ROBERTA MACHADO FERREIRA

A baixa fertilidade de vacas Holandesas (Bos taurus) repetidoras de serviço durante o estresse térmico está relacionada à sua baixa competência oocitária

São Paulo
2012

ROBERTA MACHADO FERREIRA

A baixa fertilidade de vacas Holandesas (*B. taurus*) repetidoras de serviço durante o estresse térmico está relacionada à sua baixa competência oocitária

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
29/5/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2587
FMVZ

Ferreira, Roberta Machado
A baixa fertilidade de vacas Holandesas (*B. taurus*) repetidoras de serviço durante o estresse térmico está relacionada à sua baixa competência oocitária / Roberta Machado Ferreira. -- 2012.
140 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Fertilidade. 2. Estresse térmico. 3. Repetidoras de serviço. 4. Qualidade oocitária. 5. DNA mitocondrial. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do estresse térmico sobre a qualidade oocitária e a produção *in vitro* de embriões de fêmeas Holandesas (*Bos taurus*) de diferentes categorias", protocolado sob o nº1571/2008, utilizando 192 (cento e noventa e duas) vacas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/03/09.

(We certify that the Research "Effect of heat stress on oocyte quality and *in vitro* embryo production of high producing Holstein females (*Bos Taurus*) of different categories", protocol number 1571/2008, utilizing 192 (one hundred ninety two) cows, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and in the meeting of day 03/18/09).

São Paulo, 20 de março de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

1934 | 2009 USP 75 FMVZ

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERREIRA, Roberta Machado

Título: A baixa fertilidade de vacas Holandesas (*B. taurus*) repetidoras de serviço durante o estresse térmico está relacionada à sua baixa competência oocitária

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Aos meus pais, jóias da minha vida!

As pessoas mais maravilhosas que conheci!

Amor incondicional, apoio total e cumplicidade eterna!

Ao meu noivo, meu amor, meu companheiro,

Pessoa singular, especial e insubstituível em minha vida

Dedico

AGRADECIMENTOS

*À **Deus**, por ter permitido que eu nascesse em uma família tão maravilhosa e cheia de amor.*

*Aos meus **amados pais biológicos, Claudina** e **Roberto**, por terem me concedido a vida e me ensinarem a vivê-la com plenitude, honestidade, entusiasmo e paixão. Por terem me mostrado como ser uma pessoa de princípios, a respeitar todos os indivíduos e ter gratidão. Por patrocinarem meus estudos, projetos e diversões. Saibam que amo vocês com todo meu coração e que tudo que faço é pensando em trazer-lhes orgulho e alegria!!!!!!! AMO MUITO VOCÊS!!!!*

*Aos meus **queridos pais do coração, Eliete** e **tio Chico**, por trazerem alegria às pessoas que mais amo no mundo (meus pais) e cuidarem delas e de mim com tanto carinho e dedicação!!!! Por terem sempre me tratado e amado como filha!!! Vocês são pessoas maravilhosas por quem terei carinho e gratidão eterna!!!*

*Ao **grande amor da minha vida, Junior**. Meu noivo, amigo, companheiro. Minha metade. Obrigada por nunca ter deixado de me amar e de lutar pela nossa felicidade juntos. Por cada olhar de carinho, cada abraço de apoio, cada palavra de conforto. Pelo colo nas horas difíceis, as broncas nas horas certas e o sorriso em cada vitória. Por entender minhas ausências, meus estudos e meu trabalho e me ajudar a seguir nesse caminho que amo. Sem você eu não teria chegado até aqui! TE AMO MUITO!!!!!*

*À **minha família**, por fazerem minha vida ser mais completa e alegre. Por serem meu refúgio e minha luz! O que sou hoje se deve em grande parte aos ensinamentos e ao afeto de vocês!!!!!*

*À **minha nova família** (sogros, cunhados, sobrinhos etc) por sempre terem me tratado com tanto respeito e amor! Por fazerem minha vida ainda mais completa e feliz. É uma grande satisfação fazer parte dessa família! Amo cada um de vocês!*

*Ao meu **querido orientador e amigo Prof. Pietro Baruselli**, um grande exemplo de persistência, caráter, seriedade, serenidade e profissionalismo. Obrigada pelo privilégio de tê-lo como orientador e pela indescritível oportunidade de trabalhar com o senhor. Obrigada por todos os ensinamento e conversas, pela confiança depositada em mim e pelo apoio constante. Não há palavras para descrever a sua importância na minha formação e para expressar minha enorme gratidão pelo senhor. Espero ter colaborado para o crescimento da equipe e ter lhe trazido um pouco de orgulho.*

*Ao meu **orientador do coração e amigo querido Marquinhos** pelos ensinamentos, paciência, apoio e carinho. Pelas importantes sugestões, sempre tão pertinentes. Por se dedicar integralmente ao projeto em todas as suas fases. A admiração por você é muito grande! Conheço poucas pessoas tão completas profissionalmente e tão humanas. Sua paixão pela pesquisa é contagiante e foi fundamental para o sucesso desse projeto. Hoje posso dizer que, além do privilégio de trabalhar com um grande pesquisador, tive a felicidade de ganhar um verdadeiro amigo. Você é especialmente importante na minha vida!*

*Ao meu **co-orientador Prof. Flávio Vieira Meirelles** pela oportunidade de trabalhar em um grupo de pesquisa tão competente e pela colaboração na idealização e desenvolvimento deste projeto.*

*Ao **veterinário e amigo Carlão** que desde o estágio curricular me recebeu com carinho e profissionalismo. Obrigada pelas oportunidades, pelas brincadeiras, pelo apoio constante e pela seriedade nos trabalhos! Obrigada por confiar na minha capacidade e acreditar em mim! Você é muito querido!*

*Ao **grande amigo Márcio Leão e ao Anderson** por aceitarem prontamente os desafios deste projeto com incrível competência profissional e tranquilidade. Sobretudo, obrigada pela amizade! Conviver com vocês é um presente e uma grande alegria.*

*Aos **amigos da Fazenda São Jorge, Santa Rita do Iguaçú e Agrindus**, em especial ao Jorge, Sandro, Marinho e Roberto, por terem aberto as porteiras das suas fazendas para a realização desse trabalho e propiciado um ambiente de trabalho tão agradável.*

*À **amiga Yeda** e a equipe da Vitrogen por viabilizarem parte importante desse trabalho, pela confiança e pelo carinho.*

*Aos **veterinários e amigos da Central Pioneiros**, especialmente ao Flávio, Márcio e Felipe por terem me dado oportunidade de conhecer a região de Carambeí e trabalhar com vocês. Por apoiarem o projeto e colaborarem com o desenvolvimento da pesquisa.*

À **Lagoa da Serra**, especialmente à **Dra. Lúcia** pelo fornecimento das palhetas de sêmen utilizadas nos procedimentos *in vitro* deste projeto. Obrigada pelo incentivo e apoio a tantas pesquisas.

À **Accelerated Genetics e à AxelGen,** especialmente ao Alexandre e ao Edgar pela generosa doação das 600 doses de sêmen empregadas no teste de concepção deste estudo. Obrigada pela confiança e apoio!

À **OuroFino Saúde Animal** pelo fornecimento de todos os hormônios necessários para a execução de todas as fases deste projeto.

Aos **amigos estatísticos Marquinhos, Henderson e Zé Nélio** pelas inúmeras análises e discussões. Por colocarem toda a competência e carinho de vocês em cada "teste rodado" e pela grande ajuda em todas as etapas deste trabalho. Este trabalho é mérito de vocês também!

Aos **queridos tios Sandra e Marco** por mergulharem comigo na "missão tese", por me apoiarem e ajudarem nessa fase tão delicada. Obrigada por me abrigarem incontáveis vezes na casa de vocês, me recebendo sempre de braços abertos, com um grande sorriso no rosto e com tanto amor! Amo vocês!

À **USP** por fornecer subsídios e oportunidades para o meu desenvolvimento profissional e formação acadêmica.

À **Capes** pela concessão da bolsa de doutorado e à **FAPESP** pelo auxílio à pesquisa (Processo nº 2009/00938-3).

Aos **Professores e amigos do Departamento de Reprodução Animal da USP** por todos os ensinamentos nas disciplinas, pelo prazeroso convívio do dia-a-dia e pelas incontáveis conversas e churrascos. Todos vocês foram muito importantes no meu crescimento!

Ao **professor e amigo Milo Wiltbank** por ter me recebido em seu laboratório e depositado tanta confiança em meu trabalho. O tempo que passei em Madson foi muito importante para meu crescimento profissional e pessoal! Obrigada também por todo o carinho! Você tem um lugar especial no meu coração!

Aos **amigos do grupo dos "Pietretes"** da velha guarda, Zélio, Lindsay Japinha, Manolo, Henderson, Gabriel, Alê e Karboxi, e da nova guarda, Kokota, Julinha, Bruno vetboy, Gusss, Presuntinho, Mili e Tomás. Obrigada pelos momentos de aprendizado e diversão. Vencer os desafios diários se torna mais fácil com amigos como vocês. Obrigada por tornarem todos os momentos especiais e com motivos para um bom sorriso! Cada um de vocês marcou de uma forma única e inesquecível!

Às **minhas amigas-irmãs Kokota e Julinha**, por serem como são e me aceitarem como sou! Obrigada por todos os momentos de ternura e apoio, pelas risadas intermináveis, pelas cantorias no carro, pelas trapalhadas constantes, pelo companheirismo e competência no trabalho, pela sinceridade e transparência. Acima de tudo obrigada pela amizade sincera! Amo vocês!

*Às **empresas de produtos veterinários**: OuroFino, Pfizer, Biogênesis-Bagó, Tortuga, MSD, Vallé, Agener e tantas outras que apoiam a pesquisa e colaboram com desenvolvimento da pecuária brasileira.*

*À **todas as pessoas que fizeram e fazem parte de minha vida**, que deixaram um pouquinho de si e levaram um pouquinho de mim!*

*À **todos os animais** pela paciência e por trazerem tanta alegria a nossas vidas! Vocês merecem nosso enorme respeito e admiração!*

"The only way to understanding is through a stage of acknowledged ignorance. You just can`t give up when you are at the confusion stage, because it is when you are very close to the insight stage"

(Milo C. Wiltbank, a great friend)

RESUMO

FERREIRA, R. M. **A baixa fertilidade de vacas Holandesas (*B. taurus*) repetidoras de serviço durante o estresse térmico está relacionada à sua baixa competência oocitária**. [The low fertility of repeat-breeder Holstein (*B. taurus*) cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence]. 2012. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O objetivo desse estudo foi avaliar se a baixa fertilidade de vacas Holandesas repetidoras de serviço [RS; comparativamente a novilhas (NOV) e vacas próximas ao pico de lactação (PL)] está associada com comprometimento da qualidade oocitária e se esta condição é agravada pelo estresse térmico. Fêmeas das três categorias foram tratadas com o mesmo protocolo de sincronização da emergência de onda folicular. Cinco dias após o início do protocolo, a *ovum pick-up* (OPU) foi realizada e foram avaliados (Capítulo; Cap. 1) o número de folículos ovarianos, de oócitos totais e viáveis, temperatura retal (TR), temperatura de superfície cutânea (TC) e frequência respiratória (FR). Os oócitos viáveis foram utilizados para a produção *in vitro* de embriões (Cap. 2) e avaliações biomoleculares (Cap. 3). No Cap. 2, foram avaliados o desenvolvimento embrionário (taxa de clivagem, de blastocisto e de eclosão) e a qualidade dos embriões produzidos (número de células e frequência de núcleos fragmentados). No Cap. 3, realizou-se a extração de RNA e DNA de parte dos oócitos coletados para a quantificação relativa e absoluta de DNA mitocondrial (mtDNA) e a avaliação da expressão de genes relacionados à replicação/transcrição do mtDNA (*PPARGC1A*, *NRF1*, *POLG*, *POLG2*, *TFAM* e *MT-CO1*), à apoptose (*BAX*, *BCL2* e *ITM2B*) e ao estresse térmico (*HSP90AA1* e *HSPA1AB*). No Cap. 4, a taxa de concepção após IATF foi avaliada em ambas as estações do ano e nas três categorias quando o mesmo protocolo de sincronização para IATF e a mesma partida de sêmen foram utilizados. No Cap. 1, vacas RS e PL aumentaram sua FR e TR no verão em relação ao inverno (P<0,0001), enquanto as NOV mantiveram essas variáveis constantes em ambas as estações. Nas três categorias houve aumento (P<0,0001) da TC no verão, mas esta sempre foi superior (P<0,001) em vacas RS e PL do que nas NOV, independente da estação. O número de folículos e de oócitos totais e viáveis declinou nas RS e PL durante o verão, mantendo-se semelhante em NOV em ambas as estações. No Cap. 2, a taxa de clivagem foi semelhante entre categorias e estações. Já a taxa de blastocisto foi reduzida no verão nas três categorias, sendo essa queda mais acentuada nas RS. A taxa de eclosão e o número de células dos blastocistos foram menores no verão (independente de categoria). Menor número de células foi observado em embriões de RS e PL

(independente da estação). Além disso, a porcentagem de núcleos fragmentados foi maior nos blastocistos das RS no verão. No Cap. 3, a expressão de *ITM2B* e *BAX* foi maior em RS durante o verão. Ainda, detectaram-se indícios da ativação de mecanismos pró-apoptóticos nos oócitos de RS (maior relação *BAX/BCL-2*) comparadas a PL e de mecanismos compensatórios da deficiência da função mitocondrial (menor conteúdo de mtDNA e maior expressão de *PPARGCC1*, *NRF1*, *TFAM*, *POLG* e *POLG2*) nas RS durante o verão em relação as demais categorias. No Cap. 4, menor taxa de concepção foi observada em RS e durante o verão. Os resultados geram evidências de que o baixo desempenho reprodutivo de vacas RS durante o verão deva estar relacionado ao comprometimento da qualidade de seus oócitos, demonstrado pelo seu reduzido conteúdo de mtDNA e elevada expressão de genes relacionados a replicação/transcrição do mtDNA, apoptose e síntese de chaperonas, culminado em baixa taxa de blastocisto e alta fragmentação nuclear destes.

Palavras-chave: Fertilidade. Estresse térmico. Repetidoras de serviço. Qualidade oocitária. DNA mitocondrial.

ABSTRACT

FERREIRA, R. M. **The low fertility of repeat-breeder Holstein (*B. taurus*) cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence.** [A baixa fertilidade de vacas Holandesas (Bos taurus) repetidoras de serviço durante o estresse térmico está relacionada à sua baixa competência oocitária]. 2012. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The aims of the present study were to evaluate whether lower fertility of repeat-breeder (RB) Holstein cows [compared to peak lactation cows (PL) and heifers (H)] is associated with oocyte quality and whether this condition is aggravated by summer heat stress. Females of the three categories were treated with same protocol for synchronization of follicular wave emergence during summer and winter. Five days after the protocol onset, the *ovum pick-up* (OPU) was performed. The following variables were evaluated in Chapter 1: number of ovarian follicles before OPU, number of total and viable oocytes, rectal temperature (RT), cutaneous temperature (CT) and respiration rate (RR). Viable oocytes were sent for *in vitro* embryo production (Chapter 2) and bimolecular evaluation (Chapter 3). In Chapter 2, embryo development (rates of cleavage, blastocyst and hatching) and quality (total number of nuclei and frequency of nuclear fragmentation) were assessed. In Chapter 3, part of the oocytes were subjected to DNA and RNA extraction to allow relative and absolute quantification of mitochondrial DNA (mtDNA), and the evaluation of the expression of genes related to mtDNA replication/transcription (*PPARGC1A, NRF1, POLG, POLG2, TFAM* and *MT-CO1*), apoptosis (*BAX, BCL2 and ITM2B*) and heat stress (*HSP90AA1* e *HSPA1AB*). In Chapter 4, RB, PL and H were subjected to same protocol for fixed-time AI using the same batch of semen of a single sire in order to evaluate their P/AI during summer and winter. In Chapter 1, RB and PL had increased ($P<0.0001$) RR and RT during summer compared to winter; while H maintained similar RR and RT in both seasons. CT was greater ($P<0.0001$) during summer than winter in all categories, but it was always higher ($P<0.001$) in RB and PL than H, regardless of season. The numbers of follicles and total and viable oocytes were lower in RB and PL during summer than winter, and maintained stable in H in both seasons. In Chapter 2, cleavage rate was similar among categories and between seasons. However, blastocyst rate was invariably reduced during summer, but more pronouced in RB. Hatching rate and the total number of nuclei were decreased during summer, regardless of category. Lower number of nuclei was observed in RB and PL embryos compared to H, regardless of the season. Furthermore, the percentage of fragmented nuclei was greater in RB blastocysts during the

summer. In Chapter 3, expressions of *ITM2B* and *BAX* were greater in RB oocytes collected during summer. Also, the activation of pro-apoptotic mechanisms (greater *BAX/BCL2* ratio) was suggested in RB heat stressed-oocytes compared with PL. Activation of compensatory mechanisms of deficient mitochondrial function (low number of copies of mtDNA and increased expression of *PPARGCC1*, *NRF1*, *TFAM*, *POLG* and *POLG2*) were also observed in RB heat stressed-oocytes compared with PL and H. In Charpter 4, lower P/AI was observed in RB and under summer heat stress. These data provide evidences that the lower reproduction performance observed in RB during heat stress may be due to impaired oocyte quality, as shown by their reduced mtDNA content and upregulation of several genes related to mtDNA replication/transcription, apoptosis and chaperones synthesis, resulting in lower blastocyst rate and higher nuclear fragmentation of embryos.

