



Efeito dos períodos seco e chuvoso sobre a maturação nuclear e incidência de apoptose em oócitos ovinos

[effect of dry and rainy seasons on nuclear maturation and incidence of apoptosis in ovine oocytes]

"Artigo Científico/Scientific Article"

FQG Bezerra¹; RM Chaves²; JCF Silva¹; MT Moura¹; PF Lima¹; MAL Oliveira^{1(*)}

¹Laboratório de Biotécnicas da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE, Recife-PE, Brasil

²Laboratório de Reprodução Animal/ UEMA, São Luis-MA, Brasil.

Resumo

Objetivou-se determinar o efeito dos períodos seco e chuvoso na maturação nuclear e incidência de apoptose em oócitos ovinos maturados *in vitro*. Os ovários foram colhidos em abatedouro e transportados para o laboratório durante os períodos seco (Outubro a Março) e chuvoso (Abril a Setembro). Os oócitos foram recuperados de folículos de 2 a 6 mm, selecionados e maturados *in vitro* em 12 réplicas. Após a maturação, o estágio da meiose foi determinado pela coloração DAPI e a apoptose foi avaliada pela atividade das Caspases e pela fragmentação de DNA. As taxas de oócitos nos estádios de vesícula germinativa, metáfase I, telófase I e metáfase II foram semelhantes ($P > 0,05$). A atividade das enzimas Caspases foi mais frequente nos oócitos maturados *in vitro* durante o período seco, embora a incidência de fragmentação do DNA tenha sido semelhante entre os grupos ($P > 0,05$). Em conclusão, os períodos do ano exercem influência na viabilidade dos oócitos ovinos maturados *in vitro* aferida pela incidência da atividade das Caspases.

Palavras-chave: nutrição, sazonalidade, morte celular, reprodução, pequenos ruminantes.

Abstract

This study was aimed to determine the effect of weather season on nuclear maturation and incidence of apoptosis of *in vitro* matured ovine oocytes. The ovaries were collected at a slaughterhouse and transported to the laboratory during the dry (October to March) and rainy periods (April to September). Oocytes were harvested from 2 to 6 mm follicles, selected and *in vitro* matured in 12 replicates. After maturation, meiosis stage was determined by DAPI staining and apoptosis was evaluated by Caspase activity and DNA fragmentation. The frequency of oocytes in Germinal Vesicle, Metaphase I, Telophase I and Metaphase II was similar ($P > 0.05$). Caspase activity was higher in oocytes harvested during the dry period ($P < 0.05$), although DNA fragmentation was similar between groups ($P > 0.05$). In conclusion, the periods of the year exerts influence on ovine oocyte viability inferred by the incidence of Caspase activity.

Key words: nutrition, seasonality, cell death, reproduction, small ruminants.

Introdução

A introdução de raças exóticas tem sido uma alternativa para aumentar o desempenho produtivo dos rebanhos ovinos brasileiros. No entanto, essas raças apresentam

maior susceptibilidade aos efeitos negativos do clima sobre seu desempenho reprodutivo (COSTA et al., 2008). Fatores ambientais como luminosidade, temperatura e umidade tem efeito direto sobre o desempenho

(*) Autor para correspondência/Corresponding author: ¹Laboratório de Biotécnicas da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária/Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bairro Dois Irmãos, Recife-PE, E-mail: maloufrpe@uol.com.br
Recebido em: 20 de setembro de 2013.

Aceito em: 13 de fevereiro de 2014.

reprodutivo de ovinos e outras espécies (AL-KATANANI et al., 2002; CHEMINEAU et al., 2008). Estudos *in vitro* demonstraram que os oócitos são susceptíveis aos efeitos diretos da temperatura elevada, reduzindo a maturação nuclear, a fecundação, e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (ROTH e HANSEN, 2005; JU et al., 2005). A exposição de oócitos bovinos às temperaturas de 40-43° C durante as primeiras 12 horas da maturação *in vitro* (MIV) bloqueou ou reduziu o desenvolvimento embrionário (ROTH e HANSEN, 2004ab; PAYTON et al., 2004).

