivagem é um reflexo da taxa de fertilização dos oócitos, e
427 não é afetada pela adição de fatores de crescimento no cultivo, pois relaciona-
428 se com a capacidade do oócito em se dividir, após ter ocorrido o acúmulo de
429 RNAm em seu citoplasma e reorganização celular durante a maturação
430 oocitária.

431 Entretanto, adição de IGF-I no meio de cultivo, na ausência de SFB,
432 promoveu aumento nas taxas de produção de blastocisto em ambas as raças.
433 Além disso, em embriões submetidos ao ET, observou-se uma tendência de
434 queda menos acentuada na taxa de blastocisto e redução na taxa de apoptose
435 com a adição de IGF-I ao meio de cultivo.

436 Estes resultados estão de acordo com vários trabalhos que
437 demonstraram os efeitos benéficos do IGF-I no desenvolvimento embrionário,
438 tanto na presença quanto na ausência de ET. A adição de IGF-I ao meio de
439 cultura induziu aumento na taxa de produção de blastocistos [16,17, 25, 29-35,
440 40, 45-48], no número de células no estágio de blastocisto [29, 31, 32, 45, 47,
441 48] bem como reduziu a incidência de apoptose embrionária em bovinos [16,
442 17, 27-31, 45].

443 Entre as explicações para os efeitos benéficos e termoprotetores do uso
444 de IGF-I na produção de embriões, pode-se destacar a maior absorção de
445 glicose pelo embrião durante seu desenvolvimento inicial [49], o aumento da
446 síntese protéica, do metabolismo embrionário e da proliferação celular [50], o
447 aumento da transcrição de alguns genes envolvidos com o desenvolvimento
448 embrionário (Desmocolin II - formação e expansão do blastocisto [50, 51]; Na/K
449 - controle de fluidos da blastocele [52] e formação de junções celulares [53]), o
450 aumento da síntese das proteínas do choque térmico (HSP [12, 15, 54, 55]),
451 bem como favorece a transcrição de alguns genes anti apoptóticos [56] e
452 inativa alguns genes pró apoptóticos [57].

453 De forma similar ao observado por outros autores [10, 58], o ET não
454 alterou significativamente o número de blastômero nas raças Nelore e HPB.
455 Entretanto, Sartorelli et al. [23] observaram que embriões da raça Nelore, 12
456 horas após serem submetidos ao ET, apresentaram maior número de
457 blastômeros, quando comparados os da raça Angus.

458 Uma das possíveis explicações para esta discrepância nos resultados
459 obtidos por Sartorelli et al. [23], além da diferença nas raças estudadas (HPB
460 vs Angus), seria o menor tempo de ET (9 h) utilizado no presente estudo,
461 quando comparado ao de Sartorelli et al. (12 h). Além disso, os blastocistos
462 produzidos no presente experimento foram oriundos de oócitos obtidos de
463 ovários de abatedouro, enquanto que no experimento realizado por Sartorelli et
464 al. [23], os oócitos foram obtidos através da técnica de aspiração folicular
465 guiada por ultrassonografia (OPU – *ovum pick up*). Existem indicações que
466 oócitos obtidos por OPU são de pior qualidade quando comparados aos de
467 matadouro [59, 60]. De fato, dados não publicados obtidos em nosso
468 laboratório indicaram menor produção *in vitro* (5 ensaios) de blastocisto com
469 oócitos oriundos de OPU quando comparados aos obtidos em matadouro [25%
470 (n= 103 oócitos) vs 36% (n = 162 oócitos), respectivamente]. Assim sendo, é
471 possível que oócitos oriundos de OPU sejam mais sensíveis aos efeitos
472 deletérios do ET que os obtidos em matadouro.

473 O ET aumentou significativamente a taxa de apoptose independente da
474 raça estudada, corroborando trabalhos anteriores [10, 12, 20, 22 61-65].
475 Contudo, a taxa de apoptose foi maior na raça HPB quando comparada à raça
476 Nelore. Este dado está de acordo com os obtidos por Sartorelli et al. [23], que
477 observaram taxas de apoptose mais elevadas na raça Angus quando
478 comparada à raça Nelore.

479 O fato da raça Nelore ter apresentado menor taxa de apoptose do que a
480 HPB pode estar associado à possibilidade da raça Nelore ter maior
481 concentração plasmática de IGF-I que a raça HPB, uma vez que, a raça
482 Brahman (zebuíno) apresenta níveis circulantes de IGF-I mais elevados
483 quando comparada à raça Angus (taurino; [66, 67]). Recentemente, Sartori et
484 al. (2010, dados não publicados apresentados durante a Reunião Anual da
485 Sociedade Brasileira de Tecnologia de embriões) verificaram que vacas Nelore
486 possuem maior concentração sanguínea de IGF-I do que vacas HPB. Além

487 disso, quando blastocistos Nelore e HPB foram submetidos a ET, observou-se
488 que a expressão gênica de IGF-I foi mais elevada na raça Nelore, o que
489 poderia contribuir para uma maior tolerância ao ET desta raça (Satrapa et al.,
490 dados não publicados, capítulo 3 da presente tese).

491 Conclui-se que: a) a adição de IGF-I ao meio de cultivo pode ser
492 utilizada em substituição ao SFB; b) o emprego de IGF-I no meio de cultivo de
493 embriões bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*) melhora a produção embrionária e
494 diminui a incidência de apoptose; c) a raça HPB é mais sensível aos efeitos
495 deletérios do ET do que a raça Nelore, ou seja, apresenta diminuição mais
496 acentuada na produção de blastocisto, bem como maior incidência de
497 apoptose.

498

499 **Referências**

500

- 501 [1] Associação dos Criadores de Nelore do Brasil (ACNB), 2006, www.nelore.org.br.
502 [2] Barros CM, Nogueira MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*
503 2001;56:1483-1496.
504 [3] Bo GA, Baruseli PS, Martinez MF. Pattern and manipulation of follicular development.
505 *Anim Reprod Sci* 2003;78: 307-326.
506 [4] Hansen PJ. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim*
507 *Reprod Sci* 2004;82-83: 349-360.
508 [5] Barros CM, Pegorer, MF, Vasconcelos, JL, Eberhardt, BG, Monteiro, FM. Importance of
509 sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated
510 temperatures. *Theriogenology* 2006;65: 210 -218.
511 [6] Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula Lopes FF, al-Katanani YM, Krininger III CE,
512 Chase, CC Jr. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies
513 for mitigation. *Theriogenology* 2001;55: 91-103.
514 [7] Finch VA. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the
515 tropics. *J Anim Sci* 1986;62: 531-542.
516 [8] Gaughan JB, Mader TL, Holt SM, Josey MJ, Rowan KJ. Heat tolerance of Boran and Tuli
517 crossbred steers. *J Anim Sci* 1999;77: 2398-2405.
518 [9] Hammond AC, Chase JR CC, Bowers EJ, Olson TA, Randel RD. Heat tolerance in Tuli-,
519 Senepol-, and Brahman-sired F1 Angus heifers in Florida. *J Anim Sci* 1998;76: 1568-1577.
520 [10] Paula Lopes FF, Hansen PJ. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine
521 embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol Reprod* 2002a;66: 1169 -1177.
522 [11] Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel
523 W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus*
524 but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 1998;49: 657-665.
525 [12] Al-Katanani YM, Hansen PJ. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the
526 role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Mol Reprod Dev* 2002;62: 174-
527 180.

- 528 [13]Paula Lopes FF, Chase JR CC, Al-Katanani YM, Krininger CE, Rivera RM, Tekin S,
529 Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ. Genetic divergence in cellular resistance
530 to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot
531 climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and
532 lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 2003;125: 285-294.
- 533 [14] Barros CM, Monteiro FM, Mello DS, Carvalho LM, Teixeira AB, Trinca LA, Freitas EC.
534 Resistance of *Bos indicus* to heat shock, compared to crossbred or *Bos Taurus*, at early
535 stages of *in vitro* embryo development. International Symposium on Reproduction in
536 Domestic Ruminants, 6th, Scotland, 2002;p.A4.
- 537 [15] Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat
538 shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update* 2000;6: 149-159.
- 539 [16] Jousan FD, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine
540 preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol Reprod* 2004;71: 1665-1650.
- 541 [17] Jousan FD, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine
542 preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic
543 actions requiring PI3K signaling. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 189-196.
- 544 [18] Kurzawa R, Glabowski W, Baczkowski T, Brelik P. Evaluation of mouse preimplantation
545 embryos exposed to oxidative stress cultured with insulin-like growth factor I and II,
546 epidermal growth factor, insulin, transferrin and selenium. *Reprod Biol* 2002;2: 143-162.
- 547 [19] Moss JI, Pontes E, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation
548 embryos from anti-developmental actions of menadione. *Arch Toxicol* 2009;83: 1001–
549 1007.
- 550 [20] Neuber E, Luetjens CM, Chan AWS, Schatten GP. Analysis for DNA fragmentation of *in*
551 *vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. *Theriogenology* 2002;57: 2193-2202.
- 552 [21] Malayer JR, Hansen PJ. Differences between Brahman and Holstein cows in heat shock-
553 induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium.
554 *J Anim Sci* 1990;68: 266-280.
- 555 [22] Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation
556 embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev* 1997;46:138-145.
- 557 [23]Sartorelli ES, Satrapa RA, Barcelos ACZ, Potiens JR, Barros CM. Influência do estresse
558 térmico na taxa de apoptose de embriões bovinos (*indicus* vs. *taurus*) produzidos *in vitro* e
559 na capacidade dos mesmos originarem gestações. *Acta Sci Vet* 2006;34: 476.
- 560 [24] Lighten AD, Moore GE, Winston RML, Hardy K. Routine addition of human insulin-like
561 growth factor-1 ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. *Human Reprod*
562 1998;13: 3144–3150.
- 563 [25] Herrler A, Krusche CA, Beier HM. Insulin and insulin-like growth factor-1 promote rabbit
564 blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol Reprod* 1998;59: 1302–1310.
- 565 [26] Fabian D, Il'ková G, Reháč P, Czikková, Baran V, Koppel J. Inhibitory effect of IGF-I on
566 induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*
567 2004;61: 745–755.
- 568 [27] Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Insulin and insulin-like growth
569 factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *J Vet Med*
570 *Sci* 1995;57: 1109-1111.
- 571 [28] Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillo P. Role of
572 epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo
573 development *in vitro*. *Biol Reprod* 1996;54: 1420-1429.