Keywords: Fertility. Heat stress. Repeat breeder. Oocyte quality. Mitochondrial DNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Quadro 1.1 - Variáveis analisadas e incluídas modelo estatístico final utilizado.....54

Figura 1.1 - Desenho esquemático do delineamento experimental. Sincronização da emergência de onda folicular, monitoramento das variáveis fisiológicas (temperatura retal – TR, temperatura de superfície cutânea – TC e freqüência respiratória – FR), momento da avaliação ultrassonográfica dos ovários (US) e *ovum pick up* (OPU). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010.....50

Figura 1.2 - Umidade relativa do ar mensal (a) e temperatura ambiental média mensal (b) registradas nas estações meteorológicas das duas fazendas utilizadas. As médias são referentes aos anos de 2000 a 2009. As setas indicam os meses escolhidos como verão (alta temperatura e umidade crônica) e inverno (baixa temperatura e umidade crônica). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010.....55

Figura 1.3 - (A) Frequência respiratória (movimentos/min) e (B) temperatura retal (°C) de novilhas (Nov), vacas em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010.....58

Figura 1.4 - Temperatura cutânea (°C) de novilhas (Nov), vacas em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010.....60

Figura 1.5 - Número de folículos visualizados nos ovários de novilhas (Nov), vacas em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno.

Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010.....62

Figura 1.6 - Número de oócitos totais (A) e viáveis (B) obtidos por aspiração intrafolicular de novilhas (Nov), vacas em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010.....65

Capítulo 2

Quadro 2.1 - Variáveis analisadas e incluídas modelo estatístico final utilizado.....73

Figura 2.1 - Taxa de blastocisto sete dias após a fecundação *in vitro* de oócitos de vacas repetidoras de serviço (RS), em pico de lactação (PL) e novilhas (Nov) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Cravinhos, 2009 a 2010.....76

Figura 2.2 - Porcentagem de células TUNEL-positivas em blastocistos oito dias após a fecundação *in vitro* de oócitos de novilhas (Nov), vacas em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS) da raça Holandesa, no verão e inverno, respectivamente. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Pirassununga, 2010.....79

Capítulo 3

Quadro 3.1 - Primers e probes para ensaios TaqMan usados para a PCR quantitativa. Pirassununga, 2010 a 2011.....86

Figura 3.1 - Conteúdo relativo de mtDNA em oócitos de vacas repetidoras de serviço (RS), vacas próximas ao pico em lactação (PL) e novilhas (N) Holandesas durante o verão e o inverno. Pirassununga, 2010 a 2011.....92

Figura 3.2 - Conteúdo absoluto de mtDNA em oócitos de vacas repetidoras de serviço (RS), vacas próximas ao pico em lactação (PL) e novilhas (N) Holandesas durante o verão. Pirassununga, 2010 a 2011.....93

Figura 3.3 - Expressão do *PPARGC1A* (a), *NRF1* (b), *TFAM* (c), *POLG* (d), *POLG2* (e), e *MT-CO1* (f) em oócitos coletados de vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS), vacas próximas ao pico em lactação (PL) e novilhas (N) durante o verão e o inverno. Pirassununga, 2010 a 2011.....95

Figura 3.4 - Expressão de *ITM2B* (a), *BAX* (b), *BCL-2* (c) e razão de expressão entre *BAX* e *BCL-2* (d) em oócitos de vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS), próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas (N) durante o verão e o inverno. Pirassununga, 2010 a 2011.....99

Figura 3.5 - Expressão do *HSPA1AB* (a) e *HSP90AA1* (b) em oócitos de vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS), próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas (N) no verão e no inverno. Pirassununga, 2010 a 2011.....100

Figura 3.6 - Expressão do *ACTB* (a), *GAPDH* (b) e *HIST1H2AG* (c) em oócitos de vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS), próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas (N) no verão e no inverno. Pirassununga, 2010 a 2011.....103

Capítulo 4

Figura 4.1 - Desenho esquemático do delineamento experimental. Sincronização da emergência de onda folicular e ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Céu Azul e Carambeí, 2010 a 2011.....109

Figura 4.2 - Taxa de concepção de vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS), próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas (Nov) no verão e no inverno. Céu Azul e Carambeí, 2010 a 2011.....111

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1 - Temperatura de bulbo seco (TBS), umidade relativa do ar (UR) e índice de temperatura e umidade (ITU) a que foram submetidas vacas repetidoras de serviço (RS), vacas próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas da raça Holandesas durante março (verão) e o agosto (inverno). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010.....56

Tabela 1.2 - Variáveis produtivas e reprodutivas das vacas (repetidoras de serviço – RS e próximas ao pico de lactação – PL) e novilhas Holandesas utilizadas em cada fazenda (Fazenda Agrindus = Faz. Ag; Fazenda São Jorge = Faz. SJ). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010.....57

Tabela 1.3 - Número total de oócitos e número de oócitos viáveis recuperados de novilhas, vacas de alta-produção em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviços (RS) pela técnica de OPU durante o verão e o inverno. Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010.....66

Capítulo 2

Tabela 2.1 - Taxas de desenvolvimento embrionário de oócitos provenientes de abatedouro e fertilizados in vitro com sêmen de touro Holandês para controle de qualidade dos meios e sêmen utilizados do experimento. Cravinhos, 2009 a 2010.....75

Tabela 2.2 - Taxa de blastocisto sete dias após a fecundação *in vitro* de oócitos de vacas repetidoras de serviço (RS), em pico de lactação (PL) e novilhas (Nov) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Cravinhos, 2009 a 2010.....76

Capítulo 4

Tabela 4.1 - Variáveis produtivas e reprodutivas das vacas (repetidoras de serviço – RS e próximas ao pico de lactação – PL) e novilhas Holandesas utilizadas na avaliação da taxa de concepção nas diferentes estações. Céu Azul e Carambeí, 2010 a 2011.....110

Tabela 4.2 - Taxa de concepção (%) de vacas repetidoras de serviço (RS), próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas Holandesas sincronizadas para inseminação artificial em tempo fixo utilizando mesmo protocolo e mesma partida de sêmen, durante o verão e o inverno. Céu Azul e Carambeí, 2010 a 2011.....111

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 24
2 HIPÓTESES 26
3 OBJETIVOS 27
4 REVISÃO DE LITERATURA 29
4.1 COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO* 30
4.2 INTERFERÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NA QUALIDADE OOCITÁRIA 32
4.3 RELAÇÃO ENTRE REPETIÇÃO DE SERVIÇOS E QUALIDADE OOCITÁRIA 36
4.4 USO DE AVALIAÇÕES BIOMOLECULARES PARA O ESTUDO DO EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA QUALIDADE OOCITÁRIA 37

CAPÍTULO I 46
5 JUSTIFICATIVA 47
6 MATERIAIS E MÉTODOS 48
6.1 LOCAL E PERÍODO DE EXECUÇÃO 48
6.2 ANIMAIS E INSTALAÇÕES 48
6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 49
6.4 SINCRONIZAÇÃO DA NOVA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR 49
6.5 MONITORAMENTO CLIMÁTICO E ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE 50
6.6 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS 51
6.7 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS 51
6.8 ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA (OPU) 52
6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 53
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
8 CONCLUSÕES 67

CAPÍTULO II 68
9 JUSTIFICATIVA 69
10 MATERIAIS E MÉTODOS 70
10.1 LOCAL E PERÍODO DE EXECUÇÃO 70
10.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE) 70
10.2.1 Maturação *in vitro* 70
10.2.2 Fecundação *in vitro* 71
10.2.3 Cultivo *in vitro* 71

10.2.4 *Feeding* e avaliação da taxa de desenvolvimento embrionário 72
10.2.5 Controle de qualidade 72
10.3 CONTAGEM DE NÚCLEOS TOTAIS E FRAGMENTADOS 72
11 RESULTADOS E DISCUSSÃO 74
12 CONCLUSÕES 80

CAPÍTULO III 81
13 JUSTIFICATIVA 82
14 MATERIAIS E MÉTODOS 83
14.1 LOCAL E PERÍODO DE EXCECUÇÃO 83
14.2 ANÁLISE RELATIVA DA QUANTIDADE DE mtDNA E DE TRANSCRITOS DOS OÓCITOS 83
14.2.1 Construção do controle externo 83
14.2.2 Extração de DNA e RNA 84
14.2.3 Determinação da quantidade relativa de cDNA 85
14.2.4 Determinação da quantidade relativa de mtDNA 88
14.3 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE mtDNA 89
14.3.1 Preparo das amostras e da curva padrão 89
14.3.2 Determinação da quantidade absoluta de mtDNA 89
14.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 90
15 RESULTADOS E DISCUSSÃO 91
16 CONCLUSÕES 104

CAPÍTULO IV 105
17 JUSTIFICATIVA 106
18 MATERIAIS E MÉTODOS 107
18.1 LOCAL E PERÍODO DE EXECUÇÃO 107
18.2 ANIMAIS E INSTALAÇÕES 107
18.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 108
18.4 SINCRONIZAÇÃO DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO 108
18.5 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA 109
18.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 109
19 RESULTADOS E DISCUSSÃO 110
20 CONCLUSÃO 113
21 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES 114
REFERÊNCIAS 116

1 INTRODUÇÃO

O acelerado crescimento populacional humano está gerando constantes preocupações referentes ao fornecimento de alimento em adequada proporção. Nesse contexto, a expansão do agronegócio se destaca como ponto chave na resolução desse problema. Na pecuária, a maximização da produção de carne e leite está intimamente ligada à eficiência reprodutiva dos rebanhos, justificando o aumento de pesquisas direcionadas a esta área. No entanto, apesar da grande evolução das técnicas de reprodução assistida, algumas variáveis de ordem biológica e ambiental ainda são barreiras importantes que se interpõem ao desempenho reprodutivo das fêmeas bovinas. Particularmente em gado leiteiro de alta produção, o estresse térmico ambiental e a presença de vacas repetidoras de serviço (RS) são grandes desafios para a fertilidade, ocasionando atrasos na concepção, aumento do intervalo entre partos e redução da lucratividade dessa atividade.

Fêmeas RS ou *repeat breeders* são comumente definidas como animais subférteis, sem quaisquer alterações anatômicas ou anormalidades infecciosas, que não se tornam gestantes mesmo após numerosos serviços (três ou mais). Sua incidência nos rebanhos comerciais é bastante variável, com média de 14%, representando grandes prejuízos econômicos por apresentarem baixas taxas de fertilidade (GRADEN et al., 1968; GUSTAFSSON; LARSSON, 1985) e/ou perda embrionária precoce (LINARES, 1981; GUSTAFSSON; LARSSON, 1985). Ainda não está totalmente esclarecido o motivo pelo qual estas vacas se tornam RS e se sua fertilidade é ainda mais agravada em períodos de estresse térmico. No entanto, há indicativos que sua baixa taxa de concepção esteja relacionada a algum comprometimento oocitário ou em fase inicial do desenvolvimento embrionário (GUSTAFSSON; EMANUELSON, 2002).

Em todo o mundo a condição climática é um dos principais fatores determinantes do sucesso na exploração pecuária, sendo indicadora de investimentos e direcionadora da produção. Essa importância estende-se ao Brasil, onde grande parte do rebanho leiteiro é composta por bovinos de origem européia (*B. taurus*), pouco adaptados às condições climáticas do nosso país, que possui em torno de dois terços de seu território situado na faixa tropical (TITO, 1998). A elevada temperatura está associada a um decréscimo na fertilidade e há indicações de que pode ocasionar efeito deletério sobre a competência oocitária e síntese de substâncias requeridas para o desenvolvimento embrionário inicial (ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI; WEBB; HANSEN, 1999; RUTLEDGE et al., 1999; AL-KATANANI;

PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). Assim, oócitos e embriões em estádio inicial de desenvolvimento são mais susceptíveis a sofrer injúrias decorrentes do estresse térmico comparados a embriões com mais de três dias após a fecundação (EALY; DROST; HANSEN, 1993; HANSEN; ARECHIGA, 1999). Esse fato explica o aumento da proporção de embriões anormais ou com desenvolvimento retardado em novilhas Holandesas superovuladas e expostas ao estresse térmico entre a inseminação artificial (IA) e a recuperação dos embriões, comparadas àquelas mantidas em termoneutralidade (PUTNEY et al., 1989).

Como as RS possuem taxa de concepção reduzida durante o verão em relação ao inverno (RODRIGUES et al., 2007a), é razoável supor que a baixa fertilidade das RS está associada à redução da competência oocitária e é agravada em decorrência ao estresse térmico. Essa suposição é fortalecida pelos resultados de um estudo prévio no qual foi evidenciado comprometimento na qualidade dos oócitos recuperados de novilhas RS, com base na sua morfologia após a coleta e sua reduzida habilidade de reorganizar a distribuição de mitocôndria e grânulos corticais no citoplasma após a maturação *in vitro* (BAGE et al., 2003). Esses fatores podem diretamente explicar a baixa qualidade oocitária e a subfertilidade que determina a síndrome da repetição de serviços. Assim, o presente estudo se baseia na hipótese que a baixa fertilidade de vacas Holandesas RS está associada com a qualidade oocitária e que essa condição é agravada pelo estresse térmico.

2 HIPÓTESES

A hipótese geral do presente estudo é que a baixa fertilidade de vacas Holandesas (*B. taurus*) RS está associada com sua baixa qualidade oocitária, a qual é ainda mais comprometida durante o estresse térmico. As hipóteses de cada capítulo são:

Capítulo I (etapa de campo)

- A frequência respiratória, a temperatura retal e a temperatura de superfície cutânea de vacas RS aumentam durante o estresse térmico, semelhantemente a vacas próximas ao pico de lactação (PL) e diferentemente de novilhas;

- O número de oócitos totais e viáveis recuperados pela técnica de *ovum pick up* (OPU) não será alterado pelo estresse térmico em nenhuma das categorias (RS, PL ou novilhas);

Capítulo II (etapa de laboratório de produção de embriões)

- A qualidade dos oócitos de vacas em lactação (RS e PL) é mais comprometida do que de novilhas durante o estresse térmico, sendo esse efeito mais intenso em vacas RS (menor taxa de blastocisto, menor número de células embrionárias e maior fragmentação nuclear nos embriões produzidos *in vitro*).

Capítulo III (etapa de avaliações biomoleculares)

- A qualidade dos oócitos de vacas em lactação (RS e PL) é mais comprometida do que de novilhas durante o estresse térmico, sendo esse efeito mais intenso em vacas RS (menor quantidade de DNA mitocondrial - mtDNA - e alteração da expressão de transcritos alvo relacionados a função mitocondrial, apoptose e estresse térmico).

Capítulo IV (etapa de teste de concepção)

- Vacas RS possuem menor taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo do que vacas PL e novilhas, principalmente durante o estresse térmico.

3 OBJETIVOS

Para testar as hipóteses, o objetivo geral foi avaliar se o comprometimento da eficiência reprodutiva de vacas RS da raça Holandesa (*B taurus*) e em estresse térmico está relacionado com a redução da qualidade dos oócitos.

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

Capítulo I: Avaliar o efeito do estresse térmico em vacas RS da raça Holandesa (*B. taurus*), comparativamente a vacas PL e novilhas, sobre as seguintes variáveis:

- frequência respiratória;
- temperatura retal;
- temperatura de superfície cutânea;
- número de folículos no dia da OPU;
- número de oócitos totais e viáveis;

Capítulo II: Avaliar a competência de desenvolvimento *in vitro* de oócitos aspirados *in vivo* de vacas RS da raça Holandesa (*B. taurus*) no verão e no inverno, comparativamente a vacas PL e novilhas, via:

- taxa de clivagem;
- taxa de blastocisto;
- taxa de eclosão;
- contagem do número total de núcleos dos embriões produzidos;
- proporção de núcleos fragmentados dos embriões produzidos.

Capítulo III: Avaliar a qualidade oocitária de gametas obtidos pela OPU de vacas RS da raça Holandesa (*B. taurus*) no verão e no inverno, comparativamente a vacas PL e novilhas, via:

- quantificação relativa e absoluta de mtDNA;
- expressão de transcritos alvo relacionados a:
  - estresse térmico: *HSP90AA1* and *HSPA1AB*
  - apoptose: *BAX*, *BCL2* e *ITM2B*
  - replicação e transcrição de mtDNA: *MT-CO1*, *NRF1*, *POLG*, *POLG2*, *PPARGC1A* e *TFAM*.

Capítulo IV: Avaliar o desempenho reprodutivo de vacas RS da raça Holandesa (*B. taurus*) comparativamente a vacas PL e novilhas no verão e no inverno, via:

- taxa de concepção após inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

4 REVISÃO DE LITERATURA

Uma das principais fontes de proteína animal na alimentação humana é o leite. O Brasil possui um potencial extraordinário para este segmento, embora subaproveitado. Em 2010, o Brasil produziu cerca de 30,5 bilhões de litros de leite, contando para isso com cerca de 23 milhões de fêmeas leiteiras em produção (Anuário DBO 2011*), com produção nacional média nacional de 4,6 litros/dia. Como o consumo populacional nacional foi de 149 litros/per capta/ano e o Brasil exportou 58,2 mil toneladas de leite em 2010, ficou evidente a necessidade de importação (113,1 mil toneladas; Anuário DBO 2011*). O resultado foi uma balança comercial deficitária de lácteos no ano em questão (U$$ 330,3 milhões em importações contra US$ 155,5 milhões em exportações = déficit de US$ 174,8 milhões).