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

A apoptose é o processo de morte celular programada em que ocorre autodigestão controlada da célula (ROTH e HANSEN, 2004a). A apoptose é observada durante o desenvolvimento de mamíferos e tem um papel importante na eliminação de células danificadas, anormais ou que perderam a função (MEIER et al., 2000). Essa forma de morte celular já foi identificada em células do *cumulus* (KOLLE et al., 2003), oócitos (ROTH e HANSEN, 2004a) e embriões (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002ab).

Dessa forma, a caracterização e a manipulação dos mecanismos envolvidos na indução de apoptose oocitária após o estresse térmico, representam alternativas para minimizar os efeitos negativos da temperatura elevada sobre a capacidade reprodutiva de fêmeas bovinas o que pode se repetir em outras espécies como a ovina.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito dos períodos seco e chuvoso na maturação nuclear e na indução da morte celular por apoptose em oócitos da espécie ovina.

Material e Métodos

Foram utilizados ovários de ovelhas mestiças com idade variando de 12 a 46 meses, colhidos no abatedouro Suimax, localizado na Região Metropolitana do Recife (RMR) (latitude 08° 03' 14" S, longitude 34° 52' 52" W). A temperatura ambiente, mínima e máxima, na seca (Outubro/2007 a Março/2008) foi de 23 e 33° C e na chuvosa (Abril a Setembro/2008) de 18 e 31° C, respectivamente. A pluviosidade mensal média dos cinco pontos de medição na RMR foi de 87,54mm durante o período seco e de 268,92 mm durante o período chuvoso (APAC, 2013). A umidade relativa média do ar foi de 71% no período seco e 85% no período chuvoso (INMET, 2009).

Os ovários foram transportados para o Laboratório de Biotécnica da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em solução fisiológica contendo 30µg mL⁻¹ de sulfato de gentamicina a 30° C até duas horas após o abate.

Os oócitos foram recuperados de folículos de 2 a 6 mm. O conteúdo folicular foi lavado em meio contendo 8,0 mg de bicarbonato de sódio, 45,0 mg de glicose, 5,6 mg de piruvato de sódio, 11,9 mg de HEPES, 2,5 mg de sulfato de gentamicina e 20,0 mg de álcool polivinílico em 50 mL de Sp-TALP.

Os oócitos foram selecionados como descrito por Gonçalves et al. (2008) e lavados três vezes no meio de colheita. Em seguida, os oócitos foram maturados no meio TCM 199 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 µg mL⁻¹ de piruvato de sódio, 2,6 mg mL⁻¹ de bicarbonato de sódio, 50 µg mL⁻¹ de sulfato de gentamicina, 20 µg mL⁻¹ de FSH/LH (Pluset®) e 1 mg mL⁻¹ de álcool polivinílico] sob óleo de parafina com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 39° C durante 24 horas.

Foi utilizado o modelo de estresse calórico descrito por Al-Katanani et al. (2002) para demonstrar o efeito do período do ano na capacidade de desenvolvimento dos oócitos. Neste modelo, os ovários foram colhidos de ovelhas nos períodos seco (Outubro a Março) e chuvoso (Abril a

Setembro). O índice de temperatura e umidade de cada mês foi calculado com base nos dados climáticos obtidos das estações meteorológicas (INMET) estaduais. Os ovários foram classificados de acordo com o número de folículos e os oócitos foram processados separadamente em todos os experimentos.

Oócitos imaturos colhidos foram desnudados e inicialmente processados para determinação da atividade das enzimas Caspases do grupo II com o reagente PhiPhiLux-G₁D₂ (Oncoimmunin[®]). Após a avaliação das Caspases, os oócitos foram fixados em uma solução de 4% de paraformaldeído por uma hora e armazenados em solução de 100 µL de “Phosphate-Buffered Saline” (PBS) com 1 mg mL⁻¹ de “polivinilpirrolidona” (PVP) a 4° C até a realização do ensaio “terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling” (TUNEL) (Paula-Lopes e Hansen 2002a; Roth e Hansen, 2004a).