- 574 [29] Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Regulation of apoptosis in the bovine
575 blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev*
576 2002;62: 489–495.
- 577 [30] Makarevich AV, Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos
578 stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biol*
579 *Reprod* 2002;66: 386–392.
- 580 [31] Moreira F, Paula Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. Effects of growth
581 hormone and insulin-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine
582 embryos. *Theriogenology* 2002;57: 895-907.
- 583 [32] Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. Influences of epidermal growth factor
584 and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Anim Reprod*
585 *Sci* 2003;77: 21-32.
- 586 [33] Lima PF, Oliveira MA, Santos MH, Reichenbach HD, Weppert M, Paula-Lopes FF, Neto
587 CC, Goncalves PB. Effect of retinoids and growth factor on *in vitro* bovine embryos
588 produced under chemically defined conditions. *Anim Reprod Sci* 2006;95: 184-192.
- 589 [34] Block J, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Ocon OM,
590 Krininger CE 3RD, Liu J, Hansen PJ. Use of insulin-like growth factor-I during embryo
591 culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase
592 pregnancy rates following the transfer of *in vitro*-produced embryos to heat-stressed,
593 lactating cows. *J Anim Sci* 2003;81: 1590-1602.
- 594 [35] Block, J., Wrenzycki, C., Niemann, H., Herrmann, D., Hansen, P.J. Effects of insulin-like
595 growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced *in*
596 *vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 2008;7: 895–903.
- 597 [36] Block J, Hansen PJ. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-
598 1 on survival of *in vitro* produced embryos following transfer to lactating dairy cows.
599 *Theriogenology* 2007;67: 1518-1529.
- 600 [37] Eberhardt BG, Satrapa RA, Capinzaiki CR, Trinca LA, Barros CM. Influence of the breed
601 of bull (*Bos taurus indicus* vs *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*,
602 *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Anim*
603 *Reprod Sci* 2009;114: 54-61.
- 604 [38] Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine derived *in vitro* or
605 *in vivo*. *Biol Reprod* 2000;62: 847-856.
- 606 [39] SAS: Statistical Analysis System. A user's guide. SAS Institute C, version 9.1.3.,
607 2002/2003.
- 608 [40] Lin TC, Yen JM, Gong KB, Hsu TT, Chen LR. IGF-1/IGFBP-1 increases blastocyst
609 formation and total blastocyst cell number in mouse embryo culture and facilitates the
610 establishment of a stem-cell line. *BMC Cell Biol* 2003;4: 14.
- 611 [41] Paula Lopes FF, Chase JR CC, Al-Katanani YM, Krininger ICE, Rivera RM, Tekin S,
612 Majewski IAC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ. Breed differences in resistance of bovine
613 preimplantation embryos to heat shock. *Theriogenology* 2001;55: 436 [Abstract].
- 614 [42] Hansen PJ. Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the
615 mammalian preimplantation embryo from heat shock. *Ann Rev Biomed Sci* 1999;1: 5-29.
- 616 [43] Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E. Developmental
617 potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim*
618 *Reprod Sci* 2007;101: 225-240.
- 619 [44] Palma GA, Müller M, Brem G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high
620 concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *J Reprod*
621 *Fertil* 1997;110:347-353.

- 622 [45] Prella K, Stojkovic M, Boxhammer K, Motlik J, Ewald D, Arnold GJ, Wolf E. Insulin-like
623 growth factor I (IGF-I) and long R(3)IGF-I differently affect development and messenger
624 ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in in vitro
625 produced bovine embryos. *Endocrinology* 2001;142:1309-1316.
- 626 [46] Block J, Fischer-Brown AE, Rodina TM, Ealy AD, Hansen PJ. The effect of in vitro
627 treatment of bovine embryos with IGF-1 on subsequent development in utero to Day 14 of
628 gestation. *Theriogenology* 2007;68: 153-161.
- 629 [47] Bonilla AQ, Oliveira LJ, Ozawa M, Newsom EM, Lucy MC, Hansen PJ. Developmental
630 changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation
631 bovine embryo. *Mol Cell Endocrinol* 2011;332:170-179.
- 632 [48] Sirisathien S, Brackett BG. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF
633 and IGF-I. *Mol Reprod Dev* 2003;65: 51-56.
- 634 [49] Pantaleon M, Kaye PL. IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts
635 via IGF-I receptor. *Mol Reprod Dev.* 1996;44:71-6.
- 636 [50] Fleming TP, Garrod DR, Elsmore AJ. Desmosome biogenesis in the mouse preimplantation
637 embryo. *Development* 1991;112:527-539.
- 638 [51] Collins JE, Lorimer JE, Garrod DR, Pidsley SC, Buxton RS, Fleming TP. Regulation of
639 desmocollin transcription in mouse preimplantation embryos. *Development* 1995;
640 121:743-753.
- 641 [52] Watson AJ, Barcroft LC. Regulation of blastocyst formation. *Front Biosci* 2001; 6: 708-
642 730.
- 643 [53] Violette MI, Madan P, Watson AJ. Nap/Kp-ATPase regulates tight junction formation and
644 function during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 2006; 289:406-419.
- 645 [54] Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. 2001. Heat shock proteins: Endogenous
646 modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 286:433-442.
- 647 [55] Garrido C, Schmitt E, Cande C, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G. HSP27 and HSP70:
648 Potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* 2003;2: 579-584.
- 649 [56] Duan XX, Ou JS, Li Y, Su JJ, Ou C, Yang C, Yue HF, Ban KC. Dynamic expression of
650 apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its
651 relation to apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005;11:4740-4.
- 652 [57] Gallaher BW, Hille R, Raile K, Kiess W. Apoptosis: live or die—hard work either way!
653 *Horm Metab Res* 2001;33:511-519.
- 654 [58] Hansen PJ. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance
655 to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress.
656 *Theriogenology* 2007;68: 242-249.
- 657 [59] Hernández Cerón J, Chase JR CC, Hansen PJ. Differences in heat tolerance between
658 preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. *J Dairy Sci*
659 2004;87: 53-58.
- 660 [60] Merton JS, van Dillen JAW, Hasler JF, den Dass JHG. Effect of culture media and CO₂
661 concentration on embryo development in a bovine embryo *in vitro* production system.
662 *Theriogenology* 1995;43: 280 [Abstract].
- 663 [61] Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. Factors
664 affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in
665 the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003;59:651-674.
- 666 [62] Paula Lopes FF, Hansen PJ. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation
667 embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem Biophys Res Commun*
668 2002b;295: 37-42.

- 669 [63] Alvarez P, Spicer LJ, Chase JR CC, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, Hammond AC,
670 Olson TA, Wettemann RP. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in
671 Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci* 2000;78:
672 1291-1302.
- 673 [64] Brodsky JL, Chiosis G. Hsp70 molecular chaperones: emerging roles in human disease and
674 identification of small molecule modulators. *Curr Top Med Chem* 2006;6:1215-1225.
- 675 [65] Edwards JL, Hansen PJ. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in
676 bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol Reprod*
677 1996;55:341-346.
- 678 [66] Simpson RB, Chase CC Jr, Spicer LJ, Vernon RK, Hammond AC, Rae DO. Effect of
679 exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth
680 factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth
681 in superovulated Angus and Brahman cows. *J Reprod Fertil.* 1994;102:483-92.
- 682 [67] Alvarez P, Spicer LJ, Chase CC Jr, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, Hammond AC,
683 Olson TA, Wettemann RP. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in
684 Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci.*
685 2000;78:1291-302.
686

CAPÍTULO 3

Expressão gênica de IGF-I e II, seus receptores (IGFR-I e II), proteínas ligantes (IGFBP-2 e 4) e PAPP-A em oócitos imaturos e embriões bovinos (zebuínos vs taurinos), produzidos *in vitro* e submetidos ao estresse térmico calórico

Este artigo científico está de acordo com as normas para publicação na *Theriogenology*, exceto a apresentação das figuras, tabelas e o idioma

1 **Expressão gênica de IGF-I e II, seus receptores (IGFR-I e II), proteínas**
2 **ligantes (IGFBP-2 e 4) e PAPP-A em oócitos imaturos e embriões bovinos**
3 **(zebuínos vs taurinos), produzidos *in vitro* e submetidos ao estresse**
4 **térmico calórico**

5
6
7
8
9 **Running tittle:**

10 Expressão gênica do sistema IGF em oócitos e embriões bovinos
11
12
13
14
15

16 Satrapa, R.A.¹, Castilho, A.C.S.²; Simões, R.A.L.¹; Razza, E.M.¹; Silva, C.F.¹;
17 Nabhan, T.¹; Pegorer, M.F.³; Puelker, R.Z.¹; Eduardo, H.P.⁴; Buratini Jr, J.²;
18 Barros, C.M.^{1a}
19
20
21

22 ¹Departamento de Farmacologia, ²Departamento de Fisiologia, Instituto de
23 Biociências de Botucatu – IBB; ³Departamento de Reprodução Animal –
24 FMVZ, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu - SP, Brasil;
25 ⁴Veterinário Autônomo
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

^aAutor para correspondência: Ciro Moraes Barros; fax: +55 14 38116253; cmbarrros@ibb.unesp.br