O rebanho leiteiro brasileiro é composto em sua maioria por animais das raças Gir, Girolanda e Holandesa. A raça Holandesa, particularmente, possui uma inegável superioridade para a produção de grandes volumes de leite, especialmente em sistemas intensivos. No entanto, por ser uma raça de origem européia, é pouco adaptada aos trópicos e altamente susceptível aos prejuízos (produtivos e reprodutivos) decorrentes do estresse térmico do verão brasileiro. Além disso, não é incomum encontrar fêmeas RS em rebanhos holandeses de alta produção leiteira, sendo reportada uma incidência de cerca de 14% (YUSUF et al., 2010).

Nos últimos anos, as técnicas de sincronização do desenvolvimento folicular e da ovulação, bem como de manipulação do ciclo estral em bovinos progrediram de forma rápida e sólida. Os novos conceitos em fisiologia reprodutiva facilitaram o emprego de biotecnologias de reprodução assistida como a inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick up*; OPU) seguida da produção *in vitro* de embriões (PIVE). No Brasil, a PIVE se destaca por estar em uma fase de grande difusão, tendo ultrapassado a marca de 250 mil embriões produzidos em 2009 (sendo 4.097 de taurinas leiteiras), o que equivale a mais que 66% da produção mundial de embriões *in vitro* (VIANA et al., 2010). No entanto, a PIVE é ainda bastante ineficiente em vacas de leite de alta produção e influenciada por diversos fatores de ordem técnica e biológica. Os fatores técnicos foram mais explorados e hoje existem diversas opções de sistemas de aspiração folicular e cultivo (BOLS et al., 2004). No entanto, o sucesso dessas biotécnicas ainda está diretamente relacionado ao número e qualidade dos complexos *cumulus*-oócito

(COCs) que são destinados ao cultivo (VIANA; BOLS, 2005) e, consequentemente, nos fatores que interferem na competência oocitária para o desenvolvimento embrionário. Dentre esses fatores, as condições climáticas em que os animais são mantidos e a categoria do animal utilizado para a PIVE podem determinar os resultados da técnica.

A presente revisão abordará tópicos relacionados à qualidade oocitária de fêmeas Holandesas, focando a repetição de serviços e o impacto do estresse térmico. Essas informações servirão de base para a compreensão das hipóteses e objetivos do presente estudo, bem como para a discussão dos resultados nas seções que se seguirão.

4.1 COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

O sucesso das técnicas de OPU-PIVE está estritamente relacionado à competência dos oócitos para a produção de embriões *in vitro.* Alguns eventos-chave estão diretamente relacionados com a competência desses gametas, dentre eles, o reinício da meiose, a ativação das clivagens após a fecundação, o desenvolvimento ao estádio de blastocisto, a indução da prenhez, a capacidade de levá-la a termo e o desenvolvimento saudável a termo (SIRARD et al., 2006). Apesar de numerosos, o critério mais frequentemente empregado nos laboratórios de PIVE é o desenvolvimento a blastocisto, uma vez que oócitos incompetentes são bloqueados na transição materno-zigótica (estádio de oito células em bovinos), devido à incapacidade de ativação do genoma embrionário (SIRARD et al., 2006).

Acredita-se que existam características que possam ser utilizadas como preditoras do potencial de desenvolvimento dos oócitos a blastocistos. A fase de desenvolvimento folicular (mais detalhada no tópico seguinte), o diâmetro dos folículos dos quais são recuperados os oócitos, as características morfológicas e o diâmetro dos oócitos (que pode estar relacionada com o conteúdo de mtDNA) são algumas dessas características que estão sendo amplamente estudadas.

O diâmetro folicular no momento da recuperação de oócitos tem sido o parâmetro mais utilizado na tentativa de elevar os índices obtidos em sistemas de produção embrionária *in vitro* (VASSENA et al., 2003). Alguns autores demonstraram que oócitos contidos em folículos inferiores a 2 mm são menos competentes que folículos de diâmetro superior, não se desenvolvendo além de oito células (TAN; LU, 1990; PAVLOK; LUCAS-HAHN;

NIEMANN, 1992). Embora existam relatos de que não há diferenças nas taxas de recuperação, clivagem ou blastocistos entre folículos menores ou maiores do que 4 mm (SENEDA et al., 2001), há indícios de que folículos maiores do que seis mm apresentem melhor competência para o desenvolvimento a blastocisto (LONERGAN et al., 1994). Nesse sentido, Chiaratti et al. (2010) observaram que oócitos provenientes de folículos de menor diâmetro, contêm menos mtDNA do que aqueles originados de folículos maiores.

A classificação morfológica em graus leva em conta o revestimento por células do *cumulus* e/ ou a homogeneidade do citoplasma dos oócitos. Quando ambos os métodos são utilizados, a classificação varia em escala de 1 a 4 (LEIBFRIED; FIRST, 1979; DE LOOS et al., 1989), sendo que oócitos de grau 1 apresentam mais de três camadas compactas de *cumulus* com ooplasma homogêneo, os de grau 2 apresentam de uma a duas camadas de *cumulus* com ooplasma homogêneo ou discretamente heterogêneo, os de grau 3 apresentam camadas de *cumulus* discretamente expandidas e ooplasma irregular podendo conter granulações escurecidas e, por fim, os de grau 4 são os oócitos desnudos, expandidos ou com ooplasma irregular. Os critérios dessa classificação estão mais detalhados no Manual de Transferência de Embriões da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (WRIGHT, 1998). Alguns autores indicam que oócitos de graus 1 a 3 apresentam igual capacidade de desenvolvimento, havendo comprometimento apenas nos de grau 4 (DE LOOS et al., 1989), principalmente nos desnudos (YANG, 1990; WARD et al., 2000).

O diâmetro dos oócitos está diretamente relacionado à sua competência. Em bovinos, o oócito adquire capacidade de realizar a ativação nuclear a partir de 110 μm, o que corresponde a um folículo de aproximadamente de três mm de diâmetro. Assim, o oócito gradualmente adquire a capacidade de sofrer a maturação, meiose e manter o desenvolvimento embrionário inicial (HYTTEL et al., 1997). A capacidade de progressão da meiose *in vitro* aumenta de 21,2% para 80,7% em oócitos com 120 μm em relação aos oócitos com diâmetros inferiores a 100 μm (FAIR; HYTTEL; GREVE, 1995). Adicionalmente, o desenvolvimento aos estádios de mórula e blastocisto aumenta de 10 para 34%, à medida que o oócito aumenta em diâmetro de 95 para 115 μm (ARLOTTO et al., 1996).

Todos esses critérios têm sua utilidade em auxiliar na predição da qualidade oocitária. No entanto, trata-se de avaliações superficiais e que podem apresentar certa subjetividade. Atualmente, o desenvolvimento de técnicas de avaliações biomoleculares, como a avaliação da expressão de genes e a quantificação do conteúdo de mtDNA, permite a associação dos

critérios supracitados a esses métodos mais sofisticados. Assim, abrem-se perspectivas para o melhor entendimento dos fatores que afetam a competência gamética, em que nível está sendo afetada e o estudo de estratégias para melhorá-la. Mais adiante, algumas dessas avaliações biomoleculares serão abordadas.

4.2 INTERFERÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NA QUALIDADE OOCITÁRIA

O estresse térmico pode ser definido como a soma de forças externas a um animal homeotérmico, que atua deslocando a temperatura corpórea de seu estado de repouso (YOUSEF, 1984). As adaptações fisiológicas às quais um organismo homeotérmico é submetido durante o estresse térmico podem comprometer diversos sistemas fisiológicos importantes, incluindo o reprodutivo. Em bovinos, a hipertermia pode afetar a função celular de diversos tecidos do trato reprodutivo da fêmea (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000; HANSEN et al., 2001). Além disso, a redistribuição do aporte sanguíneo das vísceras para os tecidos periféricos durante o estresse térmico pode interferir nas funções ovariana e uterina, afetando o desempenho reprodutivo (COLLIER et al., 1982; ALEXANDER, 1987; HANSEN; ARECHIGA, 1999).

Ao focar a função reprodutiva, estudos têm demonstrado que durante o período de crescimento folicular, o estresse térmico tem o potencial de comprometer o oócito, tanto por um efeito direto da temperatura elevada sobre esta célula, quanto por mudanças na função folicular as quais poderiam comprometer a qualidade oocitária [revisado por Hansen & Arechiga (1999)]. Oócitos coletados de folículos de vacas Holandesas (*B. taurus*) durante o verão possuem capacidade reduzida de desenvolvimento até o estádio de blastocisto após a fecundação *in vitro* (FIV), em comparação com oócitos coletados no inverno (ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). Entretanto, apesar de existirem diversos estudos demonstrando um efeito evidente do estresse térmico sobre a capacidade de desenvolvimento oocitário após a FIV, os mecanismos exatos pelos quais o oócito é comprometido ainda permanecem desconhecidos.

Com relação às taxas de blastocistos, grandes variações parecem ser decorrentes da sazonalidade (estações quentes: 20% de blastocistos oito dias após a fecundação vs. estações frias: > 30%) e estresse térmico (verão com estresse térmico: 11,4%[a] e inverno: 29,9[b]; (AL-

KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). Estudos anteriores têm demonstrado que a exposição de CCOs de bovinos à temperatura elevada durante as primeiras 12 horas de maturação *in vivo* (MIV) danifica a arquitetura do citoesqueleto, reduz a maturação nuclear oocitária (ROTH; HANSEN, 2005) e induz a morte oocitária por apoptose (ROTH; HANSEN, 2004b; a). O efeito deletério do estresse térmico sobre a qualidade do blastocisto ou número de células é consistente com estudos *in vitro* ou *in vivo* que demonstram desenvolvimento reduzido de embriões durante o estresse térmico (EDWARDS et al., 1997; AL-KATANANI; WEBB; HANSEN, 1999; HANSEN et al., 2001; RIVERA; HANSEN, 2001; AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; ROTH; HANSEN, 2004a).

A resistência ao estresse térmico é sabidamente determinada pelo genótipo da vaca. Rebanhos formados por raças *B. indicus* ou seus cruzamentos têm se mostrado mais resistentes às condições tropicais (como elevada temperatura e umidade) do que aqueles formados por raças que evoluíram em climas temperados (*B. taurus*, como a raça Holandesa). Essencialmente, a adaptação de certas raças a condições de elevação térmica (zebuínas; *B. indicus*) é consequência da habilidade superior destas em regular sua temperatura corpórea (ADEYEMO, 1979; BENNETT, 1985; HAMMOND et al., 1996; GAUGHAN et al., 1999). Entretanto, foi observado que até mesmo vacas de raças mais resistentes ao calor, como a Nelore (*B. indicus*) apresentaram diminuição da qualidade oocitária, evidenciada pela taxa de produção de embriões *in vitro*, quando seus oócitos foram coletados durante o verão (FERRAZ, 2005).

Em vacas da raça Gir (*B. indicus*), a exposição ao estresse térmico não teve efeito imediato sobre a função reprodutiva e as concentrações séricas de cortisol, porém foi observada redução da concentração de progesterona (P4) depois de cessado o período de estresse, maior período de anestro (P4 < 1 ng/mL), codominância folicular (aumento do número de folículos maiores que nove milímetros) e redução da duração do ciclo estral (TORRES-JUNIOR et al., 2008). Apesar de não ter exercido efeito significativo sobre a taxa de clivagem, o desenvolvimento até a fase de blastocisto foi reduzido após o término do estresse térmico, mostrando um efeito tardio desse fator, o qual se prolongou por até 105 dias. Nesse contexto, em um estudo prévio ao supracitado foi demonstrado que, uma vez que o pool ovariano de oócitos é afetado pelo estresse térmico, são necessários dois a três ciclos estrais (após o fim do estresse) para a recuperação da qualidade oocitária (ROTH et al., 2001b). Esses achados são sugestivos que os folículos e oócitos devam sofrer injúrias

decorrentes do estresse térmico durante as fases iniciais da foliculogênese, resultando em um efeito deletério tardio sobre a função ovariana.

Em embriões bovinos quatro dias após a fecundação (mais que oito células) submetidos a estresse térmico (6 h a 41ºC) foi possível observar diferença racial (Brahman, Senepol, Holandês e Angus) de resistência a esse estresse (PAULA-LOPES et al., 2003b). Neste estudo, observou-se tendência de maior taxa de clivagem (> 80%) e efeito negativo menos pronunciado do estresse térmico sobre o desenvolvimento a blastocisto nos dias oito e nove em embriões de vacas *B. indicus* (Brahman; aproximadamente 30 e 35% vs. 15 e 20%, respectivamente) do que de vacas *B. taurus* (Holandesas = aproximadamente 30 e 35% vs. menos que 5% em ambos os dias de cultivo, respectivamente, e Angus = aproximadamente 50 e 60% vs. menos que 5 % em ambos os dias de cultivo, respectivamente). Da mesma maneira, embriões Brahman foram menos afetados do que os Holandeses ou Angus quanto ao estágio de desenvolvimento nove dias após a fecundação (blastocisto expandido ou eclodido) e quanto ao número de núcleos neste mesmo momento. Os autores concluíram que embriões de bovinos da raça Brahman são mais adaptados ao estresse térmico do que os da raça Holandesa ou Angus.

Corroborando esses achados, quando oócitos provenientes de ovários de matadouro de fêmeas Holandesas e Brahman foram coletados, constatou-se que a porcentagem de blastocistos produzidos foi maior em Brahman do que em Holandesas (29,5% vs. 17,5%, respectivamente), sugerindo melhor qualidade oocitária da raça, fato que pode estar relacionado à melhor adaptação às condições térmicas ambientais (ESCALONA, 2008). Em outro trabalho (BILBY et al., 2006), oócitos de Holandesas e não Holandesas obtidos a partir de ovários provenientes de matadouro foram utilizados como controle interno para um experimento de OPU no qual foram avaliadas várias dietas sobre os resultados da PIVE. Não se verificou efeito de raça para taxa de clivagem (78,9% para Holandês e 68,0% para não Holandês), contudo, o estádio de desenvolvimento foi mais avançado em embriões não Holandeses, tanto para alcançar o estádio de oito células três dias após a fecundação (aproximadamente 40% para não Holandês e aproximadamente 30% para Holandês), quanto para o desenvolvimento a blastocisto oito dias após a FIV (35,1% vs. 21,2%, respectivamente). Neste trabalho, as taxas obtidas em matadouro foram superiores às obtidas na OPU, mesmo em Holandesas. Sendo assim, os autores julgam que não somente há efeito de raça, mas também o efeito *post-mortem* (pré-maturação) incrementando os resultados na PIVE, fato previamente relatado (BLONDIN et al., 1997).

Diversos estudos mostram que o uso de protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) pode eliminar os problemas de detecção de cio causados pelo estresse térmico, no entanto, essa estratégia não é suficiente para restaurar a taxa de prenhez do rebanho para os mesmos níveis observados durante os períodos mais frescos do ano [revisado por Baruselli et al. (2011)]. Como descrito anteriormente, os oócitos e embriões em estágio de desenvolvimento inicial são altamente sensíveis ao estresse térmico e isto se torna mais óbvio em raças não-adaptadas. Contudo, embriões com três dias ou mais após a concepção são menos sensíveis ao estresse térmico (EALY; DROST; HANSEN, 1993; HANSEN; ARECHIGA, 1999). Assim, uma estratégia que vem sendo utilizada para melhorar a fertilidade durante o verão é a transposição dos efeitos do estresse térmico sobre os estádios iniciais de desenvolvimento embrionário utilizando-se a transferência de embriões (TE), uma vez que com essa técnica embriões de seis a sete dias são utilizados (RUTLEDGE, 2001; BARUSELLI et al., 2011).

Em condições climáticas brasileiras, a eficiência do uso dessa biotecnologia para aumentar a taxa de concepção de vacas Holandesas no verão pode ser evidenciada em um estudo retrospectivo com dados referentes a 12.875 IAs e 4.822 TEs realizadas nos anos de 2001 até 2006 (RODRIGUES et al., 2007b; FERREIRA et al., 2010; BARUSELLI et al., 2011). Nesse contexto, vacas inseminadas tiveram menor taxa de concepção nos meses mais quentes do ano comparadas àquelas que receberam embrião, ou seja, o uso da TE, além de aumentar a taxa de concepção geral, foi eficiente em manter essa taxa mais constante durante as diferentes estações do ano. Complementarmente, a perda embrionária entre 30 e 60 dias de gestação foi avaliada em vacas Holandesas submetidas a IA (n = 5.040) ou TE (n = 2.109), durante a primavera-verão e o outono-inverno de 2004 a 2008 (FERREIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2010; BARUSELLI et al., 2011). Independentemente da biotécnica utilizada a perda embrionária foi maior na primavera-verão do que no outono-inverno [20,3% (593/2916) vs 16,8% (709/4234); P= 0,002]. No entanto, as vacas submetidas a TE apresentaram maior (P= 0,001) perda embrionária (20,5%; 432/2109) do que as submetidas a IA (17,3%; 870/5040). Quando a taxa de concepção desses mesmos animais foi avaliada nos mesmos períodos observou-se queda de concepção nas estações mais quentes tanto utilizando a TE quanto a IA, porém, a concepção à TE sempre foi superior à IA. Portanto, apesar da maior perda gestacional em comparação à IA, o uso da TE possibilitou um incremento no desempenho reprodutivo durante os meses mais quentes do ano, mostrando-se uma boa estratégia para melhorar a eficiência reprodutiva durante períodos de estresse térmico.