Parte dos oócitos maturados foi desnudada individualmente para determinação da atividade das enzimas Caspases do grupo II (PhiPhiLux-G₁D₂) e fragmentação de DNA (TUNEL) como descrito acima. Outra parte dos oócitos foi desnudada no Vortex[®], colocados entre lâmina e lamínula e fixados em etanol e ácido acético (3:1) por 12 horas e, posteriormente, corados com orceína acética a 1%, sob aumento de 1000x para avaliação da maturação nuclear. Após a coloração, os oócitos foram classificados como não definido (N.D. - oócitos onde não era possível identificar a fase da meiose); degenerado (Deg.); vesícula germinativa (V.G. - núcleo definido, com ou sem nucléolo, sem

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

A análise estatística foi realizada através de análise de variância pelo método dos quadrados mínimos. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Considerando as medidas tratadas em percentuais procedeu-se o seguinte teste: comparação de variâncias, pelo teste F ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$), equivalentes ou variâncias distintas (SAMPALHO, 2007).

Resultados

O número total de estruturas recuperadas no período seco foi de 1158 oócitos e no chuvoso foi de 1151 oócitos, provenientes de 240 e 286 ovários, respectivamente. Houve um efeito negativo do período chuvoso sobre a qualidade dos oócitos recuperados com qualidade QI, II e IV ($P < 0,05$). Apesar disso, a frequência de oócitos QIII foi semelhante entre os grupos (Tabela 1). Os oócitos maturados tiveram qualidade semelhante entre os períodos ($P > 0,05$). Também não foi verificada diferença ($P > 0,05$) quando comparadas as taxas totais de maturação *in vitro* de oócitos nos períodos seco e chuvoso (Tabela 2).

Tabela 1. Qualidade dos oócitos ovinos imaturos recuperados em dois períodos do ano

Oócitos imaturos	Períodos do ano	
	Seco n / (± s)	Chuvoso n / (± s)
Qualidade I (QI)	175 / 14,58 ± 3,44 ^a	145 / 12,08 ± 2,84 ^b
Qualidade II (QII)	232 / 19,33 ± 3,47 ^a	250 / 20,83 ± 3,53 ^b
Qualidade III (QIII)	302 / 25,16 ± 5,18 ^a	371 / 30,91 ± 4,07 ^a
Qualidade IV (QIV)	265 / 22,08 ± 6,40 ^a	479 / 39,91 ± 9,78 ^b
Total	974 / 100	1245 / 100

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

Tabela 2. Qualidade dos oócitos ovinos recuperados em dois períodos do ano e maturados *in vitro* (MIV)

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

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

Os oócitos submetidos a MIV e classificados como Deg., ND, VG, MI, TI e MII não foram afetados pelo período do ano (P

$> 0,05$). No entanto, o índice de rompimento da VG foi maior na estação seca e AI foi maior no período chuvoso ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do período do ano sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos ovinos

Estádio da Maturação Nuclear	Períodos do ano	
	Seco n / (± s)	Chuvoso n / (± s)
Degenerados (Deg.)	59 / 8,75 ± 1,04 ^a	73 / 9,12 ± 1,32 ^a
Não Definido (ND)	39 / 4,97 ± 2,32 ^a	50 / 5,08 ± 2,46 ^a
Vesícula Germinativa (VG)	23 / 3,55 ± 1,93 ^a	16 / 3,08 ± 2,14 ^a
Rompimento da Vesícula Germinativa (RVG)	58 / 8,93 ± 2,52 ^a	23 / 2,25 ± 2,57 ^b
Metáfase I (MI)	29 / 5,08 ± 1,41 ^a	19 / 3,85 ± 2,95 ^a
Anáfase I (AI)	15 / 2,96 ± 3,05 ^a	34 / 5,25 ± 3,53 ^b
Telófase I (TI)	24 / 4,02 ± 2,25 ^a	19 / 3,89 ± 2,76 ^a
Metáfase II (MII)	469 / 63,44 ± 5,38 ^a	532 / 65,35 ± 4,64 ^a
Total	716 / 100	766 / 100

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

A atividade das Caspases não foi afetada pela estação do ano em oócitos imaturos ($P > 0,05$), embora os oócitos recuperados no período seco tenham apresentado maior incidência de atividade de Caspases (Figura 1).