37 **Resumo**

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

Evidências indicam que o sistema IGF está envolvido na aquisição de competência oocitária e qualidade embrionária. Para melhor compreender as possíveis diferenças no desenvolvimento embrionário *in vitro* entre as raças zebrúinas e taurinas, objetivou-se com o presente estudo determinar a expressão do RNAm do IGF-I e II, seus receptores (IGFR-I e II), proteínas ligantes (IGFBP-2 e 4) e PAPP-A em oócitos e blastocistos proveniente das raças Nelore (NEL) e Holandês Preto e Branco (HPB). Vacas NEL (n=4) e HPB (n=7) foram submetidas à aspiração folicular ovariana guiada por ultrassonografia (OPU) e os oócitos selecionados (graus 1, 2 e 3) foram submetidos a desnudamento em vortex (3 minutos, 900xg) e tratamento com protease para remoção das células do *cumulus* e da zona pelúcida, respectivamente. “Pools” de 20 oócitos de NEL (n=8) e HPB (n=4) foram submetidos à extração de RNA total. Além disso, oócitos de vacas NEL ou HPB obtidos por OPU foram maturados em meio TCM 199, fertilizados com sêmen de touros das raças NEL (n=6) e HPB (n=6), respectivamente, e cultivados em meio SOF (synthetic oviduct fluid, na ausência de SFB) até o estágio de blastocisto. Noventa e seis horas pós-inseminação (96 hpi), os embriões com mais de 16 células foram separados ao acaso em dois grupos: controle e Estresse Térmico (ET). Os embriões do grupo controle foram cultivados a 39 °C continuamente e do grupo ET expostos a 41 °C por 9 horas, retornando a seguir para 39 °C. Os embriões, 168 hpi, foram retirados do meio de cultivo, formando-se 5 “pools” com 5 embriões em cada grupo experimental que foram submetidos ao protocolo de extração de RNA, armazenados à -80 °C. A expressão dos genes alvos foi realizada por RT-PCR em tempo real com o uso de oligo-dT na transcrição reversa e “primers” específicos para a espécie bovina na técnica do PCR. A expressão de ciclofilina A (CYC-A) foi utilizada como controle endógeno. As médias dos níveis de mRNA dos genes alvos foram comparadas entre as raças por meio do teste t e Man-Whitney quando os dados seguiam ou não um padrão normal de distribuição, respectivamente. Os valores médios da expressão de IGF-I e II, IGFR-I e II e IGFBP-2 e 4 foram maiores em oócitos HPB (0,96±0,21; 0,74±0,27; 1,08±0,04; 1,19±0,5; 1,21±0,23; 0,53±0,15; respectivamente) quando comparados à NEL (0,48±0,10; 0,07±0,02; 0,04±0,03; 0,06±0,02; 0,05±0,01; 0,03±0,15, respectivamente; p<0,01). Entretanto, a expressão de PAPP-A foi muito maior em NEL (28,10±18,96) do que em HPB (1,32±0,17; p<0,05). Os valores médios da expressão de IGF-I foram maiores (p<0,05) em “pools” de blastocistos submetidos ao ET (41 °C), tanto em NEL quanto HPB, sendo este aumento mais evidente na raça Nelore. Além disso, os valores relativos das expressões gênicas das IGFBP-2 e 4 foram mais elevados (p<0,05) em “pools” de blastocisto provenientes de vacas da raça HPB submetidos ao ET, quando comparados aos da raça NEL e HPB controle. Estes resultados indicam que a elevada expressão de PAPP-A e a baixa expressão de IGFBP-2 e 4 relacionam-se com uma degradação mais eficiente de IGFBPs, aumentando assim a biodisponibilidade de IGF em oócitos de vacas das raças NELe, quando comparados àqueles de vacas HPB. Além disso, a alta biodisponibilidade de IGF encontrada em blastocistos NEL, submetido ao ET, pode contribuir para a maior tolerância desta raça ao ET, quando comparada à raça HPB.

Palavras-chave: IGF, expressão gênica, bovino, oócito, embrião, estresse térmico, FIV

85 **Introdução**

86

87 Acima de 50% do rebanho bovino mundial se encontra nos trópicos e é
88 submetido a temperaturas mais altas do que animais que habitam climas
89 temperados. A raça Nelore é a raça zebuína (*Bos indicus*) predominante no
90 Brasil (90 milhões de cabeças; [1]) e está se tornando mais popular em outros
91 países tropicais e subtropicais da América do Sul e no mundo [2, 3], devido,
92 entre outros fatores, a sua maior resistência a altas temperaturas, umidade e
93 parasitas, quando comparada às raças derivadas do gado europeu (*Bos taurus*,
94 [4, 5]).

95 Os processos reprodutivos em mamíferos, machos e fêmeas, são muito
96 sensíveis a variações, principalmente pelo aumento da temperatura ambiente,
97 levando a uma redução quantitativa e qualitativa da produção espermática nos
98 machos e queda da fertilidade nas fêmeas [6].

99 Está bem documentado que a exposição de fêmeas de mamíferos ao
100 estresse térmico (ET) aumenta a mortalidade embrionária [6,7]. A maior causa
101 da redução na sobrevivência embrionária induzida pelo ET pode ser originada
102 pelos efeitos adversos das temperaturas elevadas no desenvolvimento dos
103 zigotos e dos embriões [8].

104 Existem diferenças genéticas na resistência ao ET, com as raças
105 adaptadas apresentando menores temperaturas durante o ET do que raças
106 não adaptadas [9-12]. Devido ao gado zebuino ser mais termotolerante, as
107 consequências da exposição ao ET na produção (carne ou leite) são menores
108 para o gado *Bos indicus* do que para o *Bos taurus* [4].

109 A fase de pré-implantação representa um período extremamente dinâmico
110 da embriogênese, no qual o embrião se desenvolve a partir de uma única
111 célula, dependente do controle genético da transcrição materna, para um
112 conjunto de células altamente ativa metabólica e sinteticamente, possuindo
113 controle genético próprio. Durante esse período o embrião passa por várias
114 divisões celulares, ativa o genoma embrionário, sofre compactação, forma um
115 epitélio de transporte, diferencia-se em dois tipos celulares distintos e
116 desenvolve a cavidade da blastocèle. Essas funções requerem a regulação
117 precisa de várias funções celulares como a homeostasia, metabolismo e
118 expressão gênica [13].

119 A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é
120 limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do
121 genoma embrionário está ainda inativa. Esse período da baixa atividade
122 transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente
123 sensíveis a certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente
124 materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é um
125 aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre [14].
126 Utilizando sistema de cultivo *in vitro*, Rocha *et al.* [15] e Al-Katanani & Hansen
127 [16], mostraram que a temperatura elevada reduziu a sobrevivência dos
128 embriões em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário.

129 Os mecanismos celulares envolvidos no fenômeno da termotolerância
130 estão sendo estudados e um dos aspectos explorados é que a resposta
131 termoprotetora do embrião envolve a produção das proteínas conhecidas como
132 HSP (heat shock proteins). A indução da produção de HSP(s) em resposta ao
133 estresse serve para proteger as células contra a agressão, aumentando a
134 recuperação e induzindo um estado de resistência a um subsequente estresse
135 [17]. Além disso, as HSP(s) podem modular a apoptose celular, que é um dos
136 mecanismos envolvidos na proteção embrionária durante a exposição ao ET
137 [16, 17].

138 A apoptose nos mamíferos tem um papel importante no controle da
139 qualidade do desenvolvimento embrionário, uma vez que, através desse
140 mecanismo são eliminadas células danificadas, não funcionais e anormais. Por
141 outro lado, a habilidade do embrião inicial sobreviver em temperaturas
142 elevadas pode estar ligada à diminuição da taxa de apoptose [14], com
143 conseqüente aumento no número de células nos embriões, ou ao
144 desenvolvimento de mecanismos termoprotetores bioquímicos como, as
145 proteínas HSP e fatores de crescimento como o IGF-I [18, 19].

146 Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) foram
147 identificados no líquido folicular [20], em secreções uterinas [21], no trato
148 reprodutivo feminino [22-24] bem como em oócitos e embriões bovinos [25-28].
149 O transporte e a função dos IGFs são modulados pelas interações de pelo
150 menos seis proteínas de ligação a fatores de crescimento semelhante à
151 insulina (IGFBPs), que estão presentes em muitos líquidos extracelulares e em
152 embriões em fases adiantados de desenvolvimento [29-32].

153 As IGFs aumentam a proliferação celular, a mitogênese e a atividade de
154 hormônios esteróides [33, 34]. Tanto os IGFs tipos I e II, como seus receptores
155 (IGFR-I e II), são expressos em oócitos e embriões bovinos e ovinos
156 produzidos *in vitro* [25, 27, 28, 33, 35-37]. Além disso, a expressão das IGFBPs
157 (1 a 6) foi demonstrada em embriões de camundongos [35, 38] e de bovinos
158 [31, 39].

159 Os efeitos benéficos do IGF-I no desenvolvimento embrionário, tanto na
160 presença quanto na ausência de estresse, têm sido demonstrados em várias
161 espécies. A adição de IGF-I ao meio de cultura proporcionou um aumento no
162 número de mórulas e blastocistos, bem como reduziu a incidência de apoptose
163 embrionária em várias espécies [40-42], inclusive em bovinos [18, 43-48].

164 Considerando a prevalência do gado Nelore, bem como sua elevada
165 tolerância ao estresse térmico calórico, objetivou-se com o presente trabalho
166 verificar se o sistema IGF está mais expresso tanto em oócitos como em
167 blastocistos provenientes de vacas da raça Nelore, quando comparados aos da
168 raça Holandesa Preto e Branco (HPB), submetidos ou não ao ET.

169

170 **Material e Método**

171

172 **Expressão gênica de membros do sistema IGF (IGF-I, IGF-II, IGFR-I, IGFR- 173 II, IGFBPs 2, 4 e PAPP-A) em oócitos bovinos Nelore e HPB.**

174

175 A investigação da expressão do RNAm dos genes alvos foi realizada em
176 “pools” de 20 oócitos de vacas Nelore (n=8) e HPB (n=4), respectivamente,
177 obtidos através de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU – *ovum
178 pick up*), submetidos ao protocolo de extração de RNAm, armazenados em
179 freezer a – 80 °C, para posterior utilização da técnica de transcrição reversa
180 (RT), seguida por PCR em Tempo Real, para a determinação e quantificação
181 da expressão dos RNAm de alguns membros do sistema IGF (IGF-I, IGF-II,
182 IGFR-I, IGFR-II, IGFBPs 2, 4 e PAPP-A) em oócitos bovinos das raças Nelore
183 e HPB.