4.3 RELAÇÃO ENTRE REPETIÇÃO DE SERVIÇOS E QUALIDADE OOCITÁRIA

Com relação aos problemas de fertilidade, é reconhecido que vacas RS causam grande prejuízo econômico aos criadores (KAMWANJA et al., 1994). Estima-se que a repetição de serviço deva variar entre rebanhos de 9% a 24% (BULMAN; LAMMING, 1978; BARTLETT; KIRK; MATHER, 1986; WALDMANN et al., 2001; YUSUF et al., 2010). De acordo com um estudo mais recente (YUSUF et al., 2010), a incidência de RS foi de 14% quando nove rebanhos comercias foram estudados. Vacas RS são comumente referidas como animais subférteis, sem quaisquer alterações anatômicas ou anormalidades infecciosas, que passaram por mais de três serviços sem se tornarem gestantes. Estas vacas são caracterizadas por baixas taxas de fertilidade (GRADEN et al., 1968; O'FARRELL et al., 1983; MALAYER; HANSEN, 1990) e/ou perda embrionária precoce (LINARES, 1981; GUSTAFSSON; LARSSON, 1985). No entanto, ainda não está totalmente esclarecido o motivo pelo qual estas vacas se tornam RS, qual o pior período do ano para as mesmas e o que deveria ser feito para evitar este problema.

Recentemente, a ocorrência de distúrbios reprodutivos periparto e o aumento da paridade foram identificados como fatores que aumentam o risco de incidência da repetição de serviços em vacas de leite. (BONNEVILLE-HEBERT et al., 2011). A distocia, por exemplo, aumentou o risco da vaca se tornar RS em 44%. No entanto, o aumento da paridade foi o fator de maior efeito, sendo que vacas de quarta lactação apresentaram risco de 67% de se tornarem RS. Em outro estudo recente, sugeriu-se que alterações na concentração de metabólitos sanguíneos poderiam estar associadas à redução da qualidade oocitária e contribuir para a ocorrência da repetição de serviços (KURYKIN et al., 2011). Nesse estudo, a porcentagem de oócitos morfologicamente anormais foi maior em RS (52,5%) do que em vacas em início de lactação (37,9%). As concentrações de proteína total, glicose e aspartato aminotransferase não diferiram entre vacas RS com excesso de oócitos anormais, RS com oócitos normais e vacas em início de lactação. No entanto, vacas RS com excesso de oócitos anormais apresentaram maior concentração plasmática de uréia e tendência de maior concentração de colesterol e de lactato desidrogenase, o que pode estar prejudicando a qualidade oocitária desses animais (KURYKIN et al., 2011).

Um estudo retrospectivo, similar ao descrito no item anterior, foi realizado para avaliar a taxa de concepção e a perda gestacional de vacas RS que passaram por IA ou TE nas

diferentes épocas do ano (RODRIGUES et al., 2007a; FREITAS et al., 2010). A perda gestacional (entre 30 e 60 dias de gestação) foi similar entre vacas RS e não-RS que foram inseminadas ou receberam embrião (FREITAS et al., 2010). No entanto, a taxa de concepção de vacas RS foi maior após a TE (41,7%; 1609/3858) do que após a IA (17,9%; 1019/5693), indicando que a baixa taxa de concepção de RS possa estar relacionada a problemas relativos à qualidade oocitária ou ao desenvolvimento embrionário precoce.

De maneira semelhante, foi sugerido em outro estudo que os oócitos de RS possuem qualidade comprometida (GUSTAFSSON; EMANUELSON, 2002). Além disso, um estudo prévio proveu evidências de que haja comprometimento da qualidade de oócitos coletados de novilhas RS, dada sua inadequada morfologia após a coleta e sua reduzida habilidade de reorganizar a distribuição espacial citoplasmática das mitocôndrias e grânulos corticais após a maturação *in vitro* (BAGE et al., 2003). Esses fatores podem explicar indiretamente a ocorrência de baixa qualidade oocitária e contribuir para a subfertilidade que define a síndrome de repetição de serviços que acomete esses animais.

Como foi demonstrado que RS também têm taxa de concepção mais baixa durante o verão em comparação ao inverno (RODRIGUES et al., 2007a), pode-se supor que a reduzida eficiência reprodutiva registrada em RS durante o estresse térmico pode estar relacionada ao comprometimento da qualidade de seus gametas.

4.4 USO DE AVALIAÇÕES BIOMOLECULARES PARA O ESTUDO DO EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA QUALIDADE OOCITÁRIA

4.4.1 Estresse térmico e apoptose

A hipertermia ocasiona também efeito deletério sobre a competência oocitária e a síntese de substâncias requeridas para o desenvolvimento embrionário inicial (HANSEN, 1997; ROCHA et al., 1998; RUTLEDGE et al., 1999; AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). Recentes pesquisas demonstraram que os efeitos do estresse térmico afetam as propriedades físico-químicas das membranas celulares, alterando a morfologia de oócitos no inverno e verão, aumentando o teor de ácidos graxos saturados no verão e o de

polinsaturados no inverno (ZERON et al., 2001). Além disso, a exposição ao choque térmico ocasiona alterações ultra-estruturais em oócitos e embriões, dentre as quais estão a redistribuição de organelas da membrana em direção ao núcleo celular e agregação citoplasmática, vacuolização e rompimento da membrana e/ou matriz mitocondrial, culminando num processo de morte celular programada ou apoptose (LIU; TRIMARCHI; KEEFE, 2000; RIVERA et al., 2003b; RIVERA et al., 2003a) Outros autores também demonstraram que o estresse térmico durante procedimentos *in vitro* induz eventos apoptóticos em oócitos bovinos (ROTH; HANSEN, 2004a; SOTO; SMITH, 2009) e células embrionárias (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; LOUREIRO; BRAD; HANSEN, 2007), sendo que a via intrínseca mitocondrial pareceu estar envolvida nesse processo (SOTO; SMITH, 2009). Assim, a disfunção mitocondrial pode ser um dos fatores que determinam a magnitude dos efeitos negativos do estresse térmico na competência oocitária e apoptose.

Nesse contexto, sabe-se que a mitocôndria passa por alterações importantes durante a ativação da apoptose, sendo a primeira a liberação simultânea de fatores apoptogênicos como o citocromo c (ADAMS; CORY, 1998; GREEN; REED, 1998; TSUJIMOTO, 1998). O citocromo c se liga ao fator-1 ativador da apoptose (Apaf-1) no citosol, resultando na ativação da caspase-9 (LI et al., 1997), a qual tem sua atividade regulada por proteínas da família BCL2 (ADAMS; CORY, 1998; CHAO; KORSMEYER, 1998; GREEN; REED, 1998). As proteínas da família BCL2 são reguladores centrais da apoptose, uma vez que integram os sinais de sobrevivência e morte que são gerados dentro e fora da célula (ADAMS; CORY, 1998). Essa família pode ser categorizada em duas classes de proteínas, de acordo com sua função de inibir (BCL2, BCL-XL, BCL-W, A1, MCL-1) ou promover apoptose (BAX, BAK, BAD, BIM, BCL-XS, BOK, BIK, BLK, HRK, BNIP3, BIM e grupo BH). A razão entre essas duas classes é um grande determinante de sobrevivência ou morte celular por estímulo apoptótico (MOTYL, 1999). Sabe-se ainda, que a forma curta da proteína de membrana integral 2B (ITM2B), a qual contém o domínio BH3 da família BCL2, induz apoptose em células estimuladas por interleucina-2 (FLEISCHER et al., 2002; FLEISCHER; AYLLON; REBOLLO, 2002). Além disso, estudos bioquímicos e confocais têm demonstrado que a associação entre ITM2B e mitocôndria está correlacionada com a perda de potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c e, como consequência final, indução de apoptose (FLEISCHER; AYLLON; REBOLLO, 2002).

Adicionalmente, em resposta a estímulos apoptóticos como o estresse térmico, a BAX é translocada para a membrana mitocondrial (BETTAIEB; AVERILL-BATES, 2005;

STANKIEWICZ et al., 2005) levando à abertura dos poros trans-membrânicos de permeabilização (QIAN et al., 2004; BETTAIEB; AVERILL-BATES, 2005; STANKIEWICZ et al., 2005) e a liberação do citocromo c (QIAN et al., 2004; BETTAIEB; AVERILL-BATES, 2005; WADA et al., 2005). Seguindo essa premissa, um estudo mostrou que a microinjeção de BAX recombinante em oócitos isolados induziu a apoptose, indicando que a elevação dos níveis citoplasmáticos de BAX desencadeia a apoptose em células germinativas femininas (MORITA et al., 2000). O envolvimento direto de moléculas de BCL2 na apoptose induzida por estresse térmico em oócitos bovinos ainda precisa ser determinado.

4.4.2 Estresse térmico e mtDNA

Além de sua função no desencadeamento da apoptose, as mitocôndrias desempenham papel essencial no metabolismo energético celular e homeostase. Em mamíferos, estas organelas são herdadas exclusivamente pelo oócito [revisado por Birky Jr (1994)] e são responsáveis por gerar, pela via da fosforilação oxidativa (OXPHOS), a maioria do ATP necessário para a realização dos processos biológicos dependentes de energia. Durante o desenvolvimento embrionário inicial, as mitocôndrias estão indiferenciadas e produzem baixos níveis de ATP (THOMPSON et al., 1996; KHURANA; NIEMANN, 2000). No momento da ativação do genoma embrionário, essa organela passa progressivamente por modificações estruturais e funcionais, além de gerar níveis mais altos de energia para manter a crescente demanda energética do embrião resultante da síntese de RNA e proteínas e da formação dos blastômeros (THOMPSON et al., 1996; KHURANA; NIEMANN, 2000).

No entanto, apesar dessas funções, o número de mitocôndrias parece permanecer constante até o período pré-implantacional. Assim, o número de mitocôndrias nos oócitos deve ser suficiente para popular cada blastômero e suprir a necessidade de ATP requerida para a formação de blastocistos viáveis [revisado por Dumollard, Dunchen & Carroll (2007)].

Segundo Wallace (2005), a mitocôndria é composta por cerca de 1.500 polipeptídios, sendo a maioria codificada pelo DNA nuclear (nDNA). Além disso, o nDNA codifica fatores de transcrição que coordenam a expressão desses peptídeos e de outros fatores que regulam a replicação, transcrição e tradução do mtDNA. No entanto, dos cerca de 80 polipeptídios

envolvidos na fosforilação oxidativa (OXPHOS), 13 são codificados na mitocôndria pelo mtDNA e compõem parte dos complexos enzimáticos mitocondriais I, III, IV e V responsáveis pela OXPHOS. O mtDNA também abriga 22 RNAs transportadores (tRNAs) e 2 RNAs ribossômicos (rRNAs) que estão envolvidos no processo de tradução dos RNAs mensageiros (mRNAs) mitocondriais (LARSSON; CLAYTON, 1995). Devido à ausência de íntrons e de sequências não traduzidas nas extremidades 5' e 3' do DNA, o mtDNA dos mamíferos contém somente cerca de 16.500 pares de bases (LARSSON; CLAYTON, 1995). Ainda, a molécula de mtDNA possui formato circular e é organizada em um complexo núcleo-protéico conhecido como nucleóide (KUCEJ; BUTOW, 2007).

A função mitocondrial depende de uma comunicação cadenciada entre o nDNA e as várias cópias do DNA de 16,5 kb contido na mitocôndria (mtDNA). Por outro lado, apesar de regulada por genes nucleares, a replicação do mtDNA não é dependente do ciclo celular (revisado por (SHADEL; CLAYTON, 1997). No entanto, a replicação do mtDNA é afetada pelos requerimentos energéticos da célula, uma vez que a quantidade de mtDNA está fortemente associada com a função mitocondrial (WILLIAMS, 1986; JENG et al., 2008). Então, o número de cópias de mtDNA pode variar de consideravelmente entre diferentes tipos celulares. Em contraste com o nDNA, existem centenas a milhares de cópias de mtDNA em cada célula e o número de cópias varia dependendo do metabolismo e do tipo celular. Células de elevada exigência energética (e.g. neurônios e células musculares) contém mais moléculas de mtDNA do que outras células (e.g. leucócitos e monócitos) com menor necessidade energética (WALLACE, 2005). O oócito, por exemplo, contém maior quantidade de mtDNA do que qualquer outra célula do organismo (MICHAELS; HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982). Em média um oócito de bovino contém 370.000 (TAMASSIA et al., 2004a; MAY-PANLOUP et al., 2005a) cópias de mtDNA, cada uma delas presente individualmente nas mitocôndrias.

Grande quantidade de mitocôndrias é acumulada durante a oogênese enquanto o folículo cresce (CAO et al., 2007; ZENG et al., 2009), enfatizando a importância potencial do conteúdo de mtDNA para o desenvolvimento embrionário inicial [revisado por Smith, Thundathil & Filion (2005) e May-Panloup et al. (2007)]. Apesar da grande quantidade de mtDNA no momento da ovulação (MICHAELS; HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982), o número de cópias de mtDNA varia consideravelmente entre os oócitos de um mesmo animal (STEUERWALD et al., 2000; REYNIER et al., 2001; TAMASSIA et al., 2004a; MAY-PANLOUP et al., 2005b; SANTOS; EL SHOURBAGY; ST. JOHN, 2006). Assim sendo, muito se tem especulado sobre uma possível correlação do número de cópias com o potencial

do oócito em se tornar um blastocisto competente a implantar-se no útero. Tal correlação tem sido evidenciada em humanos (REYNIER et al., 2001; MAY-PANLOUP et al., 2005a), suínos (EL SHOURBAGY et al., 2006) e bovinos (HUA et al., 2007). No entanto, inúmeras questões ainda existem a respeito do seu efeito tanto sobre o crescimento e maturação do oócito, assim como sobre o desenvolvimento embrionário (TAMASSIA et al., 2004a; MAY-PANLOUP et al., 2005b).

Embora se desconheçam as razões para tal variação no número de cópias de mtDNA nos oócitos, ou seu efeito no desenvolvimento do embrião, numerosos autores associaram o número de cópias de mtDNA à fertilidade em diversas espécies (REYNIER et al., 2001; MAY-PANLOUP et al., 2005a; EL SHOURBAGY et al., 2006; SANTOS; EL SHOURBAGY; ST. JOHN, 2006; HUA et al., 2007). Em uma recente sequência de estudos, Chiaratti et al. (2010) observaram que oócitos provenientes de folículos de menor diâmetro, que sabidamente são menos competentes para o desenvolvimento a blastocisto, contêm menos mtDNA do que aqueles originados de folículos maiores. No entanto, o número de cópias de mtDNA não variou em zigotos partenogenéticos competentes e incompetentes, indicando que o conteúdo de não estaria relacionado à competência de desenvolvimento inicial dos embriões. Em seguida, com o intuito de avaliar a importância do mtDNA no desenvolvimento, embriões de uma célula passaram por depleção de 64% de seu conteúdo de mtDNA por meio de centrifugação seguida de remoção da fração citoplasmática rica em mitocôndrias. Surpreendentemente, os embriões que passaram por tal depleção tiveram desenvolvimento normal a blastocisto e apresentaram número de cópias de mtDNA similar aos controles. No entanto, o desenvolvimento dos embriões que passaram por depleção foi acompanhado por aumento da expressão dos genes TFAM e NRF1, que sabidamente controlam a replicação e transcrição de mtDNA, indicando a habilidade intrínseca desses embriões em reestabelecer o conteúdo de mtDNA na fase de blastocisto. Assim, concluiu-se que embriões bovinos competentes são capazes de regular seu conteúdo de mtDNA na fase de blastocisto, independentemente do número de cópias acumuladas durante a oogênese.

Uma vez que a função mitocondrial depende de polipeptídios codificados tanto pelo nDNA como pelo mtDNA (WALLACE, 2005), a expressão de subunidades codificadas por ambos os genomas deve ser rigorosamente coordenada (CLAYTON, 1998; GARESSE; VALLEJO, 2001). Diversos fatores regulam o metabolismo da célula, sendo o mais conhecido o co-ativador PPAR gama 1 (PPARGC1A) que é codificado pelo nDNA (KELLY, D. P.; SCARPULLA, 2004; SCARPULLA, 2008b; a). Em nível nuclear, o PPARGC1A

regula a expressão dos fatores de respiração nuclear 1 e 2 (NRF1 e NRF2) que, por sua vez, coordenam, também no núcleo, a expressão de polipeptídios da OXPHOS bem como fatores que controlam a replicação, transcrição e tradução do mtDNA (KELLY, D. P.; SCARPULLA, 2004; SMITH; THUNDATHIL; FILION, 2005; SCARPULLA, 2008b; a). Em nível mitocondrial tanto a replicação como a transcrição do mtDNA são regulados por fatores importados pela mitocôndria que interagem com uma região específica do mtDNA conhecida por D-loop (LARSSON; CLAYTON, 1995; CLAYTON, 2000; KELLY, D. P.; SCARPULLA, 2004; SMITH; THUNDATHIL; FILION, 2005; SCARPULLA, 2008b; a). O fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) é uma proteína codificada no núcleo que tem função de fator de empacotamento do mtDNA (FISHER et al., 1992) e fator de transcrição, promovendo e regulando a replicação e transcrição (CHANG; CLAYTON, 1984). O TFAM, os fatores de transcrição mitocondrial B1 e B2 e a RNA polimerase mitocondrial interagem com a D-loop e são responsáveis por iniciar a transcrição bidirecional do mtDNA. Estes mesmos fatores também regulam a replicação do mtDNA, pois a fita crescente de RNA serve como iniciador da replicação da fita pesada do mtDNA (LARSSON; CLAYTON, 1995; CLAYTON, 2000; 2003). A fita leve, por sua vez, tem sua replicação iniciada quando a replicação da fita pesada atinge a sua origem de replicação permitindo assim o acesso dos fatores de replicação (LARSSON; CLAYTON, 1995; CLAYTON, 2000; 2003). A replicação do mtDNA é conduzida por uma DNA polimerase específica (POLG) que também é codificada pelo núcleo. Com relação à transcrição, ambas as fitas do mtDNA são transcritas em duas fitas de RNA policistrônico que então são clivadas em mRNAs, tRNAs e rRNAs (LARSSON; CLAYTON, 1995; CLAYTON, 2000; GARESSE; VALLEJO, 2001; SMITH; THUNDATHIL; FILION, 2005). Os tRNAs e rRNAs são utilizados exclusivamente na tradução dos mRNAs codificados pelo mtDNA (LARSSON; CLAYTON, 1995; CLAYTON, 2000). Apesar do controle nuclear da replicação e transcrição do mtDNA, estes eventos são independentes do ciclo celular e ocorrem de forma contínua na célula, mesmo em células recém-divididas (SHADEL; CLAYTON, 1997).