A porcentagem de oócitos com fragmentação do DNA não foi afetada pelo período do ano ($P > 0,05$) tanto em oócitos imaturos como maturados (Figura 2).

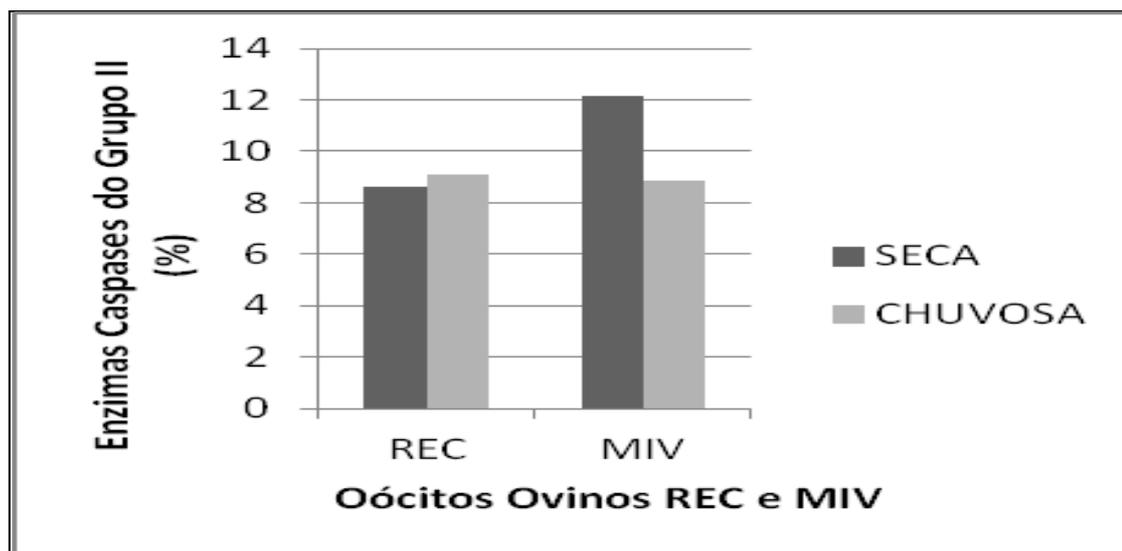


Figura 1: Efeito das estações seca e chuvosa na atividade das enzimas Caspases do grupo II em oócitos imaturos e maturados *in vitro* (MIV) da espécie ovina ($P < 0,05$) pelo teste F.