184

185 **Expressão gênica de membros do sistema IGF (IGF-I, IGF-II, IGFR-I, IGFR-**
186 **II, IGFBPs 2, 4 e PAPP-A) em embriões bovinos Nelore e HPB, submetidos**
187 **ou não ao estresse térmico.**

188

189 ***Produção in vitro de embriões***

190

191 Todos os reagentes e meios foram provenientes da Sigma-Aldrich (St.
192 Louis, MO, USA), Gibco (Langley, OK, USA; soro fetal bovino), Vivimed
193 (Ribeirão Preto, SP, Brasil; Choriomon[®]) e Hertape Calier (Juatuba, MG, Brasil;
194 Pluset[®]).

195

196 *Recuperação e classificação dos oócitos*

197

198 O processo de produção *in vitro* de embriões foi realizado com base em
199 Eberhardt *et al.* [49]. Oócitos obtidos através de OPU de vacas Nelore e HPB
200 em dias aleatórios do ciclo estral foram classificados de acordo com as suas
201 características celulares em quatro categorias [50]: I) oócitos com citoplasma
202 homogêneo, circundados por três ou mais camadas compactas de células do
203 *cumulus*; II) oócitos com menos de três camadas de células do *cumulus* ou
204 parcialmente desnudos, porém com granulação homogênea no citoplasma; III)
205 oócitos circundados apenas por células da corona radiata; IV) oócitos
206 desnudos.

207

208 *Maturação in vitro*

209

210 Os COCs classificados como categoria I, II e III foram lavados três vezes
211 em meio TCM 199 com HEPES contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 2
212 µg/mL de piruvato e 75 µg/mL de gentamicina. Posteriormente, os oócitos
213 foram lavados duas a três vezes no meio de maturação e distribuídos em 4
214 gotas contendo 90 µL de meio de maturação, com uma média de 25 oócitos
215 por gota, cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri (Corning[®])
216 de 35 x 10 mm. O meio de maturação utilizado foi o TCM 199 com bicarbonato
217 contendo 10% de SFB, 2 µg/mL de piruvato, 75 µg/mL de gentamicina, 20
218 µg/mL de FSH (Pluset[®]) e 10 UI/mL de LH (Choriomon[®]). Os meios,

219 preparados com 2 horas de antecedência, foram mantidos a 39 °C em
220 incubadora. A maturação do COCs foi realizada em incubadora a 39 °C (5 %
221 de CO₂ em ar), durante 22 - 24 horas.

222

223 *Preparo do sêmen e fertilização in vitro*

224

225 O descongelamento do sêmen foi realizado em água a 37 °C por 30
226 segundos. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a superfície do gradiente
227 de Percoll com densidade descontínua (2 mL a 45% sobre 2 mL a 90%) em
228 tubo cônico de 15 ml e centrifugado a 900 X g por 30 minutos.

229 Durante a centrifugação do sêmen, os oócitos já maturados foram
230 lavados três vezes no meio TCM 199 com HEPES e uma vez no meio de
231 fertilização, antes de serem transferidos para gotas do mesmo meio
232 (fertilização) cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri de 35
233 mm x 10 mm.

234 Após a centrifugação, os espermatozoides viáveis obtidos do sedimento
235 foram submetidos à avaliação de motilidade e concentração (câmara de
236 Neubauer) e diluídos em volume apropriado do meio de fertilização para se
237 obter uma concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL.

238 Em seguida, foi realizada a fertilização dos oócitos utilizando 10 µL de
239 sêmen diluído por gota. O processo de fertilização foi realizado por um período
240 de 10 a 12 horas a 39 °C em 5% de CO₂ em ar. O meio de fertilização era
241 composto por TALP-FIV suplementados com 6 mg/mL BSA livre de ácidos
242 graxos, 2 µL/mL de piruvato, 75 µg/mL de gentamicina, 11 µg/mL de heparina e
243 44 µL/mL de solução de Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina (PHE).

244 Foram utilizados seis touros diferentes para cada uma das duas raças, a
245 fim de minimizar a influência do touro. Em cada ensaio foram utilizadas duas
246 palhetas de sêmen para cada raça de touro.

247

248 *Desnudamento e cultivo in vitro dos embriões*

249

250 De 10 a 12 horas após a fertilização (hpi), os prováveis zigotos foram
251 transferidos do meio de fertilização para o meio TCM 199 com HEPES já
252 descrito anteriormente em tubos cônicos, os quais foram submetidos à agitação

253 no vórtex (Phoenix[®], AP-56) a 3000 rpm por 3 a 5 minutos para remover as
254 células do *cumulus* circundante e os espermatozóides associados. Em seguida,
255 os prováveis zigotos foram lavados em meio TCM 199 com HEPES e por
256 último, em meio de cultivo, sendo então transferidos para gotas de meio de
257 cultivo de 90 µL (20 a 25 oócitos por gota), cobertas com óleo mineral, em
258 placas de Petri de 35 mm. Utilizou-se o meio de cultivo SOF (“synthetic oviduct
259 fluid”; [51]), livre de SFB, acrescidos de BSA (5%) e piruvato de sódio (0,2%).

260 Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas
261 em sacos plásticos contendo uma mistura gasosa de 5 % de O₂, 5 % de CO₂ e
262 90 % de N₂ (White Martins, São Paulo, SP, Brasil). As trocas parciais do meio
263 de cultivo foram realizadas a cada 48 horas, quando foram retirados 50 µL de
264 meio já presente juntamente com estruturas degeneradas, e acrescentados 50
265 µL de meio de cultivo fresco em cada gota.

266

267 **Grupos experimentais**

268

269 Após o desnudamento (10 hpi) os embriões foram distribuídos em dois
270 grupos experimentais. No grupo controle, foram cultivados em temperatura
271 constante de 39 °C. No grupo ET, os embriões foram submetidos a estresse
272 térmico de 41 °C (96 hpi), por 9 horas e a seguir voltaram para o cultivo a
273 temperatura de 39 °C.

274 Nos grupos controle e ET, os embriões, 168 hpi, foram retirados do meio
275 de cultivo, formando-se “pools” com 5 embriões em cada grupo experimental
276 que foram submetidos ao protocolo de extração de RNA, armazenados a –80
277 °C, para posterior utilização da técnica de (RT), seguida por PCR em Tempo
278 Real, para a investigação da expressão gênica dos RNAm de alguns membros
279 do sistema IGF (IGF-I, IGF-II, IGFR-I, IGFR-II, IGFBP-2, 4 e PAPP-A) em
280 embriões Nelore e HPB.

281

282 **Avaliação e análise dos dados de PCR em tempo real**

283

284 Para avaliação da expressão gênica de IGF-I, IGF-II, IGFR-I, IGFR-II,
285 IGFBP-2 e 4 e PAPP-A em oócitos e blastocisto utilizou-se o protocolo de
286 amplificação do “kit” Power Sybr Green Master Mix[®] – Applied Biosystems. A

287 expressão do RNAm do gene constitutivo ciclofilina A (CYC-A) foi utilizada
288 como normalizadora da expressão dos genes alvo.

289 As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, as
290 quais continham 12,5 µl de Power Sybr Green Master Mix® - Applied
291 Biosystems, 1µl de cDNA (para CYC-A) ou 2 µl (para os genes relacionados ao
292 sistema IGF) e oligonucleotídeos iniciadores bovino-específico para completar
293 o volume final de 25 µl.

294 A análise dos dados foi feita pela estimativa da eficiência de
295 amplificação de cada amostra em questão utilizando o software “LinRegPCR”
296 [52] que considera a eficiência com base na curva de amplificação individual de
297 cada tubo. No mínimo 4 pontos de cada curva de amplificação na fase
298 exponencial foram delimitados e a média desses valores determinou o limiar
299 para cada gene. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das
300 eficiências individuais de cada tubo para cada tipo celular analisado.

301 Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela
302 frequência de expressão daquele que foi considerado o melhor controle
303 endógeno, o qual neste caso foi a CYC-A. A expressão relativa dos genes
304 analisados foi determinada pelo método de Pfaffl [53].

305

306 **Análise estatística**

307

308 Para testar o efeito da raça e do ET sobre a expressão dos genes alvo
309 em “pools” de oócito e blastocisto, foi realizada a seguinte sequência de
310 análise: 1) teste de normalidade dos dados e de homogeneidade de variâncias
311 entre grupos com transformação para logaritmos quando necessário para
312 realização de análise paramétrica; 2) a análise do efeito dos tratamentos sobre
313 os níveis de RNAm dos genes alvos foi realizado por ANOVA, com utilização
314 de teste *a posteriori*, quando necessário. As análises foram realizadas
315 utilizando-se o programa JMP [54]. A comparação das médias dos níveis de
316 RNAm dos genes alvos entre as raças foi realizada, respectivamente,
317 utilizando-se teste t ou teste de Man-Whitney, quando os dados tinham ou não
318 normalidade. As médias das expressões gênicas foram comparadas por
319 contraste ortogonal.