Recentemente, o estresse tem sido associado com alterações na replicação do DNA mitocondrial (mtDNA). Em células de neuroblasma humano, por exemplo, a apoptose induzida por meta-anfetamina induziu redução no número de cópias de mtDNA (WU et al., 2007).

Nesse contexto, torna-se de fundamental importância conhecer o impacto do estresse térmico e outro tipos de estresse [como o possível estresse metabólico relatado em RS por

Kurykin et al (2011)] sobre o número de cópias de mtDNA e seu efeito na função reprodutiva de vacas da raça Holandesa, a fim de se alcançar melhores índices reprodutivos por meio da adaptação de novas biotécnicas de reprodução assistida nos rebanhos leiteiros. O estudo da expressão gênica e a quantificação de mtDNA poderão esclarecer se os problemas de fertilidade relacionados a diferentes condições climáticas e às vacas RS têm como base a qualidade oocitária. Dessa forma, buscar-se-á elucidar estas questões, com vista à expansão da aplicação comercial da OPU-PIVE para essa raça.

4.4.3 Estresse térmico e *heat shock proteins*

De forma geral, todos organismos desenvolvem mecanismos para sobreviver quando expostos a uma variedade de condições estressantes, dentre elas elevações na temperatura ambiental, que causam danos importantes nas estruturas celulares e interferem em suas funções essenciais (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010). Como as proteínas possuem estreitas faixas de temperatura para estabilidade e função ótima, pequenas alterações térmicas podem causar grandes alterações em sua conformação como desnaturação, entrelaçamento ou agregação inespecífica. Muitos dos efeitos morfológicos e fenotípicos do estresse térmico podem ser explicados pela agregação de proteínas e um desbalanceamento da sua homeostase. Portanto, os autores previamente citados consideram razoável assumir que o acúmulo deletério de proteínas desnaturadas (não empacotadas) é o sinal para que as medidas de contenção sejam acionadas pelo organismo. É interessante, no entanto, que essa especulação implica no fato de a célula não reconhecer alterações na temperatura por si só e sim é sugestiva que a resposta ao estresse térmico seja disparada pela presença de proteínas desnaturadas resultantes do próprio estresse ou por diversos outros agentes estressores, como a oxidação, metais pesados e etanol (HEIKKILA et al., 1982; COURGEON; MAISONHAUTE; BEST-BELPOMME, 1984; YURA et al., 1984; MICHEL; STARKA, 1986)

O estresse térmico é deletério para a organização interna das células, uma vez que causa desnaturação de proteínas específicas (WELCH; SUHAN, 1985; SZALAY et al., 2007; TOIVOLA et al., 2010). Em eurariontes, um dos principais danos ocorre no citoesqueleto, alterando a organização dos filamentos de actina e tubulina (WELCH; SUHAN, 1985;

TOIVOLA et al., 2010), com consequente perda da correta localização de organelas e colapso dos processos de transporte intracelular. Quando há estresse térmico, ocorre a fragmentação do sistema complexo de Golgi e retículo endoplasmático, além de haver redução do número de mitocôndrias e lisossomos (WELCH; SUHAN, 1985). O desacoplamento da OXPHOS e a perda de mitocôndrias estão relacionados à dramática queda dos níveis de ATP durante o estresse térmico (LAMBOWITZ et al., 1983; PATRIARCA; MARESCA, 1990). Processos nucleares como *splicing* de RNA, alterações ribossomais, formação de grânulos de estresse (WELCH; SUHAN, 1985; NOVER; SCHARF; NEUMANN, 1989; VOGEL; PARSELL; LINDQUIST, 1995; BUCHAN; PARKER, 2009) também são afetados pelo estresse térmico. Adicionalmente, as membranas celulares podem ser severamente afetadas pelo estresse térmico. Nesse sentido, alterações na proporção de proteínas e lipídios pode levar a maior fluidez de membrana (KRUUV et al., 1983; VIGH et al., 2007), resultando em aumento de permeabilidade e, assim, alteração da homeostase (COOTE; COLE; JONES, 1991; PIPER et al., 2003). Todas essas alterações (citosol, núcleo e membrana) causam paralisação do ciclo celular e estagnação do crescimento e proliferação (ZEUTHEN, 1971; LINDQUIST, 1980; YOST; LINDQUIST, 1986).

Em resposta ao estresse térmico (cuja principal consequência é a desnaturação proteica), as células ativam uma via sinalizadora primitiva que leva à expressão transitória de genes para a produção de proteínas de estresse ou choque térmico (*heat shock* ou *heat stress proteins*; Hsps). As Hsps possuem sofisticados mecanismos de proteção, sendo as chaperonas moleculares as Hsps mais conservadas. As chaperonas previnem a formação de agregados proteicos não específicos e auxiliam na aquisição da conformação nativa das proteínas (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010). Dependendo da duração e gravidade do estresse térmico, o acúmulo de defeitos pode resultar em morte celular. No entanto, se o estresse não for letal, este pode levar a tolerância celular a outros e mais severos agentes estressores. O aumento dos níveis de Hsps sintetizada em resposta a condições moderadas de estresse são a base para essa resistência (LINDQUIST, 1986).

A classe predominante de Hsps, as chaperonas moleculares, compreende cinco famílias - Hsp100s, Hsp90s, Hsp70s, Hsp60s e sHsps (Hsps pequenas). Interessantemente, há uma constante necessidade de chaperonas para o empacotamento de proteínas de novo e reempacotamento de cadeias polipeptídicas que não estão em sua forma nativa (desnaturadas), uma vez que a estabilidade de proteínas celulares é baixa e agregados competem com o empacotamento produtivo mesmo em condições fisiológicas (GRAGEROV et al., 1991;

KERNER et al., 2005; MAYER, 2010). Em termos de nível de expressão gênica, parece óbvio que os genes que codificam chaperonas estejam entre os Hsps mais substancialmente *upregulated*. Como a maioria das chaperonas já estão presentes em altos níveis em condições fisiológicas, a necessidade massiva por chaperonas durante o estresse térmico reflete o fato de serem requeridas em grande quantidade em relação às proteínas desnaturadas (revisado por (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010). Assim, em situações de estresse, as chaperonas se tornam o principal constituinte proteico do citosol. A Hsp70 e 90 são expressas constitutivamente (presentes em altas concentrações no citosol) e também em presença de estresse térmico, quando passam por *upregulation* (WELCH; FERAMISCO, 1982). A Hsp70 é a mais conservada das chaperonas.

CAPÍTULO I

Respostas clínicas e reprodutivas de vacas repetidoras de serviço em estresse térmico comparativamente a novilhas e vacas Holandesas próximas ao pico de lactação

Dados publicados em *Journal of Dairy Science* 94(5):2383-92, 2011

5 JUSTIFICATIVA

O experimento proposto para esta tese de doutorado foi delineado para determinar se o comprometimento da eficiência reprodutiva de vacas Holandesas RS está relacionado com sua baixa competência oocitária e se o estresse térmico afeta mais severamente a reprodução destas vacas comparativamente a novilhas e vacas PL. Para tal, o estudo foi dividido em quatro capítulos: avaliações de campo, produção *in vitro* de embriões, análises biomoleculares e teste de concepção, distribuídos nos capítulos I, II, III e IV, respectivamente. As categorias novilha e vaca PL foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, para a avaliação das RS. Sabe-se que novilhas têm alterações fisiológicas mais sutis ao estresse térmico, enquanto as vacas PL, por possuírem taxa metabólica mais elevada devido à produção de grandes volumes de leite, são mais susceptíveis aos problemas relacionados ao estresse térmico citados na revisão de literatura desta tese.

No presente capítulo, a presença ou ausência de condição de estresse térmico a que os animais estavam expostos foi caracterizada com base no ITU. Variáveis diretamente ligadas aos animais (temperatura retal e subcutânea, frequência respiratória e número de folículos e oócitos totais e viáveis) foram estudadas para gerar indícios da ação do estresse térmico nas respostas clínicas, endócrinas e reprodutivas de vacas Holandesa RS, comparativamente a novilhas e vacas PL. Além disso, nesse capítulo estão relatados os procedimentos de OPU para a coleta dos oócitos que foram utilizados para as avaliações de desenvolvimento embrionário *in vitro* e para as avaliações biomoleculares descritas nos dois capítulos subsequentes.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

A condução do presente estudo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (aprovado sob o protocolo de número 1571/2008).

6.1 LOCAL E PERÍODO DE EXECUÇÃO

O presente estudo foi realizado durante os meses de março de 2009 a março de 2010. Os animais pertenciam e estavam alojados na Fazenda Santa Rita (Agrindus S/A), município de Descalvado (21°54’14’’S 47°37’10’’O), e na Fazenda São Jorge (antiga Campestre), município de São Pedro (22°32’55’’S 47°54’50’’O), ambas no estado de São Paulo. A OPU foi realizada nas próprias fazendas, em parceria com a empresa Vida Reprodutiva Consultoria.

6.2 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

Os rebanhos das fazendas utilizadas nesse estudo (Agrindus e São Jorge, respectivamente) eram compostos de 1.800 e 400 vacas Holandesas em lactação, com produção média de 30,1 e 34,2kg de leite por dia. Duzentas e seis fêmeas bovinas cíclicas da raça Holandesa (*B. taurus*) foram utilizadas como doadoras de oócitos nessa etapa, sendo 67 vacas RS, 69 vacas PL e 70 novilhas. Parte foi utilizada no verão (36 RS, 37 PL e 36 novilhas) e parte no inverno (31 RS, 32 PL e 34 novilhas).

Para a inclusão dos animais em ambas as etapas do experimento, foram respeitados critérios de seleção de acordo com sua categoria, incluindo escore de condição corporal (ECC), idade (novilhas), produção leiteira, dias em lactação (DEL) e número de eventos reprodutivos. Assim, as novilhas utilizadas tinham de 13,5 a 21 meses, nenhuma inseminação prévia e ECC entre 2,75 e 3,5. As vacas PL apresentavam 46 a 153 DEL, produção diária de

leite mínima de 30 kg, no máximo duas inseminações e ECC entre 2,5 e 3,25. Já as vacas RS apresentavam mais do que quatro serviços, DEL acima de 220 e ECC entre 2,75 e 3,75.

Quanto ao alojamento e a alimentação dos animais, o manejo já estabelecido nas propriedades em que foi realizado o experimento foi mantido, sendo que fêmeas em lactação (PL e RS) foram mantidas em *freestalls* (baias de estabulação livre) com acesso a um piquete adjacente com pastagem e água *ad libitum* e novilhas foram alojadas em piquetes com áreas de sombreamento, pastagem e água *ad libitum*. A ração total foi formulada para alcançar ou exceder os requerimentos nutricionais mínimos para cada categoria: novilhas (14% PB, 26,7% FDA e 47% FDN) e vacas Holandesas em lactação (18% PB, 21,2% FDA e 34,4% FDN) pesando 650 kg e produzindo 45 kg de leite com gordura corrigida para 3,5% quando consumindo 26 kg de MS/d (NRC, 2001). As vacas em lactação foram ordenhadas três vezes ao dia, com intervalo médio de oito horas entre duas ordenhas consecutivas.

6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

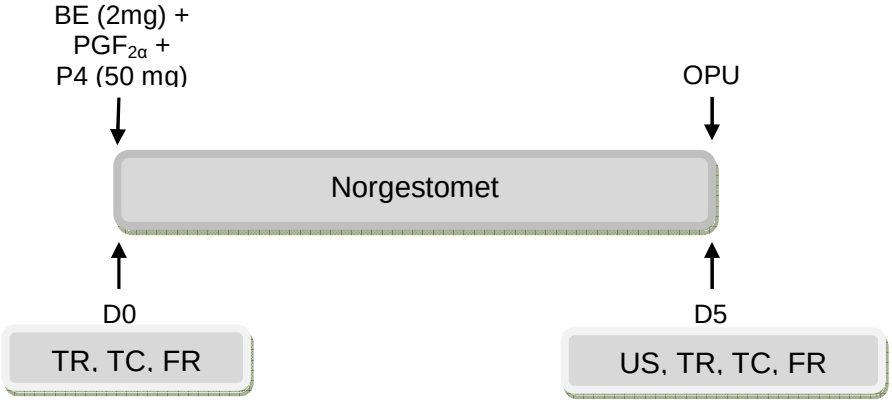
O presente experimento foi delineado em fatorial 3 X 2 (categoria da fêmea x estação do ano). Fêmeas das três categorias foram submetidas à OPU em cada estação proposta, em ambas as fazendas descritas acima. Para tal, foram realizadas três réplicas consecutivas em cada estação, com diferentes animais em cada. A escolha das épocas do ano foi baseada em uma análise retrospectiva do comportamento da temperatura e umidade diárias registradas nas estações meteorológicas das fazendas durante os nove anos anteriores (2000 a 2009). Assim, os três meses consecutivos de maior temperatura e umidade (estresse térmico) e de temperatura mais amena foram selecionados. As seções de OPU foram realizadas no terceiro mês de cada período selecionado, visando retratar não somente o estresse térmico ou sua ausência de forma aguda, mas também seu efeito crônico.

6.4 SINCRONIZAÇÃO DA NOVA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR

Somente fêmeas cíclicas (duas avaliações dos ovários com intervalo de 15 dias antes do início do protocolo de sincronização) foram utilizadas. Para sincronizar a emergência da

onda folicular, todas as fêmeas receberam em dia aleatório do ciclo estral (D0), um implante auricular de 3 mg de norgestomet (Crestar®, MSD Saúde Animal, Brasil) concomitante à administração 2 mg de BE (Sincrodiol®, OuroFino Saúde Animal, Brasil), 50 mg de progesterona injetável (OuroFino Saúde Animal, Brasil) e 500 µg de cloprostenol sódico (prostaglandina $F_{2\alpha}$; $PGF_{2\alpha}$; Sincrocio®, OuroFino Saúde Animal, Brasil) i.m.. O implante foi removido no D5, imediatamente antes da realização da OPU (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Desenho esquemático do delineamento experimental. Sincronização da emergência de onda folicular, monitoramento das variáveis fisiológicas (temperatura retal – TR, temperatura de superfície cutânea – TC e freqüência respiratória – FR), momento da avaliação ultrassonográfica dos ovários (US) e *ovum pick up* (OPU). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010



BE = benzoato de estradiol; $PGF_{2\alpha}$ = prostaglandina $F_{2\alpha}$; P4 = progesterona; OPU = ovum pick up; TR = temperatura retal; TC = temperatura de superfície cutânea; FR = frequência respiratória.

6.5 MONITORAMENTO CLIMÁTICO E ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE

Diariamente, durante todo o período experimental de ambas as estações do ano, a temperatura ambiental (temperatura do bulbo seco; TBS) e a umidade relativa do ar (UR) foram devidamente registradas em estações meteorológicas instaladas nas propriedades. O índice de temperatura e umidade (ITU) foi calculado em cada período experimental, utilizando-se a seguinte fórmula, citada por Kelly & Bond (1971):

$$ITU = TBS - 0{,}55\,(1 - UR)\,(TBS - 58)$$

Onde: ITU = índice de temperatura e umidade, adimensional

TBS = temperatura do bulbo seco em graus Fahrenheit (°C/5=°F-32/9)

UR = umidade relativa do ar expressa em valor decimal

Para esse cálculo, foi utilizada a média da TBS e da UR de cada período experimental. A classificação do estresse térmico de acordo com a variação do ITU foi proposta por Armstrong (1994) e está apresentada no anexo A dessa tese.

6.6 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS

As variáveis clínicas como temperatura retal (TR), temperatura de superfície cutânea (TC) e frequência respiratória (FR) foram monitoradas no D0 e no D5 do protocolo em todos os animais, previamente a realização de qualquer manejo reprodutivo (Figura 1). Os exames foram realizados com os animais na sombra e com o mínimo manejo e contenção possíveis.

A TR foi obtida com um termômetro clínico digital inserido aproximadamente cinco centímetros em contato direto com a mucosa retal. A FR (número de movimentos respiratórios/minuto) foi mensurada pela contagem do número de movimentos respiratórios no flanco do animal em um período cronometrado de 15 segundos e sua multiplicação por quatro. Esse procedimento foi realizado duas vezes seguidas para cada animal e a média das duas contagens foi considerada. A TC (em °C) foi medida com um termômetro infravermelho digital portátil, marca Incoterm®, modelo Mult Temp Portátil, com mira a laser. As medidas foram tomadas a aproximadamente cinco cm do animal em quatro pontos do corpo: fronte, cernelha, virilha e jarrete (conforme descrito por Torres-Júnior et al., 2008), obtendo-se ao final a média dos quatro pontos por animal.

6.7 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Todos os animais passaram por exames ultrassonográficos (Aloka SSD – 500) no final do protocolo de sincronização da onda folicular (D5) para a contagem e classificação dos folículos ovarianos (Figura 1). Os folículos foram classificados em três categorias: < 5 mm, 5 a 10 mm e >10 mm.