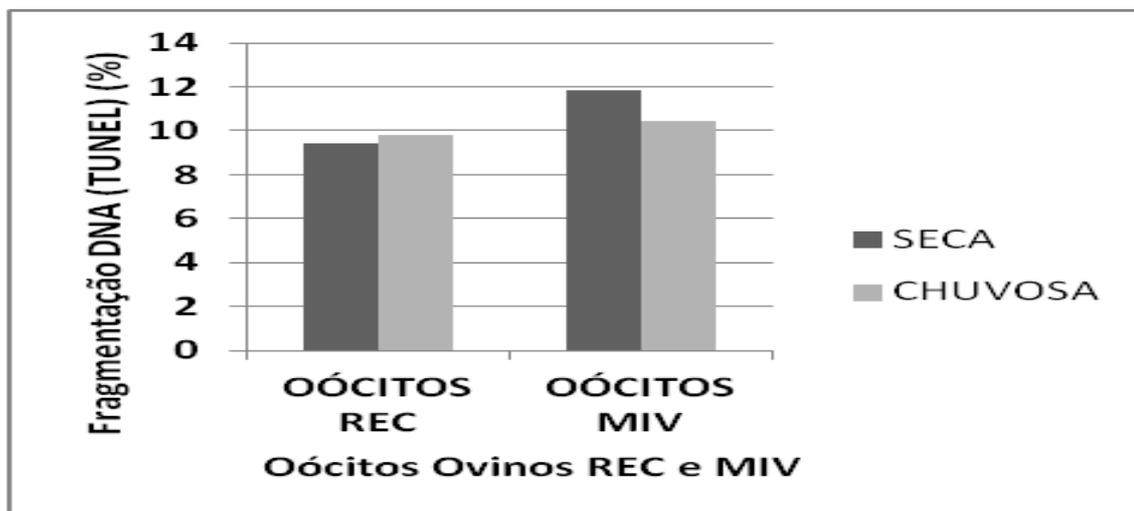


Figura 2: Efeito das estações seca e chuvosa na fragmentação de DNA (TUNEL) de oócitos imaturos e maturados *in vitro* (MIV) da espécie ovina ($P < 0,05$) pelo teste F.

Discussão

Os resultados obtidos na análise da maturação nuclear *in vitro* de oócitos logo após a MIV no período seco e chuvoso diferem dos resultados encontrados por Shirazi e Sadeghi (2007), mostrando que pode ocorrer uma grande variação na espécie, podendo sofrer influências genéticas, nutricionais e estacionais. As taxas de MII obtidas foram inferiores aos resultados obtidos por Shirazi e Sadeghi (2007), que obtiveram baixos percentuais de oócitos desnudos, e Carneiro (2008) pesquisando diferentes concentrações de IGF-1 nos meios de maturação. As maiores taxas de MII obtidas explicam-se, segundo Ledda et al. (2001) e Cecconi et al. (2008), pelo fato de que, em cultivo ocorre uma maior porcentagem de oócitos que completam a maturação devido à presença das células do *cumulus*, apresentando menores porcentagens de oócitos nas fases intermediárias da meiose, favorecendo a maturação oocitária em todas as espécies.

Esta diferença pode ser atribuída à dinâmica folicular ovariana característica dos pequenos ruminantes, como citado por Vinales et al. (2002), quando estudaram as particularidades do ciclo sexual de ovelhas. Desta forma, em qualquer fase do ciclo estral existem folículos em crescimento ou sofrendo

atresia. A atresia dos folículos recrutados ocorre em função da diminuição da concentração plasmática de FSH conforme Adams et al. (1992), e Kruip e Boni (1994), que observaram a ação dos baixos níveis de estradiol intrafolicular induzem o aparecimento do folículo atresico.

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

A condição fisiológica da doadora (peso, raça, idade e variação individual) tem merecido atenção em diversos estudos (VINOLES et al., 2002; FATEHI et al., 2005; Cecconi et al., 2008). Na avaliação da qualidade dos oócitos maturados, obteve-se uma taxa proporcional independente da estação, corroborando com Shirazi e Sadeghi (2007) e Cecconi et al. (2008), que obtiveram altas taxas de maturação em condições especiais de cultivo. Os CCOs de todas as classificações não diferiram na espécie independente da estação. A porcentagem de CCOs QI e QII obtidos foi pequena quando comparado com QIII e QIV, como encontrado por Chaves et al. (2009) onde concluíram que o diâmetro folicular não exerce influência sobre a qualidade do complexo *cumulus oophorus* recuperado de fêmeas ovinas no que aumenta a importância das células do *cumulus*.

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

Estes achados evidenciam que a temperatura ambiente dentro de intervalos fisiológicos pode ser um estímulo para a morte celular programada em oócitos mamíferos, corroborando com Roth e Hansen (2004b), que pesquisaram a competência do desenvolvimento de oócitos bovinos. Uma variedade de outras condições adversas também pode induzir a apoptose oocitária,

incluindo a exposição às drogas quimioterápicas (PEREZ et al., 1997), radiações ionizantes (MORITA et al., 2000), estresse oxidativo (TATEMOTO et al., 2000) e criopreservação (MEN et al., 2003).

No presente estudo, não foram observadas fortes mudanças morfológicas em associação com o aumento da atividade de Caspases. A fragmentação celular nos oócitos observadas por Van Blerkom e Davis (1998) não é sempre um resultado da ativação da caspase e, portanto, é possível que o choque térmico produzido pelo ambiente induza a atividade Caspase e a fragmentação nuclear sem induzir o complemento total de mudanças associadas com a apoptose celular independente da estação do ano. Entretanto, pesquisas adicionais com maior número de repetições em outras regiões são necessárias para validar estes resultados.