320

321 **Resultados**

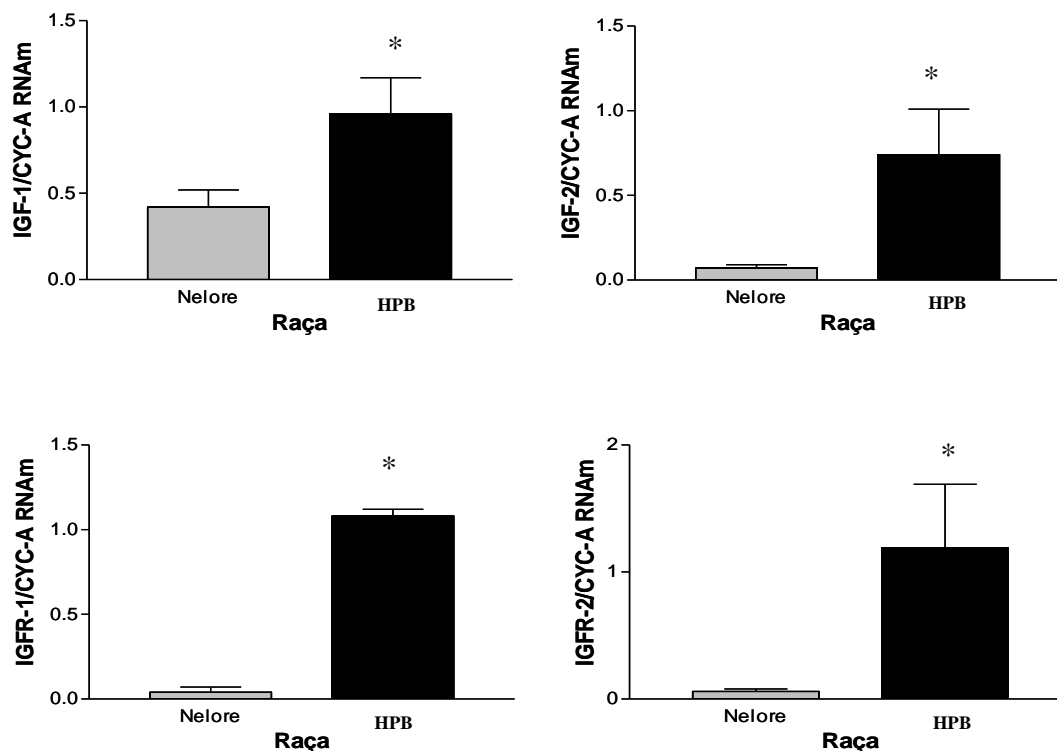
322

323 **Expressão do RNAm dos genes do sistema IGF em oócitos**

324

325 Os valores relativos (média \pm EPM) da expressão gênica dos IGF-I e II,
 326 de seus receptores (IGFR-I e II; figura 1) e das IGFBP-2 e 4 (figura 2) foi maior
 327 nos “pools” de oócitos provenientes de ovários de vacas HPB do que nos
 328 óocitos de vacas da raça Nelore ($p < 0,01$). Entretanto, a expressão gênica da
 329 PAPP-A (figura 3) teve maiores níveis de expressão do RNAm nos “pools” de
 330 oócitos provenientes de vacas da raça Nelore, quando comparados aos oócitos
 331 de HPB ($p < 0,05$).

332



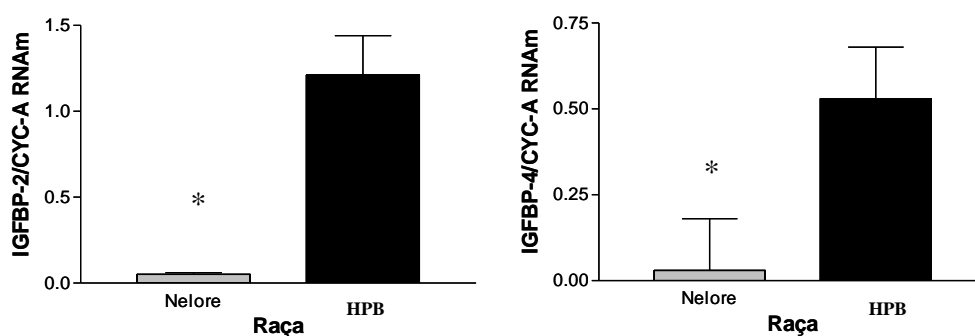
333

334 Figura 1. Expressão gênica de IGF-I e II e seus receptores nos “pools” de oócitos
 335 provenientes de ovários de vacas das raças Nelore e Holandesa Preto e Branco (HPB).

336 * $p < 0,05$

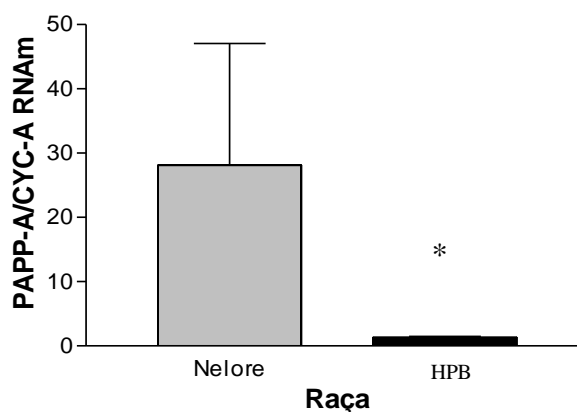
337

338
339
340
341
342
343
344
345
346



347 Figura 2. Expressão gênica das IGFBP-2 e 4 nos “pools” de oócitos provenientes de
348 ovários de vacas das raças Nelore e Holandesa Preto e Branco (HPB). * $p < 0,05$
349

350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361



362 Figura 3. Expressão gênica de PAPP-A nos “pools” de oócitos provenientes ovários de
363 vacas das raças Nelore e Holandesa Preto e Branco (HPB). * $p < 0,05$
364

365 Expressão do RNAm dos genes do sistema IGF em blastocistos

366
367
368
369
370

Os valores relativos (média \pm EPM) da expressão gênica do IGF-I foram maiores ($p < 0,05$) em “pools” de blastocistos submetidos ao ET (41 °C), tanto na raça Nelore quanto na HPB, sendo este aumento mais evidente na raça Nelore (figura 4).

371
372
373
374
375

Além disso, os valores relativos (média \pm EPM) das expressões gênicas das IGFBP-2 e 4 foram mais elevados ($p < 0,05$) em “pools” de blastocisto provenientes de vacas da raça HPB submetidos ao ET, quando comparados aos provenientes de vacas da raça Nelore ou HPB controle (figura 5). Entretanto, não houve expressão gênica do IGF-II, dos IGFR-I e II e da

376 PAPP-A nos “pools” de blastocisto, tanto de vacas da raça Nelore quanto HPB,
 377 submetidos ou não ao ET.

378

379

380

381

382

383

384

385

386

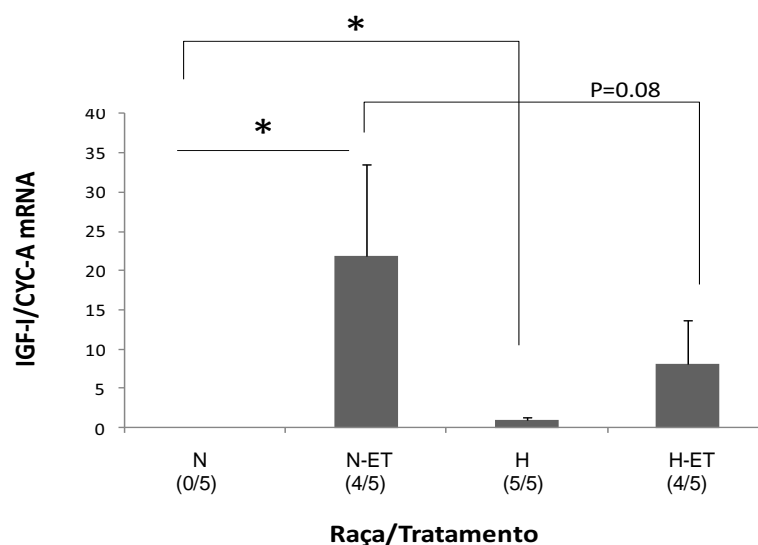
387

388

389

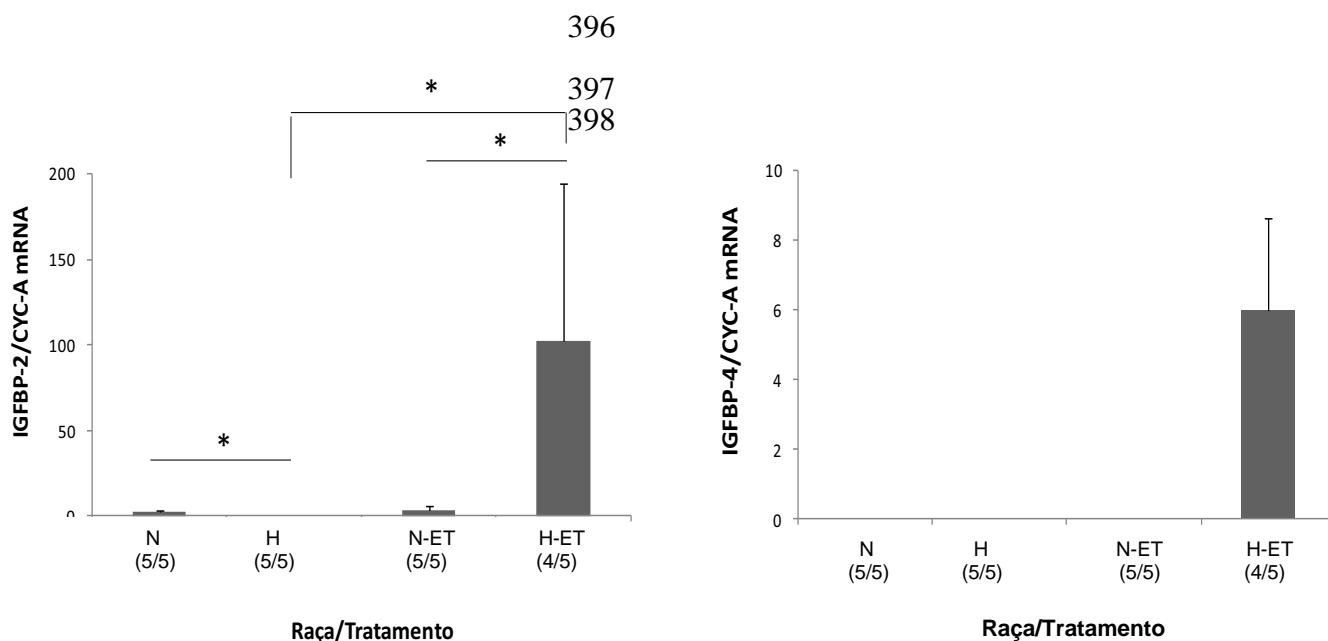
390

391



392 Figura 4. Expressão gênica do IGF-I em “pools” (n=5) de blastocistos provenientes de
 393 ovários de vacas das raças Nelore (N) e Holandesa Preto e Branco (H), submetidos ou
 394 não ao estresse térmico (ET). *p<0,05

395



399

400 Figura 5. Expressão gênica das IGFBP-2 e 4 em “pools” (n=5) de blastocistos
 401 provenientes de ovários de vacas das raças Nelore (N) e Holandesa Preto e Branco
 402 (H), submetidos ou não ao estresse térmico (ET). *p<0,05

403

404 **Discussão**

405

406 **Expressão do RNAm dos genes do sistema IGF em oócitos**

407

408 Os valores relativos da expressão gênica dos ligantes do sistema IGF,
409 de seus receptores e das proteínas ligantes de IGF (IGFBPs 2 e 4) foram
410 maiores nos “pools” de oócitos provenientes de ovários de vacas HPB do que
411 nos óocitos de vacas da raça Nelore. Entretanto, a expressão gênica da
412 enzima proteolítica das IGFBPs (PAPP-A) foi mais elevada nos “pools” de
413 oócitos provenientes de vacas da raça Nelore, quando comparados aos oócitos
414 HPB.