6.8 ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA (OPU)

Os animais foram contidos em um brete e submetidos à anestesia epidural realizada no espaço sacrococcígeo (entre a última vértebra sacral e primeira coccígea) utilizando 3,0 (novilhas) a 5,0 mL (vacas) de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Anestésico L®, Pearson). Após a perda dos reflexos da cauda, esta foi presa e procedeu-se a remoção manual das fezes da ampola retal e higienização mecânica da região perineal com água e secagem com papel toalha. A vulva também foi cuidadosamente higienizada, tomando-se o cuidado de não permitir a entrada de água dentro do canal vaginal.

Em seguida, a probe microconvexa com frequência 5,0 MHz (Aloka SSD – 500) foi introduzida até o fundo de saco da vagina com o auxílio de uma guia de aspiração folicular (Guia de aspiração folicular, WTA, Brasil). Previamente às aspirações, os folículos de ambos os ovários foram contados e classificados conforme descrito no item anterior. As punções foliculares foram realizadas com um sistema com agulha descartável 40 x 10 mm (19 G, B-D) acoplado a linha de aspiração de teflon de 1,7 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento (WTA, Watanabe Tecnologia Aplicada) e inserido na guia de aspiração folicular. Todo o sistema de aspiração foi submetido à pressão negativa entre 10 a 20 mL de água/minuto (70 a 90 mmHg) produzida por uma bomba de vácuo com aquecedor de tubo de 50 mL (WTA, Cravinhos, SP, Brasil).

O sistema de aspiração foi lavado com solução de PBS (Nutricel®) adicionada de heparina sódica (5.000 UI/L, Parinex®, Hypolabor) e 1% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell). Esta solução (aquecida a 37 ºC) foi também empregada na procura e seleção dos oócitos aspirados. Os folículos visíveis (≥ 2 mm) foram puncionados e o fluido contendo os oócitos foi colhido em tubo cônico de 50 mL (Corning), mantido a 37ºC. O tubo de coleta foi conduzido ao laboratório de campo e o conteúdo aspirado foi vertido em filtro de coleta de embriões com malha de 80 µm (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) e lavado com o mesmo meio descrito anteriormente até obtenção de um líquido translúcido, com o sedimento contendo os oócitos recuperados. Em seguida, o conteúdo do filtro foi vertido em placas de cultivo celular 100 x 20 mm contendo DPBS acrescido de 1% de SFB a 37 °C para a realização da procura, lavagem, classificação e seleção dos CCOs com auxílio de lupa estéreo microscópica (Nikon) com aumento de 50X.

Os CCOs foram morfologicamente classificados como viáveis ou inviáveis de acordo com as características citoplasmáticas do oócito e o número de camadas de células do

cumulus. CCOs compactos com mais de três camadas de células do *cumulus* e oócitos com citoplasma homogêneo, CCOs compactos com três camadas ou menos de células do *cumulus* e oócitos com citoplasma levemente heterogêneo, e CCOs parcialmente desnudos e oócitos com citoplasma heterogêneo foram considerados viáveis para a PIVE e utilizados nesse estudo. Oócitos desnudos ou degenerados, oócitos desprovidos de células do *cumulus* na maior parte da superfície da zona pelúcida ou com citoplasma retraído e vacuolizado, e CCOs com células do *cumulus* expandidas foram considerados inviáveis para a PIVE (WRIGHT, 1998) e descartados desse estudo.

Cerca de 80% dos CCOs selecionados como viáveis foram acondicionados em criotubos plásticos de 1,5 mL (Corning) contendo meio TCM-199 (acrescido de 25 mM de HEPES, 10% de SFB, 49,4 µg/mL de Piruvato, 100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina) e mantidos em uma transportadora de oócitos a 35°C até a chegada ao laboratório de PIVE. Os oócitos destinados às análises de biologia molecular (aproximadamente 20% dos viáveis) foram desnudados das células do *cumulus* por agitação (vórtex) em 1 µL de PBS contendo 0,1% de polivinil-pirrolidina (PVP) e colocados individualmente em tubos de 0,2 mL em PBS contendo 0,1% de PVP e 1 U/µL de inibidor de RNase (RNase OUT; Invitrogen). As amostras foram estocadas à -80 °C até seu uso.

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analysis* do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformados. As variáveis contínuas ou discretas (TBS, UR, ITU, FR, TR, TC, número de oócitos totais, número de oócitos viáveis) foram analisadas por ANOVA, usando o procedimento GLIMMIX do SAS, versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Na avaliação dos dados ambientais (TBS, UR e ITU) as variáveis incluídas no modelo inicial foram estação, fazenda e as suas interações. Na avaliação dos dados relacionados aos animais, as variáveis incluídas no modelo inicial foram categoria, fazenda, estação, ECC e as suas interações. Para o modelo final de regressão logística, variáveis foram removidas com base nos critérios estatísticos de Wald por eliminação *backward* quando $P > 0.20$. As variáveis incluídas no modelo final estão apresentadas no quadro 1.1.

Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.).

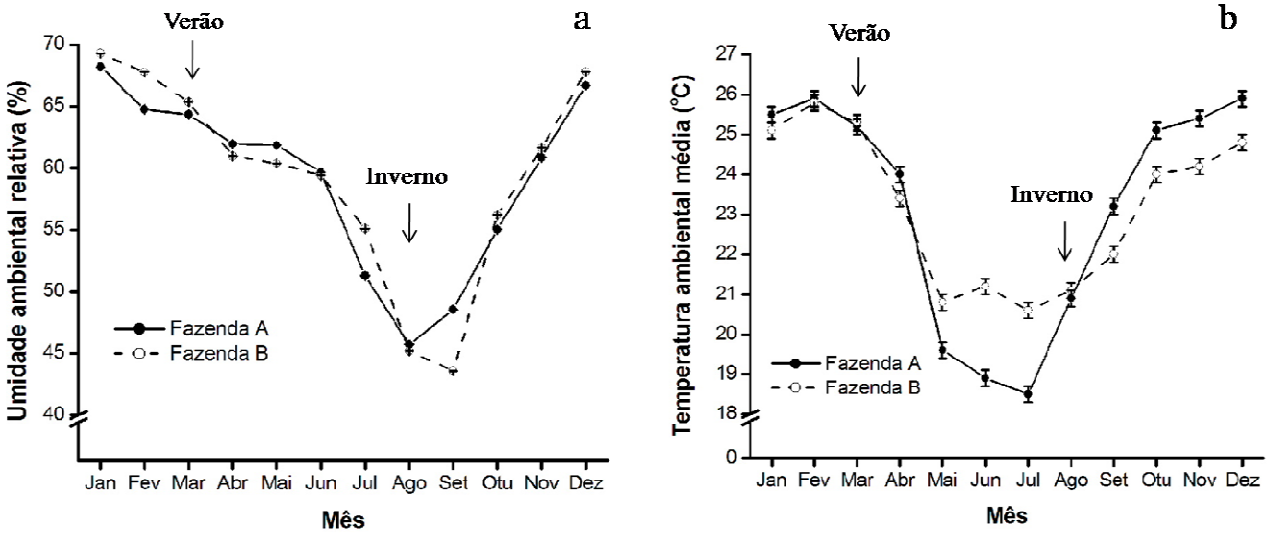
Quadro 1.1 - Variáveis analisadas e incluídas modelo estatístico final utilizado

Item avaliado	Variáveis incluídas no modelo final
Temperatura de bulbo seco (TBS)	Estação
Umidade relativa do ar (UR)	Estação
Índice de temperatura e umidade (ITU)	Estação
Número de lactações	Categoria e estação
Dias em lactação (DEL)	Categoria e estação
Produção de leite	Categoria e estação
Número de serviços prévios	Categoria e estação
Escore de condição corporal (ECC)	Categoria e estação
Frequência respiratória (FR)	Categoria, estação e ECC
Temperatura retal (TR) na etapa 1	Categoria, estação e ECC
Temperatura de superfície cutânea (TC)	Categoria, estação e ECC
Número de oócitos totais	Categoria, estação e ECC
Número de oócitos viáveis	Categoria, estação e ECC

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha dos meses de verão e inverno que foram utilizados no presente experimento se baseou no estudo retrospectivo das variáveis climáticas (umidade relativa do ar e temperatura ambiental) diárias dos últimos nove anos anteriores ao experimento nas duas fazendas. O perfil anual dessas variáveis está ilustrado na figura 1.2.

Figura 1.2 - Umidade relativa do ar mensal (a) e temperatura ambiental média mensal (b) registradas nas estações meteorológicas das duas fazendas utilizadas. As médias são referentes aos anos de 2000 a 2009. As setas indicam os meses escolhidos como verão (alta temperatura e umidade crônica) e inverno (baixa temperatura e umidade crônica). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010



Os meses de maior temperatura e umidade (estresse térmico) e de temperatura mais amena foram detectados e optou-se por realizar o estudo em momentos em que as fêmeas houvessem passado por pelo menos dois meses anteriores de estresse térmico (estresse crônico) e pelo menos dois meses após a queda da temperatura ter iniciado. As seções de OPU foram realizadas nos meses de março e agosto, visando retratar não somente o estresse térmico ou sua ausência de forma aguda, mas também seu efeito crônico ou de longo prazo. As temperaturas ambientais e a umidade relativa do ar máxima, mínima e média durante o verão e o inverno estão apresentadas na tabela 1.1. O ITU para cada uma dessas situações foi calculado e também está apresentado nesta tabela.

Tabela 1.1 - Temperatura de bulbo seco (TBS), umidade relativa do ar (UR) e índice de temperatura e umidade (ITU) a que foram submetidas vacas repetidoras de serviço (RS), vacas próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas da raça Holandesas durante março (verão) e o agosto (inverno). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010

Variável	Média			Mínima			Máxima		
	Verão	Inverno	Valor P	Verão	Inverno	Valor P	Verão	Inverno	Valor P
TBS (ºC)	28,8 ± 0,9[a]	21,7 ± 0,2[b]	<0,001	18,5 ± 0,3	14,4 ± 0,4	<0,001	39,1 ± 0,1	28,9 ± 0,1	<0,001
UR (%)	61,0 ± 0,02[a]	53,9 ± 0,03[b]	0,04	-	-	-	-	-	-
ITU	78,4 ± 0,5[a]	67,8 ± 0,4[b]	<0,001	63,9 ± 0,5	58,1 ± 0,6	<0,001	92,9 ± 0,4	77,5 ± 0,5	<0,001

ITU = TBS – 0,55 (1 – UR) (TBS – 58), sendo TBS em graus Fahrenheit. O ITU foi calculado utilizando a UR média de cada estação.

A aferição das condições ambientais foi indicativa que a temperatura e a umidade foram aumentadas durante o verão, atingindo valores acima dos limites estabelecidos como padrão de conforto térmico em bovinos taurinos. Os valores de ITU calculados corroboram essa premissa. Quando o ITU foi calculado com base nos valores médios de temperatura e umidade, demonstrou-se que os animais estavam sob condição de estresse térmico ambiental durante o verão. No entanto, situação ainda mais critica é observada quando a temperatura máxima atingida no verão é considerada, evidenciando situação de estresse térmico severo, segundo o ITU (anexo 1) estabelecido por Armstrong (1994).

Não houve interação entre fazendas e categorias e entre réplicas e categorias para nenhuma variável analisada. Na tabela 1.2 estão apresentadas as variáveis produtivas e reprodutivas de vacas (PL e RS) e novilhas Holandesas avaliadas em cada fazenda.

Tabela 1.2 - Variáveis produtivas e reprodutivas das vacas (repetidoras de serviço – RS e próximas ao pico de lactação – PL) e novilhas Holandesas utilizadas em cada fazenda (Fazenda Agrindus = Faz. Ag; Fazenda São Jorge = Faz. SJ). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010

	Novilhas		PL		RS	
	Faz. Ag	Faz. SJ	Faz. Ag	Faz. SJ	Faz. Ag	Faz. SJ
DEL	0	0	119,1 ± 3,6	85,5 ± 7,8	446,5 ± 19,4	368,9 ± 35,6
Produção de leite (kg)	0	0	34,1 ± 0,9	34,9 ± 1,4	22,1 ± 1,1	26,2 ± 1,2
Serviços prévios (n)	0	0	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,2	7,5 ± 0,3	6,2 ± 0,5
Lactações prévias (n)	0	0	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,3
ECC	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,3 ± 0,1

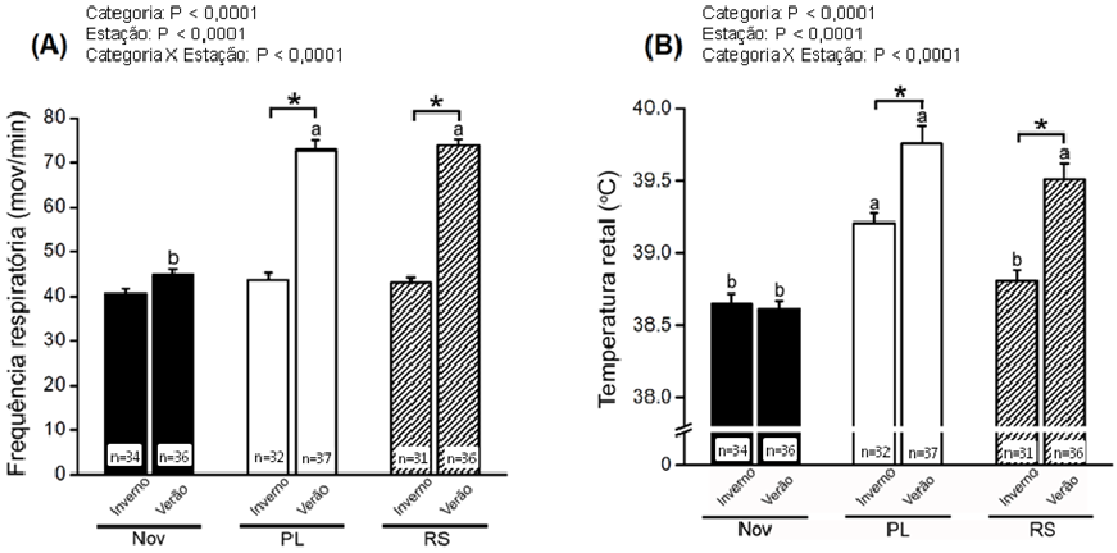
Valores apresentados como médias ± E.P.M. para cada fazenda

As novilhas utilizadas nesse estudo estavam cíclicas e tinham de 13,5 a 21 meses, nenhuma inseminação prévia e ECC entre 2,75 e 3,5. As vacas PL apresentavam 46 a 153 DEL, produção diária de leite mínima de 30 Kg, no máximo duas inseminações e ECC entre 2,5 e 3,25. Já as vacas RS apresentavam mais do que quatro serviços, DEL acima de 220 e ECC entre 2,75 e 3,75.

Novilhas e vacas apresentaram semelhante FR e TR durante o inverno. No entanto, somente as novilhas foram capazes de manter semelhante FR e TR no verão e inverno (interação categoria-estação: $P < 0,0001$). As vacas de ambas as categorias (PL e RS) tiveram a FR e a TR aumentadas durante o verão comparadas as mesmas categorias no inverno (P <

0,0001) e comparadas a novilhas no verão (P < 0,0001; Figura 1.3). Esses dados evidenciam resposta fisiológica mais exacerbada ao estresse térmico (ITU médio de 78,4 ± 0,4) em vacas em lactação em comparação a novilhas.

Figura 1.3 - (A) Frequência respiratória (movimentos/min) e (B) temperatura retal (°C) de novilhas (Nov), vacas em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010



Segundo Baccari Jr. et al. (2001) os bovinos manifestam sinais de hipertermia quando apresentam acima de 60 movimentos respiratórios por minuto, confirmando a situação de estresse térmico das vacas do presente estudo durante o verão (> 70 movimentos respiratórios por minuto). Complementarmente, as vacas desse estudo apresentaram aumento de 0,55°C (PL) e 0,7°C (RB) na TR entre o inverno e o verão, o que já pode ser suficiente para comprometer a qualidade oocitária (GWAZDAUSKAS; THATCHER; WILCOX, 1973; AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). Esses autores observaram que a elevação de 0,5ºC na TR foi suficiente para comprometer a competência oocitária *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. É importante ressaltar que a TR das vacas foi mensurada no período da manhã, previamente à OPU, momento no qual sua temperatura corporal está mais baixa em relação ao período da tarde. O aumento médio de 1 a 2,3ºC na TR foi observado no turno da tarde em relação ao da manhã em animais *B. indicus* submetidos a estresse térmico contínuo durante esses períodos (BEATTY et al., 2006; TORRES-JUNIOR et al., 2008).