Conclusão

Os períodos seco e chuvoso do ano exercem influência sobre a maturação nuclear *in vitro* e na incidência de apoptose em oócitos ovinos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Empresa Suimax por disponibilizar os ovários necessários à execução deste experimento.

Referências

- APAC. Agência Pernambucana de Água e Clima. Disponível em: [HTTP://www.wapac.pe.gov.br/meteorologia](http://www.wapac.pe.gov.br/meteorologia). Acesso em: 06 jan. 2013.
- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.94, p.177-188, 1992. <http://www.reproduction-online.org/content/94/1/177.long>
- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal Dairy Science*. v.85, p.390-396, 2002. <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030202740861.pdf>

- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v.41, p.575-582, 1995. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.1080410109/pdf>
- CARNEIRO, G. F. Biotécnicas da reprodução assistida em pequenos ruminantes. *Tecnologias e Ciência Agropecuária*, v.2, p.23-28, 2008. http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v2_n3_set/tca04_biotecnicas.pdf
- CECCONI, S.; MAURO, A.; CAPACCHIETTI, G.; BERARDINELLI, P.; BERNABÒ, N.; DI VINCENZO, A. R.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. Meiotic Maturation of Incompetent Prepubertal Sheep Oocytes Is Induced by Paracrine Factor(s) Released by Gonadotropin-Stimulated Oocyte-Cumulus Cell Complexes and Involves Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Endocrinology*, v.149, n.1, p.100-107, 2008. <http://endo.endojournals.org/content/149/1/100.full.pdf+html>
- CHAVES, R. M.; AGUIAR FILHO, C. R.; SANTOS JUNIOR, E. R.; ALMEIDA-IRMÃO, J. M.; PAULA, J. T.; SACRAMENTO, L. R.; MELO, R. E.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de ovelhas (*Ovis aries*) e cabras (*Capra hircus*). *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais ... Belo Horizonte: CBRA*, p.468, 2009.
- CHEMINEAU, P.; GUILLAUME, D.; MIGAUD, M.; THIÉRY, J. C.; PELLICER-RUBIO, M. T.; MALPAUX, B. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, Suplemento 2: 40-47, 2008. <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1439-0531.2008.01141.x/asset/j.1439-0531.2008.01141.x.pdf>
- COSTA, R. G.; ALMEIDA, C. C.; PIMENTA, FILHO, E. C.; HOLANDA JUNIOR, E. V.; SANTOS, N. M. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino no Brasil. *Archivos de Zootecnia*, v.57, n.218, p.195-205, 2008. http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/ph/p/img/web/16_17_55_12CaracterizacaoCosta.pdf
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biology of Reproduction*. v.55, p.341-346, 1996. <http://www.biolreprod.org/content/55/2/341.long>
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation to heat shock. *Molecular Reproduction and Development*, v.46, p.138-145, 1997. [http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199702\)46:2%3C138::AID-MRD4%3E3.0.CO;2-R/asset/4_ftp.pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2%3C138::AID-MRD4%3E3.0.CO;2-R/asset/4_ftp.pdf)
- FATEHI, A. N.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E. J.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote*, v.13, n.2, p.177-185, 2005. http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FZYG%2FZYG13_02%2F0967199405003126a.pdf&code=cce445de8e674c9c5695a37a3d8fa71f
- GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (2ª ed.), *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, Editora Roca, São Paulo, p.261-292, 2008.
- INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: http://www.inmet.gov.br/html/prev_climatica_temp_o/prognostico. Acesso em: 23 abr. 2009.
- JU, J. C.; JIANG, S.; TSENG, J. K.; PARKS, J. E.; YANG, X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.64, p.1677-1689, 2005. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05001457>
- KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complexes. *Biology of Reproduction*. v.68, p.1584-589, 2003. <http://www.biolreprod.org/content/68/5/1584.full.pdf+html>
- KRUIP, T. A.; BONI, R. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, v.42, n.4, p.675-684, 1994. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9490384U>
- LEDDA, S.; BOGLIOLO, L.; LEONI, G.; NAITANA, S. Cell Coupling and Maturation-Promoting Factor Activity in Vitro-Matured Prepubertal and Adult Sheep Oocytes. *Biology of Reproduction*, v.65, p.247-252, 2001.