415 Considerando que a PAPP-A, principal responsável pela degradação
416 das IGFBPs [55], é mais expressa em oócitos Nelore e que as IGBPs
417 (predominantes na raça HPB) estão associadas a menor biodisponibilidade de
418 IGF [55], os resultados do presente estudo indicam uma maior
419 biodisponibilidade de IGF em oócitos da raça Nelore, quando comparados aos
420 da raça HPB. Este aumento de biodisponibilidade IGF pode influenciar
421 positivamente a competência oocitária [24, 56] e a qualidade dos embriões [24,
422 33].

423 Vários autores demonstraram que o sistema IGF desempenha
424 importante papel na foliculogênese, participando do crescimento, dominância,
425 desvio e maturação folicular [57-61] e oocitária [61-64]. Os IGFs são sinérgicos
426 ao FSH na promoção de crescimento folicular e produção de estradiol [57]. O
427 aumento nas concentrações intrafoliculares de estradiol está relacionado à
428 dominância folicular [65]. O folículo dominante, no momento do desvio folicular,
429 produz altas concentrações de estradiol que, em conjunto com a inibina,
430 continuam o decréscimo nas concentrações de FSH [65]. Após o desvio
431 folicular, somente o folículo dominante é capaz de utilizar baixas concentrações
432 de FSH [65] devido ao sinergismo com o sistema IGF, aumentando, desta
433 forma, as concentrações intrafoliculares de estradiol e, conseqüentemente, o
434 diâmetro folicular [57].

435 A primeira diferença que se observou entre o futuro folículo dominante e
436 os subordinados foi a maior síntese de PAPP-A induzida pelo FSH, com a
437 subsequente diminuição das concentrações das IGFBP 4 e 5 pela degradação

438 proteolítica [57, 66-68]. A baixa concentração de IGFBP 4 e 5 permite que
439 grande quantidade de IGF-I esteja biodisponível para promover o crescimento
440 folicular, amplificando os efeitos do FSH e a síntese de estradiol [57].

441 De forma semelhante, Austin *et al.* [69] propuseram que as primeiras
442 mudanças intrafoliculares que distinguem o folículo destinado a tornar-se
443 dominante dos outros folículos em crescimento seria a capacidade aumentada
444 em produzir estradiol e a manutenção de baixos níveis de IGFbps. Portanto, o
445 sistema IGF parece desempenhar papel crítico no desvio folicular e na
446 aquisição de dominância pelo folículo [57].

447 A viabilidade e o grau de capacitação atingido por um folículo são, em
448 grande parte, refletidos pela composição bioquímica do fluido presente em sua
449 cavidade antral. Os produtos resultantes do metabolismo das células do
450 “*cumulus oophorus*”, da granulosa mural, e mesmo da teca são difundidos pelo
451 fluido folicular, fornecendo um panorama da atividade esteroideogênica e da
452 biodisponibilidade de fatores de crescimento. Estudos em folículos bovinos
453 demonstraram que existe uma forte relação entre as concentrações de IGF-I
454 livre e de estradiol presentes no fluido folicular e a capacidade desses folículos
455 atingirem a dominância e a capacitação final préovulação [56, 65, 67-70].

456 Além disso, componentes do sistema IGF expressos em oócitos
457 participam acelerando o processo de maturação nuclear e favorecendo a
458 competência oocitária [61-64, 71]. Deste modo, como dito anteriormente, a
459 maior biodisponibilidade de IGF-I observada na raça Nelore pode contribuir
460 para a melhor qualidade oocitária observada nesta raça em relação à HPB,
461 influenciando positivamente o seu desenvolvimento embrionário [72-74].

462 De fato, Lonergan *et al.* [24] observaram que a expressão de IGF-I foi
463 maior em embriões que apresentaram a primeira divisão celular antes de 36
464 hpi, quando comparados a embriões que clivaram tardiamente (após 36 hpi) e
465 sugeriram que a expressão dos membros do sistema IGF pode ser utilizada
466 como um indicador de qualidade oocitária e embrionária [75].

467

468 **Expressão do RNAm dos genes do sistema IGF em blastocisto**

469

470 Embora não tenha sido detectada expressão gênica de IGF-I em
471 blastocisto da raça Nelore do grupo controle (39 °C), o ET induziu aumento na

472 expressão de IGF-I tanto na raça Nelore quanto na HPB, sendo este aumento
473 mais evidente na raça Nelore.

474 Existem controvérsias na literatura em relação à expressão gênica de
475 IGF-I em blastocistos bovinos em condições normais de desenvolvimento.
476 Alguns autores não detectaram [23, 30, 76-79] enquanto outros encontraram
477 expressão gênica do IGF-I [22, 24, 34, 35].

478 A redução na quantidade de transcritos do sistema IGF à medida que o
479 embrião se desenvolve é uma característica normal em embriões bovinos [80-
480 82] e ocorre devido a inibição da transcrição até o estágio de 8-16 células e
481 também pela degradação do RNAm materno ao longo do desenvolvimento
482 embrionário [83]. Corroborando estes resultados, Bonilla *et al.* [48] observaram
483 maior expressão de RNAm do IGFR-I em embriões de duas células, quando
484 comparado aos de cinco células. De forma similar, Foulstone *et al.* [84]
485 demonstraram que a expressão de RNAm para moléculas-chave da cascata de
486 sinalização de IGF (RAF1, MAPK e PI3) foi maior em embriões de duas
487 células.

488 No presente trabalho não foram detectadas expressões gênicas do IGF-
489 II, IGFR-I e II bem como da PAPP-A nos “pools” de blastocisto em ambas as
490 raças. A ausência dos IGF-II, IGFRs e PAPP-A talvez possa ser explicada pelo
491 número de blastocistos utilizados para a formação dos “pools” (5 blastocistos
492 em cada “pool”) quando comparada a outros trabalhos, onde os “pools”
493 continham número mais elevado de blastocistos (20 a 100 blastocistos; [22, 24,
494 35, 75, 81, 85]).

495 Outra possível explicação para a discrepância nos resultados das
496 expressões gênicas encontradas no presente experimento e de outros autores
497 seria o método de obtenção dos oócitos. Neste trabalho foram utilizados
498 blastocistos provenientes de oócitos obtidos por OPU, enquanto que em outros
499 trabalhos, foram obtidos de matadouro.

500 Existem indicações que oócitos obtidos por OPU são de pior qualidade
501 quando comparados aos de matadouro [86, 87]. Dados não publicados obtidos
502 em nosso laboratório indicam menor produção de blastocisto com oócitos
503 oriundos de OPU, quando comparados aos obtidos de matadouro [25% (n=
504 103 oócitos) vs 36% (n = 162 oócitos), respectivamente]. Assim sendo, é
505 possível que estes blastocistos, oriundos de oócitos aspirados por OPU,

506 expressem o sistema IGF de forma menos evidente que os blastocistos
507 provenientes de ovários de matadouro.

508 Como dito anteriormente, a expressão de IGF-I em blastocistos
509 submetidos ao ET foi mais elevada na raça Nelore quando comparada aos da
510 raça HPB. Além disso, o ET induziu aumento na expressão gênica dos IGFBPs
511 2 e 4 apenas nos blastocistos da raça HPB, não sendo observado o mesmo na
512 raça Nelore. Considerando que os IGFBPs estão associados a uma diminuição
513 da biodisponibilidade de IGF [55], os resultados acima indicam uma maior
514 biodisponibilidade de IGF causada pela baixa expressão de IGFBPs, o que
515 poderia contribuir para uma maior tolerância ao ET de embriões da raça
516 Nelore, quando comparados aos da raça HPB.

517 De fato, estes dados estão de acordo com outras publicações que
518 demonstraram que a adição de IGF-I ao meio de cultivo de embriões
519 submetidos ao ET reduz a incidência de apoptose embrionária em bovinos 19,
520 [43-46, 88-90] bem como aumenta a taxa de produção de blastocistos [40, 46-
521 48, 88-94].

522 Dentre as explicações para os efeitos benéficos e termoprotetores do
523 uso de IGF-I na produção de embriões, pode-se destacar a maior absorção de
524 glicose pelo embrião durante seu desenvolvimento inicial [95], o aumento da
525 síntese protéica, do metabolismo embrionário e da proliferação celular [96], o
526 aumento da transcrição de alguns genes envolvidos com o desenvolvimento
527 embrionário (Desmocolin II - formação e expansão do blastocisto [97, 98]; Na/K
528 - controle de fluidos da blastocèle [98] e formação de junções celulares [99]), o
529 aumento da síntese das proteínas do choque térmico (HSP [17, 100-101]), bem
530 como a transcrição de alguns genes antiapoptóticos [102].

531 Em suma, ao comparar-se a raça Nelore com HPB, observou-se que em
532 óocitos a expressão gênica do sistema IGF (ligantes, receptores e IGFBPs) foi
533 mais acentuada na raça HPB do que na Nelore, entretanto, a expressão de
534 PAPP-A foi muito maior na raça Nelore, promovendo uma maior
535 biodisponibilidade de IGF livre. Por outro lado, em blastocistos, o estresse
536 térmico provocou maior aumento na expressão gênica de IGF-I na raça Nelore
537 e aumento na expressão gênica das IGFBP-2 e 4 apenas na raça HPB.

538 Embora não tenha sido investigada a expressão protéica, estes
539 resultados sobre expressão gênica indicam que a maior biodisponibilidade de

540 IGF em oócitos e blastocistos de vacas da raça Nelore pode contribuir para a
541 maior tolerância desta raça ao estresse térmico, quando comparada à HPB.