Vacas em lactação de alta produção são particularmente sensíveis à elevação da temperatura ambiental, uma vez que a alta taxa metabólica resultante da síntese de leite é

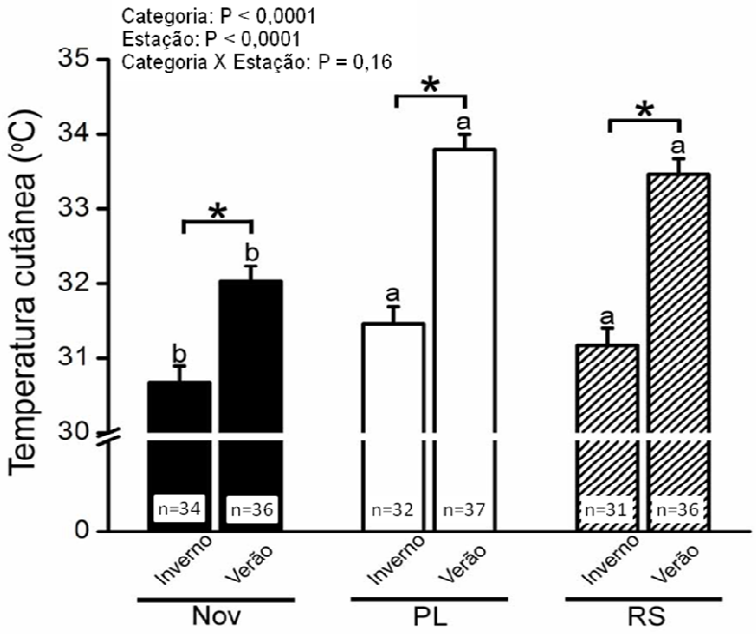
proporcional ao nível de produção leiteira. De fato, quando a produção diária de leite é aumentada de 35 para 45 litros, a sensibilidade ao estresse térmico aumenta e a temperatura de termoneutralidade é reduzida em 5ºC (BERMAN, 2005). Esse aumento de sensibilidade parece estar associado à produção extra de calor decorrente da produção adicional de leite. Por exemplo, vacas que produzem 18,5 e 31,6 kg de leite/dia geram 27,3% e 48,5% a mais de calor a mais, respectivamente, do que vacas não lactantes (PURWANTO et al., 1990). Além disso, uma vaca que pesa 700 kg e produz 60 kg de leite/dia produz cerca de 44.171 kcal de calor/dia; a mesma vaca reduz essa produção de calor para 25.782 kcal/dia no final da lactação, quando produz 20 kg de leite/dia (NARDONE et al., 2006).

Com base nesses dados, esperar-se ia que vacas PL (produção média próxima a 34,5 kg de leite/dia) fossem menos termotolerantes do que as vacas RS (produção média próxima a 24,0 kg de leite/dia) desse estudo, sofrendo mais variações na TR, TC e FR, uma vez que a produção de leite das primeiras era superior a das segundas. No entanto, não foi observada diferença entre essas variáveis clínicas das duas categorias de vacas estudadas, as quais diferiram apenas das novilhas, confirmando a hipótese inicial do presente estudo. Assim, parece evidente que vacas RS tenham algum fator extra que determine que sua sensibilidade ao estresse térmico seja a mesma de vacas de maior produção de leite (PL). Esse fator pode estar relacionado a problemas no periparto (BONNEVILLE-HEBERT et al., 2011), alterações na concentração de metabólitos sanguíneos (KURYKIN et al., 2011) ou a sua condição corporal e nutricional (SALES, 2011). É importante ressaltar que nesse estudo, as RS ingeriram mesma dieta que as vacas PL, o que supera sua necessidade de energia para mantença, tornando-as mais gordas e, provavelmente, causando alterações metabólicas como o quadro de resistência à insulina que pode causar prejuízos reprodutivos, dentre os quais a redução da qualidade oocitária (SALES, 2011).

Quando a TC foi analisada, houve interação entre categoria e estação do ano (P = 0,05; Figura 1.4). As três categorias apresentaram aumento (P < 0,0001) na TC durante o verão, mas este sempre foi inferior (P < 0,001) nas novilhas em relação às vacas, independentemente da estação. Como a temperatura ambiental máxima durante o verão atingiu 35°C, era esperado que houvesse aumento da temperatura cutânea em todas as categorias, uma vez que essa passa a ser a principal fonte de perda de calor. Essa afirmativa se baseia em estudo (MAIA; DASILVA; BATTISTON LOUREIRO, 2005) com vacas Holandesas no qual foi demonstrado que a perda de calor por evaporação cutânea é responsável por 20 a 30% da perda total de calor quando a temperatura ambiental varia de 10

a 20°C, subindo para aproximadamente 85% quando a temperatura do ar está acima de 30°C. O restante das perdas ocorre basicamente por evaporação respiratória.

Figura 1.4 - Temperatura cutânea (°C) de novilhas (Nov), vacas em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010



Em concordância com o aumento de FR e TR, tanto as vacas RS quanto PL do presente estudo apresentaram aumento da TC durante o verão. As novilhas, apesar da capacidade de manter sua FR e TR semelhantes durante ambas as estações, não foram capazes de manter a TC constante, apresentando aumento desse parâmetro clínico durante o verão (como as vacas). É sabido que a resposta fisiológica clássica ao aumento da temperatura corporal é a redistribuição do sangue, aumentando o fluxo sanguíneo para a pele (CHOSHNIAK et al., 1982), órgão responsável por cerca de 85% da perda de calor total (forma evaporativa) quando a temperatura ambiente ultrapassa 30ºC (MAIA; DASILVA; BATTISTON LOUREIRO, 2005). Essa alteração do fluxo sanguíneo em resposta ao estresse térmico ocorre em poucos minutos (KAMIJO; LEE; MACK, 2005) e tem como objetivo aumentar a perda de calor pela pele. No entanto, o aumento do fluxo sanguíneo para a periferia visando à termorregulação promove consequente redução do fluxo sanguíneo para os órgãos internos, incluindo àqueles que compõem o trato reprodutivo (como útero, ovários, cérvix e oviduto; (ROMAN-PONCE et al., 1978; LUBLIN; WOLFENSON, 1996). Em

coelhas em estresse térmico, por exemplo, houve redução de 20 a 30% do fluxo sanguíneo para o ovário, oviduto e cérvix enquanto o fluxo para a vagina aumentou em 40% (LUBLIN; WOLFENSON, 1996). Portanto, o aumento da TC pode refletir um estado de estresse térmico (inclusive nas novilhas) e é, provavelmente, consequência da redistribuição do fluxo sanguíneo para a pele visando à termorregulação.

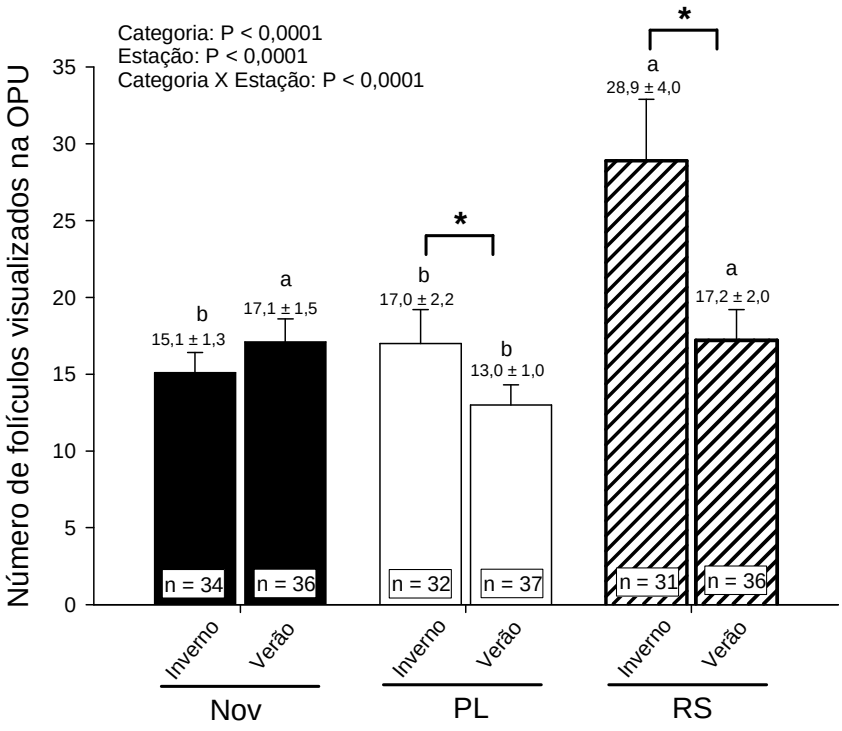
Outros estudos são indicativos que vacas de leite são capazes de manter sua temperatura corporal normal até que a TC exceda 35°C (POLLARD et al., 2005). Acima dessa temperatura, as vacas começam a reter o calor e a temperatura retal aumenta. Quando isso ocorre, o sistema de resposta ao estresse térmico é ativado, havendo rápido aumento da ativação de mecanismos evaporativos para a perda de calor (BERMAN, 2005; COLLIER et al., 2008). No presente estudo, no entanto, vacas com TC entre 33 e 34ºC já apresentaram elevação da TR e a ativação de outros mecanismos evaporativos de perda de calor, como a elevação da FR. Nas novilhas, apesar do aumento da TC no verão (ativação de mecanismos evaporativos de perda de calor pela pele), essa não superou 32ºC, o que não deve ter sido suficiente para aumentar a TR e a FR desses animais. Essa hipótese é fortalecida pela análise de correlação entre as três variáveis clínicas em questão. Em novilhas, não houve correlação entre TC e TR ($r = 3,7$; $P = 0,76$) e a correlação entre TC e FR foi muito baixa ($r = 36,2$; $P = 0,002$). Ao contrário, em vacas RS e PL houve alta correlação entre TC e TR ($r = 77,3$; $P < 0,0001$); TC e FR (59,6; $P< 0,0001$) e TR e FR ($r = 70,3$; $P< 0,0001$), apoiando a premissa que o aumento da TC dessas categorias seja suficiente para desencadear o aumento da TR e da FR. Essas correlações, no entanto, foram sempre maiores nas vacas PL em relação as RS (TC e TR: $r = 80,4$ e $P < 0,0001$ *vs* $r = 72,5$ e $P < 0,0001$; TC e FR: $r = 62,9$ e $P < 0,0001$ vs $r = 55,7$ e $P < 0,0001$), o que pode estar relacionado a sua mais alta produção de calor metabólico proporcional a produção leiteira, conforme discutido anteriormente (BERMAN et al., 1985; BERMAN, 2005).

Em suma, durante o verão as variáveis fisiológicas mensuradas de vacas RS e PL foram mais afetadas do que as de novilhas. Semelhante comportamento foi observado em um estudo prévio (SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002) no qual novilhas e vacas em lactação tiveram sua temperatura retal monitorada durante seis dias consecutivos no verão (entre a IA e a coleta de embriões). Nesse estudo, equações de regressão para a comparação da temperatura corporal à temperatura ambiental (entre 20 e 33°C, no momento da aferição da TR) foram estimadas utilizando-se dados de temperatura coletados de novilhas ($n = 654$ observações) e vacas ($n = 575$ observações). As vacas em lactação tiveram aumento da temperatura corporal mais intenso do que as novilhas em resposta ao mesmo aumento da temperatura ambiental.

Essa diferença de respostas à elevação de temperatura do verão provavelmente está relacionada com a reduzida capacidade termorregulatória das vacas lactantes, que por sua vez deve estar relacionada à alta taxa metabólica (alta produção de calor metabólico) associada à produção de leite.

O número de folículos visualizados no presente estudo (Figura 1.5) foi inferior ao relatado em dois estudos prévios conduzidos no Brasil com novilhas [22,1 ± 1,3; (GIMENES, 2010)] e vacas Holandesas não-lactantes [24,2 ± 1,1; (SALES, 2011)]. No entanto, no estudo de Sales (2011), como havia necessidade de se coletar quantidade suficiente de oócitos para as análises propostas, vacas com maior número de folículos visualizados foram selecionadas por avaliação ultrassonográfica para compor os grupos experimentais. Essa seleção pode ter influenciado o número de folículos visualizados, em função da alta repetitividade e previsibilidade na população folicular (BONI et al., 1997), o que pode justificar parcialmente a diferença entre os resultados desse experimento e outros dados da literatura, incluindo o presente estudo.

Figura 1.5 - Número de folículos visualizados nos ovários de novilhas (Nov), vacas em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010



Diferentemente do que foi previamente observado, no presente estudo o estresse térmico reduziu a quantidade de folículos visualizados nos ovários de vacas. No entanto, novilhas apresentaram semelhante população folicular em ambas as estações (Figura 7). Autores relataram que o número de folículos > 3 mm (TORRES-JUNIOR et al., 2008) ou de 3 a 5 mm (ROTH et al., 2000; ROTH et al., 2001a) não foi afetado pelo estresse calórico agudo em curto ou longo prazo. Putney et al. (1989) também não observaram diminuição no número de folículos ovulatórios (9,0±1,4) em animais superestimulados submetidos a estresse calórico agudo (42ºC/ 75%UR). No entanto, nesses estudos prévios os animais foram expostos a estresse térmico agudo, diferentemente da condição de estresse crônico a que as fêmeas do presente estudo estavam submetidas, o que pode explicar a diferença entre os resultados.

A aclimatação é um processo pelo qual os animais se adaptam a diferentes condições ambientais através de alterações comportamentais, hormonais e metabólicas que caracterizam os mecanismos homeoréticos utilizados por esses animais para sobreviverem em um novo "estado fisiológico". A alteração no perfil hormonal normalmente ocorre devido ao declínio e aumento dos hormônios anabólicos e catabólicos, respectivamente. Vacas de leite em balanço energético positivo possuem o eixo somatotrófico "acoplado" (*coupled*), o que é definido pela eficiente síntese e secreção de IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina tipo I) dependente de GH (hormônio de crescimento) pelo fígado, em resposta ao GH pituitário ou exógeno (BAUMAN; VERNON, 1993). No entanto, durante os períodos de balanço energético negativo (BEN), a concentração circulante de GH aumenta e a concentração de IGF-I plasmática cai, tornando a produção de IGF-I hepático em resposta ao GH exógeno insignificante (BAUMAN; VERNON, 1993). Esses dados são indicativos que o eixo somatotrófico se torna "desacoplado" (*uncoupled*) durante o BEN (BAUMAN; VERNON, 1993), situação normalmente encontrada nas vacas em início e pico de lactação.

Sabe-se que a IGF-I pode influenciar o número de folículos recrutados, o que é bastante evidente quando se administra bST tanto em vacas de corte (BURATINI et al., 2000) quanto de leite (GONG et al., 1997; KIRBY et al., 1997; CARRIQUIRY et al., 2009b). Portanto, no presente estudo, o maior número de folículos ovarianos observados durante o inverno nas vacas RS em relação às PL pode estar associado a sua condição de balanço energético positivo e a produção de IGF-I. Nas vacas PL, a redução dos níveis circulantes de IGF-I frente ao BEN possivelmente levou a redução da população folicular. É importante destacar que ambas as categorias de vacas estavam recebendo bST rotineiramente a cada 12 dias, o que pode ter gerado um fator de confundimento. Ou seja, o elevado número de folículos ovarianos observado em vacas RS durante o inverno deve ter influência da

administração de bST, as quais encontram-se em balanço energético positivo e são, portanto, mais responsivas a esse hormônio. Em vacas em início de lactação foi detectado potencial papel homeorético do FGF-21 via desacoplamento do eixo somatotrofina-IGF, o qual não foi alterado pela bST (CARRIQUIRY et al., 2009a). Com base nessa informação, pode-se assumir que vacas em BEN devam possuir resposta limitada ou nula (dependendo do grau de BEN) em termos de elevação da concentração de IGF-I quando bST é administrada, o que pode apoiar a menor população folicular observada nessa categoria em relação às RS no inverno. Em novilhas, a população folicular não foi maior provavelmente devido as reduzidas dimensões de seus ovários em relação a vacas e ao fato de não estarem recebendo bST.

Durante a hipertermia, o processo de aclimatação celular envolve a coordenação da responsividade celular a sinais endócrinos associados a alterações intrínsecas, conceito este bem ilustrado em recentes estudos com o eixo somatotrófico (RHOADS et al., 2009; RHOADS et al., 2010). Em estudos prévios há ainda contrassenso com relação à concentração de GH durante períodos de estresse térmico. Nem redução numérica (P=0,08) ou estatística (MITRA; CHRISTISON; JOHNSON, 1972; MCGUIRE et al., 1991) nem alteração na concentração de GH (RHOADS et al., 2009) foi relatada em vacas leiteiras em estresse térmico comparadas a vacas em ambiente termoneutro. No entanto, nesse último estudo, a concentração de IGF-I plasmático estava reduzida nas vacas em estresse térmico. Segundo os autores, essa redução provavelmente se deve à baixa responsividade hepática ao GH, já que baixo número de receptores GH foi encontrado no fígado e a sinalização desse hormônio via STAT-5 estava diminuída e consistente com a baixa abundância de mRNA para IGF-I observada em vacas em estresse térmico (RHOADS et al., 2010). É possível que a maior sensibilidade das vacas em lactação frente ao estresse térmico e a reduzida ingestão de matéria seca durante esse período tenham intensificado o BEN. Essa condição metabólica pode comprometer a responsividade hepática ao GH, resultando em menores concentrações de IGF-I, hormônio diretamente relacionado à quantidade e qualidade de folículos recrutados.

Com relação à OPU, foram coletados 2.176 oócitos totais (1.320 no inverno e 856 no verão), sendo que destes 1.685 (77,4%) foram considerados viáveis (1.030 no inverno e 655 no verão). Semelhantemente, Sales (2011) observou 74,1% (1.343/1.813) de oócitos viáveis provenientes de aspirações intrafoliculares de vacas Holandesas alimentadas com dieta de mantença ou alta energia. Gimenes (2010) relatou taxa de oócitos viáveis um pouco mais baixas quando novilhas Holandesas foram submetidas à OPU em diferentes dias após o início de um protocolo de sincronização da emergência da onda de crescimento folicular: 60,6% ± 4,2 (um dia), 62,0% ± 3,0 (três dias) e 68,0% ± 2,5 (cinco dias). Da mesma forma, o número

de oócitos totais (15,4 ± 1,2 e 22,8 ± 1,5) e viáveis (9,9 ± 0,9 e 19,3 ± 1,2) também foi maior nos estudos supracitados (Gimenes, 2008; Sales, 2011, respectivamente) em relação ao corrente. No entanto, em trabalhos de outros pesquisadores, também com gado Holandês, menor número de oócitos totais foi obtido (entre 2,8 a 7,0) comparado ao presente estudo (RIZOS et al., 2005; BILBY et al., 2006; LOPES et al., 2006; MERTON et al., 2009).