- <http://www.bioreprod.org/content/65/1/247.full.pdf+html>
LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, v.43, p.437-443, 1996.
[http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199604\)43:4%3C437::AID-MRD5%3E3.0.CO;2-Q/asset/5_ftp.pdf?](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/(SICI)1098-2795(199604)43:4%3C437::AID-MRD5%3E3.0.CO;2-Q/asset/5_ftp.pdf?)
MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. *Nature*, v.407, p.796-801, 2000.
<http://www.nature.com/nature/journal/v407/n6805/pdf/407796a0.pdf>
MEN H.; MONSON R. L.; PARRISH J. J.; RUTLEDGE J. J. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology*, v.47, p.73-81, 2003.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224003000701>
MORITA, Y.; PEREZ, G. I.; PARIS, F.; MIRANDA, S. R.; EHLEITER, D.; HAIMOVITZ-FRIDMAN, A.; FUX, Z.; XIE, Z.; REED, J. C.; SCHUCHMAN, E. H.; KOLESNICK, R. N.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nature Medicine*, v.6, p.1109-1114, 2000.
<http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/80442>
PAYTON, R. R.; SAXTON, A. M.; LAWRENCE, J. L.; EDWARD, J. L. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biology of Reproduction*, v.71, p.1303-1308, 2004.
<http://www.bioreprod.org/content/71/4/1303.long>
PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v.295, p.37-42, 2002a.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006291X02006198>
PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of Reproduction*, v.66, p.1169-1177, 2002b.
<http://www.bioreprod.org/content/66/4/1169.long>
PEREZ, G. I.; KNUDSON, C. M.; LEYKIN, L.; KORSMEYER, S. J.; TILLY, J. L. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Natural Medicine*, v.3, p.1228-1332, 1997.
<http://www.nature.com/nm/journal/v3/n11/pdf/nm1197-1228.pdf>
ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*, v.71, p.1898-1906, 2004a.
<http://www.bioreprod.org/content/71/6/1898.full.pdf>
ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*, v.71, p.2072-2078, 2004b.
<http://www.bioreprod.org/content/71/6/2072.full.pdf+html>
ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, v.129, p.235-244, 2005.
<http://www.reproduction-online.org/content/129/2/235.full.pdf+html>
SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada a Experimentação Animal*, 3ª Ed.. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2007. 264 p.
SHIRAZI, A.; SADEGHI, N. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. *Small Ruminant Research*, v.69, p.103-107, 2007.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448806000113>
SUTOVSKY, P.; FLECHON, J.E.; FLECHON, B.; MOTLIK, J.; PEYNOT, N.; CHESNE, P.; HEYMAN, Y. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro of culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biology of Reproduction*, v.49, p.1277-1287, 1993.
<http://www.bioreprod.org/content/49/6/1277.full.pdf>
TATEMOTO, H.; SAKURI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptosis cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*, v.63, p.805-810, 2000.
<http://www.bioreprod.org/content/63/3/805.full.pdf+html>
TILLY, J. L. Commuting the death sentence: how oocyte strive to survive. *Nature Reviews Molecular Cellular Biology*, v.2, p.838-848, 2001.
<http://www.nature.com/nrm/journal/v2/n11/pdf/nrm1101-838a.pdf>
VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. W. DNA strand break and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and culture mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. *Human Reproduction*, v.13, p.1317-1324, 1998.

Bezerra et al.. Efeito dos períodos seco e chuvoso sobre a maturação nuclear e incidência de apoptose em oócitos ovinos.. 30

<http://humrep.oxfordjournals.org/content/13/5/1317>
.long
VINOLES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.;
RUBIANES, E. Ovarian follicular dynamics and

endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Animal Science*, v.74, p.539-545, 2002.