542

543 Referências

544

- 545 1. Associação dos Criadores de Nelore do Brasil (ACNB), 2006, www.nelore.org.br.
- 546 2. Barros CM, Nogueira MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*
547 2001;56: 1483-1496.
- 548 3. Bo GA, Baruseli PS, Martinez MF. Patern and manipulation of follicular development.
549 *Anim Reprod Sci* 2003;78: 307-326.
- 550 4. Hansen PJ. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim*
551 *Reprod Sci* 2004;82-83: 349-360.
- 552 5. Barros CM, Pegorer, MF, Vasconcelos, JL, Eberhardt, BG, Monteiro, FM. Importance of
553 sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated
554 temperatures. *Theriogenology* 2006;65: 210-218.
- 555 6. Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula Lopes FF, al-Katanani YM, Krininger III CE,
556 Chase, CC Jr. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies
557 for mitigation. *Theriogenology* 2001;55: 91-103.
- 558 7. Thatcher WW, Hansen, PJ. Environment and reproduction. In: *Reprod Domest Anim*
559 *Amsterdam: Elsevier World Animals Science Series* 1993;9: 433-457.
- 560 8. Ealy AD, Drost M, Hansen PJ. Developmental changes in embryonic resistance to adverse
561 effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci* 1993;76: 2899-2905.
- 562 9. McDowell RE, Lee, DHK., Fohrman, MH. The relationship of surface area to heat
563 tolerance in Jersey and Sindhi – Jersey (F1) crossbred cows. *J Anim Sci* 1953;12: 747-756.
- 564 10. Finch VA. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the
565 tropics. *J Anim Sci* 1986;62: 531-542.
- 566 11. Gaughan JB, Mader TL, Holt SM, Josey MJ, Rowan KJ. Heat tolerance of Boran and Tuli
567 crossbred steers. *J Anim Sci* 1999;77: 2398-2405.
- 568 12. Hammond AC, Chase JR CC, Bowers EJ, Olson TA, Randel RD. Heat tolerance in Tuli-,
569 Senepol-, and Brahman-sired F1 Angus heifers in Florida. *J Anim Sci* 1998;76: 1568-1577.
- 570 13. Lane M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*.
571 *Theriogenology* 2001;55: 225-236.
- 572 14. Paula Lopes FF, Hansen PJ. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine
573 embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol Reprod* 2002;66: 1169-1177.
- 574 15. Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel
575 W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus*
576 but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 1998;49: 657-665.
- 577 16. Al-Katanani YM, Hansen PJ. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the
578 role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Mol Reprod Dev* 2002;62: 174-
579 180.
- 580 17. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat
581 shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update* 2000;6: 149-159.
- 582 18. Jousan FD, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine
583 preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol Reprod* 2004;71: 1665-1650.

- 584 19. Jousan FD, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine
585 preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic
586 actions requiring PI3K signaling. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 189-196.
- 587 20. Spicer LJ, Echternkamp SE. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with
588 an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 1995;12: 223-245.
- 589 21. Geisert RD, Lee CY, Simmen FA, Zavy MT, Fliss AE, Bazer FW, Simmen RC.
590 Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, -II, and insulin-like
591 growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early
592 pregnancy. *Biol. Reprod* 1991;45: 975-983.
- 593 22. Schimdt A, Einspanier R, Amselgruber W, Si Nowatz F, Schams D. Expression of insulin-
594 like growth factor- I (IGF-I) in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Exp Clin*
595 *Endoc* 1994;102: 364-369.
- 596 23. Brigstock DR, Kim GY, Steffen CL, Liu A, Vegunta RK, Ismail NH. High molecular mass
597 forms of epidermal growth factor in pig uterine secretions. *J Reprod Fertil* 1996;108: 313-
598 320.
- 599 24. Gabler C, Lauer B, Einspanier A, Schams D, Einspanier R. Detection of mRNA and
600 immunoreactive proteins for acidic and basic fibroblast growth factor and expression of the
601 fibroblast growth factor receptors in the bovine oviduct. *J Reprod Fertil* 1997;109: 213-
602 221.
- 603 25. Yoshida Y, Miyamura M, Hamano S, Yoshida M. Expression of growth factor ligand and
604 their receptor mRNAs in bovine ova during *in vitro* maturation and after fertilization *in*
605 *vitro*. *J Vet Med Sci* 1998;60: 549-554.
- 606 26. Yaseen MA, Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Changes in the
607 relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II)
608 ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived
609 from different *in vitro* systems. *Reproduction* 2001;122: 601-610.
- 610 27. Lonergan P, Gutiérrez-Adán A, Pintado B, Fair T, Ward F, Fuente JD, Boland M.
611 Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its
612 receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts
613 produced *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 2000;57: 146-152.
- 614 28. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, Boland
615 MP. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos
616 cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod* 2003;69: 1424-
617 1431.
- 618 29. Heyner S, Shi C, Garside WT, Smith RM. Functions of the IGFs in early mammalian
619 development. *Mol Reprod Dev* 1993;35: 421-426.
- 620 30. Kaye PL, Harvey MB. The role of growth factors in preimplantation development. *Prog*
621 *Growth Factor Res* 1995;6: 1-24.
- 622 31. Winger QA, de los Rios P, Han VK, Armstrong DT, Hill DJ, Watson AJ. Bovine oviductal
623 and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of
624 "embryotrophic" insulin-like growth factor circuits. *Biol Reprod* 1997;56: 1415-1423.
- 625 32. Luciano AM, Modina S, Gandolfi F, Lauria A, Armstrong DT. Effect of cell-to-cell contact
626 on *in vitro* deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa
627 cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. *Biol Reprod* 2000;63:
628 1580-1585.
- 629 33. Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Insulin-like growth
630 factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr. Rev.*
631 1985;6: 400-420.

- 632 34. Kamada S, Kubota T, Taguchi M, Ho WR, Sakamoto S, Aso T. Effects of insulin-like
633 growth factor-II on proliferation and differentiation of ovarian granulosa cells. *Horm Res*
634 1992;37: 141-149.
- 635 35. Schultz GA, Hogan A, Watson AJ, Smith RM, Heyner S. Insulin, insulin-like growth
636 factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and
637 bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 1992;4: 361-371.
- 638 36. Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE, Schultz GA. Expression of growth factor
639 ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 1992;31:
640 87-95.
- 641 37. Watson AJ, Watson PH, Arcellana-Panlilio M, Warnes D, Walker SK, Schultz GA,
642 Armstrong DT, Seamark RF. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation
643 development. *Biol Reprod* 1994;50: 725-733.
- 644 38. Schüller AG, Zwarthoff EC, Drop SL. Gene expression of the six insulin-like growth factor
645 binding proteins in the mouse conceptus during mid- and late gestation. *Endocrinology*
646 1993;132: 2544-2550.
- 647 39. Sawai K, Kageyama S, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Onoe S. Analysis of
648 mRNA transcripts for insulin-like growth factor receptors and binding proteins in bovine
649 embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 2005;7: 189-198.
- 650 40. Lighten AD, Moore GE, Winston RML, Hardy K. Routine addition of human insulin-like
651 growth factor-1 ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. *Human Reprod*
652 1998;13: 3144-3150.
- 653 41. Herrler A, Krusche CA, Beier HM. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit
654 blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol Reprod* 1998;59: 1302-1310.
- 655 42. Fabian D, Il'kova G, Rehak P, Czikkova S, Baran V, Koppel J. Inhibitory effect of IGF-I
656 on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*
657 2004;61: 745-755.
- 658 43. Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Insulin and insulin-like growth
659 factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *J Vet Med*
660 *Sci* 1995;57: 1109-1111.
- 661 44. Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillo P. Role of
662 epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo
663 development *in vitro*. *Biol Reprod* 1996;54: 1420-1429.
- 664 45. Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Regulation of apoptosis in the bovine
665 blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev*
666 2002;62: 489-495.
- 667 46. Makarevich AV, Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos
668 stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biol*
669 *Reprod* 2002;66: 386-392.
- 670 47. Block J, Wrenzycki C, Niemann H, Herrmann D, Hansen PJ. Effects of Insulin-Like
671 Growth Factor-I on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced *in*
672 *vitro*. *Mol Reprod Dev* 2008;75: 895-903.
- 673 48. Bonilla AQ, Oliveira LJ, Ozawa M, Newsom EM, Lucy MC, Hansen PJ. Developmental
674 changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation
675 bovine embryo. *Mol Cell Endocrinol* 2011;332: 170-179.
- 676 49. Eberhardt BG, Satrapa RA, Capinzaiki CR, Trinca LA, Barros CM. Influence of the breed
677 of bull (*Bos taurus indicus* vs *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*,
678 *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Anim*
679 *Reprod Sci* 2009;114: 54-61.

- 680 50. Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine derived *in vitro* or
681 *in vivo*. Biol Reprod 2000;62: 847-856.
- 682 51. Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst
683 development in a static *in vitro* production system using sofaa medium supplemented with
684 sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology 1999;52:
685 683-700.
- 686 52. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of
687 quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett 2003;339:62-6.
- 688 53. Pfaffl MW, Georgieva TM, Georgiev IP, Ontsouka E, Hageleit M, Blum JW. Real-time
689 RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2
690 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1,2 and 3 in the
691 bovine species. Domest Anim Endocrinol 2002;22:91-102.
- 692 54. SAS: Statistical Analysis System. A user's guide. SAS Institute C, version 9.1.3.,
693 2002/2003.
- 694 55. Monget P, Mazerbourg S, Delpuech T, Maurel MC, Manière S, Zapf J, Lalmanach G,
695 Oxvig C, Overgaard MT. Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-
696 like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and
697 porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of
698 IGFBP-2 degradation. Biol Reprod 2003;68: 77-86.
- 699 56. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Ginther OJ. Follicle selection in cattle: dynamics of
700 follicular fluid factors during development of follicle dominance. Biol Reprod 2002;66:
701 120-126.
- 702 57. Fortune, J.E., Rivera, G.M., Yang, M.Y. Follicular development: the role of the follicular
703 microenvironment in selection of the dominant follicle. Anim. Reprod. Sci., v.82-83,
704 p.109-126, 2004.
- 705 58. Gutiérrez-Adán A, Oter M, Martínez-Madrid B, Pintado B, De La Fuente J. Differential
706 expression of two genes located on the x chromosome between male and female *in vitro*
707 produced bovine embryos at the blastocyst stage. Mol Reprod Dev 2000; 55:146-151.
- 708 59. Louhio H, Hovatta O, Sjoberg J, Tuuri T. The effects of insulin, and insulin-like growth
709 factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. Molecular Human
710 Reproduction 2000;6: 694-698.
- 711 60. Zhao J, Taverne MA, van der Weijden GC, Bevers MM, Van den HR. Insulin-like growth
712 factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. Molecular
713 Reproduction and Development 2001;58: 287-296.
- 714 61. Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H. Growth, antrum formation, and estradiol
715 production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. Biology of
716 Reproduction 2002;67: 1099-1105.
- 717 62. Walters KA, Binnie JP, Campbell BK, Armstrong DG, Telfer EE. The effects of IGF-I on
718 bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent.
719 Reproduction 2006;131: 515-23.
- 720 63. Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear
721 maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth
722 factor and insulin-like growth factor I. Journal of Reproduction and Fertility 1994;101:
723 697-701.
- 724 64. Sirotkin AV, Dukesova J, Makarevich AV, Kubek A, Bulla J. Evidence that growth factors
725 IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via
726 intracellular protein kinase A. Reproduction, Nutrition, Development 2000;40: 559-569.

- 727 65. Ginther, O.J., beg, M.A., Bergfelt, D.R., Donadeu, F.X., Kot, K. Follicle selection in
728 monovular species. Biol. Reprod., v.65, p.638-647, 2001.
- 729 66. Mazerbourg, S., Overgaard, T.M., Oxvig, C., Christiansen, M., CONOVER, A.C.,
730 Laurendeau, I., Vidand, M., Tosser-Klopp, G., Zapf, J., Monget, P. Pregnancy-associated
731 plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine and equine ovarian follicles:
732 involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression
733 during follicular development. Endocrinol., v.142, p.5243-53, 2001.
- 734 67. Rivera, G.M., Chandrasekher, Y.A., Evans, A.C.O., Giudice, L.C., Fortune, J.E. A
735 potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the
736 establishment of ovarian follicular dominance in cattle. Biol. Reprod., v.65, p.102-111,
737 2001.
- 738 68. Rivera, G.M., Fortune, J.E. Development of co-dominant follicles in cattle is associated
739 with a follicle-stimulating hormone –dependent insulin-like growth factor binding protein-
740 4 protease. Biol. Reprod., v.65, p.112-118, 2001.
- 741 69. Austin, E.J., Mihm, M., Evans, A.C.O., Knight, P.G., Ireland, J.L.H., Ireland, J.J., Roche,
742 J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of
743 follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. Biol. Reprod., v.64, p.839-
744 48, 2001.
- 745 70. Mihm, M., Austin, E.J., Good, T.E.M., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Roche, J.F., Ireland,
746 J.J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant
747 follicles in heifers. Biol. Reprod., v.63, p.811-19, 2000.
- 748 71. Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL.
749 Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by
750 growth factors *in vitro*. Reproduction. 2002;123:135-42.
- 751 72. Pawshe CH, Rao KB, Totey SM. Effect of insulin-like growth factor I and its interaction
752 with gonadotropins on *in vitro* maturation and embryonic development, cell proliferation,
753 and biosynthetic activity of cumulus–oocyte complexes and granulosa cells in buffalo.
754 Molecular Reproduction and Development 1998;49: 277-285.
- 755 73. Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. Influences of epidermal growth factor
756 and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. Anim Reprod
757 Sci 2003;77: 21-32.
- 758 74. Sirisathien S, Brackett BG. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF
759 and IGF-I. Molecular Reproduction and Development 2003;65: 51–56.
- 760 75. Liu HC, He ZY, Tang YX, Mele CA, Veeck LL, Davis O, Rosenwaks Z. Simultaneous
761 detection of multiple gene expression in mouse and human individual preimplantation
762 embryos. Fertil Steril 1997;67:733-741.
- 763 76. Wang LM, Feng HL, Ma YZh, Cang M, Li HJ, Yan Zh, Zhou P, Wen JX, Bou S, Liu DJ.
764 Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation
765 embryos. Anim Reprod Sci 2009;114: 99-108.
- 766 77. Watson AJ, Westhusin ME, Winger QA. IGF paracrine and autocrine interactions between
767 conceptus and oviduct. J Reprod Fertil Suppl 1999;54: 303-315.
- 768 78. Moore K, Kramer JM, Rodriguez-Sallaberry CJ, Yelich JV, Drost M. Insulin-like growth
769 factor (IGF) family genes are aberrantly expressed in bovine conceptuses produced *in vitro*
770 or by nuclear transfer. Theriogenology 2007;68: 717-727.
- 771 79. Warzych E, Wrenzycki C, Peippo J, Lechniak D. Maturation medium supplements affect
772 transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced
773 *in vitro*. Mol Reprod Dev 2007;74: 280-289.
- 774 80. Thelie A, Papillier P, Pennetier S, Perreau C, Traverso JM, Uzbekova S, Mermillod P, Joly
775 C, Humblot P, Dalbies-Tran R. Differential regulation of abundance and deadenylation of

- 776 maternal transcripts during bovine oocyte maturation *in vitro* and *in vivo*. BMC Dev Biol
777 2007;7: 125.
- 778 81. McHughes CE, Springer GK, Spate LD, Li R, Woods R, Green MP, Korte SW, Murphy
779 CN, Green JA, Prather RS. Identification and quantification of differentially represented
780 transcripts in *in vitro* and *in vivo* derived preimplantation bovine embryos. Mol Reprod
781 Dev 2009;76: 48-60.
- 782 82. Bertolini M, Beam SW, Shim H, Bertolini LR, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB.
783 Growth, development, and gene expression by *in vivo* and *in vitro*-produced day 7 and 16
784 bovine embryos. Mol Reprod Dev 2002;63: 318-328.
- 785 83. Memili E, First NL. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing
786 and mechanisms of early gene expression as compared with other species. Zygote 2000;8:
787 87-96.
- 788 84. Foulstone E, Prince S, Zaccheo O, Burns JL, Harper J, Jacobs C, Church D, Hassan AB.
789 Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. J Pathol
790 2005;205: 145-153.
- 791 85. Rappolee DA, Sturm KS, Behrendtsen O, Schultz GA, Pedersen RA, Werb Z. Insulin-like
792 growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in
793 early mouse embryos. Genes Dev 1992;6: 939-952.
- 794 86. Merton JS, van Dillen JAW, Hasler JF, den Dass JHG. Effect of culture media and CO₂
795 concentration on embryo development in a bovine embryo *in vitro* production system.
796 Theriogenology 1995;43: 280 [Abstract].
- 797 87. Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. Factors
798 affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in
799 the cattle breeding industry. Theriogenology 2003;59: 651-674.
- 800 88. Moreira F, Paula Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. Effects of growth
801 hormone and insulin-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine
802 embryos. Theriogenology 2002;57: 895-907.
- 803 89. Block J, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Ocon OM,
804 Krininger CE 3RD, Liu J, Hansen PJ. Use of insulin-like growth factor-I during embryo
805 culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase
806 pregnancy rates following the transfer of *in vitro*-produced embryos to heat-stressed,
807 lactating cows. J Anim Sci 2003;81: 1590-1602.
- 808 90. Block J, Fischer-Brown AE, Rodina TM, Ealy AD, Hansen PJ. The effect of *in vitro*
809 treatment of bovine embryos with IGF-1 on subsequent development *in utero* to Day 14 of
810 gestation. Theriogenology 2007;68: 153-161.
- 811 91. Palma GA, Müller M, Brem G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high
812 concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. J Reprod
813 Fertil 1997;110: 347-353.
- 814 92. Prella K, Stojkovic M, Boxhammer K, Motlik J, Ewald D, Arnold GJ, Wolf E. Insulin-like
815 growth factor I (IGF-I) and long R(3)IGF-I differently affect development and messenger
816 ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in *in vitro*
817 produced bovine embryos. Endocrinology 2001;142: 1309-1316.
- 818 93. Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. Influences of epidermal growth factor
819 and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. Anim Reprod
820 Sci 2003;77: 21-32.
- 821 94. Lima PF, Oliveira MA, Santos MH, Reichenbach HD, Weppert M, Paula-Lopes FF, Neto
822 CC, Goncalves PB. Effect of retinoids and growth factor on *in vitro* bovine embryos
823 produced under chemically defined conditions. Anim Reprod Sci 2006;95: 184-192.

- 824 95. Pantaleon M, Kaye PL. IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts
825 via IGF-I receptor. *Mol Reprod Dev.* 1996;44: 71-76.
- 826 96. Fleming TP, Garrod DR, Elsmore AJ. Desmosome biogenesis in the mouse preimplantation
827 embryo. *Development* 1991;112: 527–539.
- 828 97. Collins JE, Lorimer JE, Garrod DR, Pidsley SC, Buxton RS, Fleming TP. Regulation of
829 desmocollin transcription in mouse preimplantation embryos. *Development* 1995; 121:
830 743–753.
- 831 98. Watson AJ, Barcroft LC. Regulation of blastocyst formation. *Front Biosci* 2001; 6: 708–
832 730.
- 833 99. Violette MI, Madan P, Watson AJ. Na⁺/K⁺-ATPase regulates tight junction formation
834 and function during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 2006; 289: 406–419.
- 835 100. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. 2001. Heat shock proteins:
836 Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 433-
837 442.
- 838 101. Garrido C, Schmitt E, Cande C, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G. HSP27 and HSP70:
839 Potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* 2003;2: 579-584.
- 840 102. Duan XX, Ou JS, Li Y, Su JJ, Ou C, Yang C, Yue HF, Ban KC. Dynamic expression of
841 apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its
842 relation to apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005;11: 4740-4744.