No presente estudo, novilhas e vacas tiveram número semelhante (*P* = 0,07) de oócitos totais e viáveis recuperados durante o inverno. No entanto, durante o verão esses números foram reduzidos (*P* < 0,0001) nas vacas (Figura 1.6 e Tabela 1.3), o que deve estar diretamente relacionado com a redução da população folicular desses animais durante o verão. Essa redução pode estar relacionada com a queda dos níveis circulantes de IGF-I durante o estresse térmico, conforme descrito previamente (RHOADS et al., 2010).

Figura 1.6 - Número de oócitos totais (A) e viáveis (B) obtidos por aspiração intrafolicular de novilhas (Nov), vacas em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010

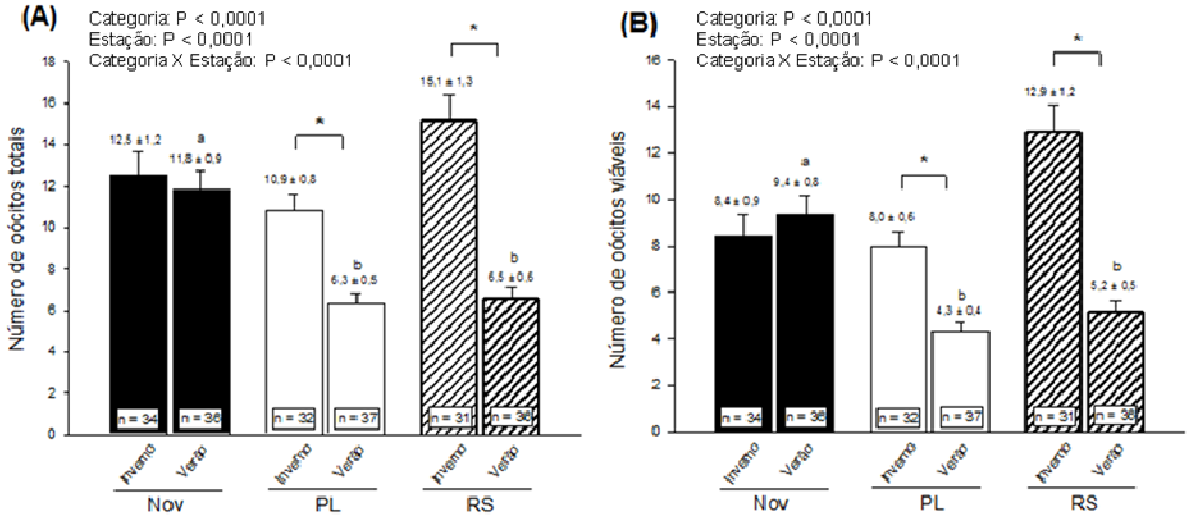


Tabela 1.3 - Número total de oócitos e número de oócitos viáveis recuperados de novilhas, vacas de alta-produção em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviços (RS) pela técnica de OPU durante o verão e o inverno. Águas de São Pedro e Descalvado, 2009 a 2010

	Categoria						P		
	Novilhas		PL		RS		Categoria	Estação	Cat.*Est.
	Total	Viáveis	Total	Viáveis	Total	Viáveis			
Inverno	12,51 ± 1,17 (n = 34)	8,43 ± 0,93 (n = 34)	10,86 ± 0,75[a] (n = 32)	8,00 ± 0,63[x] (n = 32)	15,14 ± 1,29[a] (n = 31)	12,87 ± 1,22[x] (n = 31)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Verão	11,82 ± 0,91[A] (n = 36)	9,36 ± 0,81[X] (n = 36)	6,30 ± 0,51[bB] (n = 37)	4,32 ± 0,41[yY] (n = 37)	6,51 ± 0,56[bB] (n = 36)	5,15 ± 0,50[yY] (n = 36)			

Valores apresentados como média ± E.P.M.
[A, B] Diferentes denota diferença na mesma linha (*P* < 0,0001)
[a, b] Diferentes denota diferença na mesma coluna (*P* < 0,0001)
[X, Y] Diferentes denota diferença na mesma linha (*P* < 0,0001)
[x, y] Diferentes denota diferença na mesma coluna (*P* < 0,0001)

8 CONCLUSÕES

As hipóteses do presente estudo foram parcialmente confirmadas. O estresse térmico afetou mais intensamente as variáveis clínicas e o número de folículos e oócitos coletados de vacas em relação a novilhas, porém essa alteração foi semelhante em vacas RS e PL. Os períodos escolhidos para a realização do presente estudo caracterizaram adequadamente situações de estresse térmico crônico e ausência de estresse, segundo os cálculos do ITU. Quando expostas a condições de estresse térmico crônico, vacas RS e PL apresentam maior elevação da TC do que novilhas. No entanto, apesar de haver aumento da TC durante o verão em todas as categorias, somente as vacas apresentaram aumento da TR e FR nessa estação. As novilhas foram capazes de manter a TR e FR semelhantes em ambas as estações. A alta correlação entre a TC, TR e FR encontrada nas vacas RS e PL apóia essa conclusão. De maneira semelhante, o número de folículos visualizados no dia da OPU e o número de oócitos totais e viáveis foram menores durante o verão nas vacas RS e PL e relação às novilhas.

Em suma, demonstrou-se no presente capítulo que vacas em lactação RS e PL são mais susceptíveis ao estresse térmico do que novilhas, aumentando sua TC, TR e FR e reduzindo o número de folículos e oócitos coletados nas sessões de OPU durante o verão.

CAPÍTULO II

O estresse térmico in vivo afeta a produção in vitro de embriões de vacas repetidoras de serviço comparativamente a novilhas e vacas Holandesas próximas ao pico de lactação

Dados publicados em *Journal of Dairy Science* 94(5):2383-92, 2011

9 JUSTIFICATIVA

O sucesso das técnicas de OPU-PIVE está diretamente relacionado à competência dos oócitos para a produção de embriões *in vitro.* Sabe-se que o estresse térmico tem o potencial de comprometer a qualidade oocitária tanto *in vitro* quanto *in vivo*, reduzindo sua capacidade de desenvolvimento até o estádio de blastocisto após a FIV. É reconhecido que vacas RS causam grande prejuízo econômico devido à sua menor fertilidade. Há evidências que RS tenham comprometimento da qualidade de seus oócitos e que durante o verão também haja redução da sua fertilidade. No entanto, não se sabe se os efeitos deletérios do estresse térmico sobre o oócito são mais intensos nessa categoria.

No presente capítulo, os 80% dos oócitos coletados de vacas RS, PL e novilhas durante o verão e o inverno (Capítulo I) foram direcionados para a PIVE para gerar evidências da ação do estresse térmico sobre a qualidade dos gametas de RS comparativamente as demais categorias. Para auxiliar essa avaliação, os embriões produzidos foram fixados e corados para a realização da contagem do número de células totais e cálculo da frequência de núcleos fragmentados dos embriões produzidos.

10 MATERIAIS E MÉTODOS

10.1 LOCAL E PERÍODO DE EXECUÇÃO

Toda a PIVE foi realizada em parceria com a empresa VITROGEN Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução S/C Ltda, na unidade Cravinhos (21º20'25" S / 47º43'46" O), sob supervisão da Dra. Yeda Fumie Watanabe, durante o período de março de 2009 a março de 2010. A contagem de células embrionárias e núcleos fragmentados foi realizada de maio a setembro de 2010, no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Universidade de São Paulo, Câmpus de Pirassununga, sob supervisão do Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles e do pós-doutorando Marcos Roberto Chiaratti. Todas as técnicas propostas para esta fase são rotineiramente realizadas no laboratório em questão.

10.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

10.2.1 Maturação *in vitro*

No laboratório de PIVE, os COCs foram lavados em meio de maturação TCM 199 (Gibco Life Technologies) suplementado com bicarbonato, 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 µg/mL piruvato, 50 µg/mL gentamicina, 0.5 µg/mL hormônio folículo estimulante (FSH; Folltropin, Vetrepharm, Belleville, ON, Canada), 50 µg/mL de hormônio luteinizante (LH; Ayerst, Rouses Point, NY), 1 µg/mL estradiol (Estradiol 17β; Sigma-Aldrich Chemical Co.), 50 µM de cisteamina e 0,3 mM de cistina] e colocados em uma placa de Petri contendo microgotas de 70 µl desse meio e coberto com óleo mineral estéril (D'Altomare, Sao Paulo, SP, Brazil), respeitando-se a relação de aproximadamente 20 COCs por gota. Cada gota apresentava oócitos de apenas um animal (unidade experimental). As placas foram mantidas em estufa durante 22 horas a 38,5ºC com 5% de CO_2 em ar e umidade saturada.

10.2.2 Fecundação *in vitro*

Uma hora antes do término do período de maturação, o sêmen (mesma partida de touro da raça Holandês Preto e Branco de fertilidade conhecida) começou a ser preparado para seu uso na fecundação *in vitro*. As palhetas de sêmen de 0,25 mL foram descongeladas em banho-maria a 35°C por 30 segundos e centrifugadas a 1200 rpm por 30 minutos em gradiente de Percoll (45 e 90%), para obtenção dos espermatozóides móveis e remoção do diluidor e do plasma seminal. O *pellet* formado foi pipetado, tomando-se o cuidado de retirar o máximo possível do Percoll, e seu volume foi calculado. Cinco µl deste *pellet* foram colocados em um microtubo com 250 µL de água para avaliação da concentração espermática em Câmara de Neubauer; outros cinco µL foram depositados em um microtubo com 250 µL de meio FIV (TALP acrescido de heparina, piruvato, gentamicina, BSA-FAF, LH e solução de PHE), para observação da motilidade espermática em microscópio óptico. A partir destes dados (motilidade final, concentração de espermatozóides e do volume do pellet) foi realizado o cálculo para a diluição do sêmen em meio FIV, de modo que a dose inseminante fosse de dois milhões de espermatozóides/ mL.

Durante a centrifugação do sêmen, a placa de maturação foi retirada da estufa para lavagem dos COCs em gotas de 200 µL de meio FIV. Os oócitos foram transferidos para a placa de FIV em gotas de 70 µL de meio FIV cobertas com óleo mineral. A deposição da dose inseminante (5 µL de sêmen) foi realizada em cada gota e as placas foram mantidas em estufa por 20 horas, sob as mesmas condições de atmosfera, umidade e temperatura empregadas para a MIV.

10.2.3 Cultivo *in vitro*

Após o período de fecundação, as estruturas foram transferidas para placa contendo gotas de 100 µL de hialuronidase 2%, onde foram desnudadas com auxílio de pipeta para retirada total das células do c*umulus*. Após o total desnudamento dos presumíveis zigotos, estes foram lavados em meio CR4 acrescido de 10% SBF e co-cultivados em uma monocamada de células da granulosa em gotas de 50 µL contendo o mesmo meio e cobertas

com óleo mineral. As placas de cultivo foram mantidas a 38,5°C com 5% de CO_2 em ar e umidade saturada.

10.2.4 *Feeding* e avaliação da taxa de desenvolvimento embrionário

As renovações de 50% do meio (*feeding*) foram realizadas 72 e 144 horas pós-fecundação. Três (D3), sete (D7) e oito (D8) dias pós-fecundação foram avaliadas as taxas de clivagem (número de estruturas clivadas/ número de oócitos viáveis), de blastocistos (número de blastocistos no D7/ número de oócitos viáveis) e de eclosão (número de blastocistos eclodidos no D8/ número de blastocistos no D7), respectivamente. Os embriões foram avaliados morfologicamente e classificados de acordo com os padrões da IETS (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998).

10.2.5 Controle de qualidade

Simultaneamente à PIVE com os oócitos aspirados das fêmeas Holandesas, oócitos provenientes de ovário de abatedouro foram maturados, fertilizados e cultivados, servindo como controle de qualidade dos meios e sêmen utilizados. Todos os procedimentos foram idênticos aos descritos acima, exceto a obtenção dos oócitos, que nesse caso foi realizada pela punção direta dos folículos visualizados nos ovários, utilizando-se seringa e agulha.

10.3 CONTAGEM DE NÚCLEOS TOTAIS E FRAGMENTADOS

No oitavo dia após a FIV, os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído 2%, e permaneceram refrigerados (4ºC) até a montagem das lâminas para a contagem de núcleos. A análise do número de núcleos fragmentados foi feita utilizando a técnica de TUNEL como sugerido pelo fabricante do *kit* In Situ Cell Death Detection (Roche Applied Science). O número total de núcleos foi obtido pela marcação com 10 µg/mL de Hoechst

33342 (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) diluído em PBS (1:10, 10 minutos no escuro). Após passar pelas duas marcações (TUNEL e Hoechst) os embriões foram colocados entre lâmina e lamínula contendo uma gota de 5 µL de Vectashield® (Vector Labs, EUA) e avaliados em microscópio de epifluorescência com dois filtros (Axioplan; Carl Zeiss, Zeppelinstrasse, Germany). O *software* AxioVs40 (V4.6.1.0; Carl Zeiss) foi utilizado para gerar e salvar as imagens. A porcentagem de fragmentação nuclear foi determinada como a razão entre as células TUNEL-positivas e o total de núcleos contados. Cada embrião de cada animal foi avaliado individualmente em cada estação.

10.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analysis* do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformados. As variáveis contínuas ou discretas como taxa de clivagem, taxa de blastocisto no D7, taxa de eclosão no D8, número de núcleos totais e taxa de fragmentação nuclear foram analisadas por ANOVA, usando o procedimento GLIMMIX do SAS, versão 9.2 (SAS.INSTITUTE, 2002-2003).

As variáveis incluídas no modelo inicial foram categoria, fazenda, estação (verão vs inverno), DEL, número de serviços prévios, temperatura retal, ECC e as suas interações. Para o modelo final de regressão logística, variáveis foram removidas com base nos critérios estatísticos de Wald por eliminação *backward* quando $P > 0.20$. As variáveis incluídas no modelo final estão apresentadas no Quadro 2.1.

Quadro 2.1 - Variáveis analisadas e incluídas modelo estatístico final utilizado

Item avaliado	Variáveis incluídas no modelo final
Taxa de clivagem	Categoria e estação
Taxa de blastocisto no D7	Categoria, estação e interação categoria-estação
Taxa de eclosão no D8	Categoria e estação
Número de núcleos totais	Categoria e estação
Taxa de fragmentação nuclear	Categoria, estação e interação categoria-estação

11 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dado que a repetição de serviços é um problema multifatorial e envolve diversos fatores extrínsecos e intrínsecos ao próprio animal, um experimento baseado em aspiração intrafolicular para a recuperação de oócitos permite o estudo de efeitos exercidos sobre o oócito até o momento da aspiração da doadora. Nesse contexto, esse estudo foca a avaliação de oócitos coletados por OPU de fêmeas RS da raça Holandesa, comparativamente a novilhas e vacas PL, durante o verão e inverno, com a finalidade de avaliar sua competência de desenvolvimento a blastocisto.

É importante salientar que houve contaminação de algumas gotas na PIVE, sendo que em alguns casos, a contaminação foi observada ao término do período de maturação e, em outros, na avaliação de clivagem. Nesses casos, os dados foram excluídos da análise final. Adicionalmente, alguns oócitos foram utilizados para análises de biologia molecular e, por esta razão, os cálculos referentes à PIVE foram realizados com base no número de estruturas viáveis enviadas ao laboratório de PIVE e não no total de oócitos viáveis aspirados.

O controle de qualidade com oócitos derivados de ovários provenientes de abatedouro foi eficiente tanto no verão quanto no inverno, mostrando não ter havido problemas de ordem técnica relacionados aos meios e ao sêmen empregados na PIVE (Tabela 2.1). Como os ovários eram provenientes de bovinos de corte, foi possível notar melhores taxas de desenvolvimento embrionário no verão, ao contrário do observado para as fêmeas leiteiras da raça Holandesa utilizadas nesse estudo. Isso se dá pelo fato de o verão ser a estação chuvosa da região em questão e, portanto, o momento de melhores pastagens e condição corporal e reprodutiva dos animais de corte criados extensivamente. Taxas um pouco mais baixas foram obtidas em trabalho recente (SALES, 2011) no qual também foram realizadas manipulações controle a partir de oócitos obtidos de ovários coletados em abatedouro (taxa de clivagem de 63,9 % e taxa de blastocisto de 30,8 %).

No presente estudo, a taxa de clivagem foi similar entre as categorias [RS = 41,9% ± 4,5 (n = 666); PL = 37,9% ± 5,1 (n = 390) e novilhas = 51,7% ± 4,5 (n = 375); P = 0,20] e as estações [inverno = 42,3% ± 3,4 (n = 979), verão = 45,8% ± 4,4 (n = 452); *P* = 0,50]. Essas taxas foram inferiores ao esperado, uma vez que foram reportadas para a raça Holandesa taxas entre 63 e 75% (SENEDA et al., 2001; PAULA-LOPES et al., 2003b; ESCALONA, 2008; PONTES et al., 2010). Contudo, taxas de clivagem inferiores às previamente relatadas, e,

portanto, mais próximas às do presente estudo, também foram descritas na literatura disponível para essa mesma raça [entre 38,8 e 61,3% (BILBY et al., 2006; GIMENES, 2010; SALES, 2011)]. Alguns autores (ESCALONA, 2008; GIMENES, 2010) justificam a baixa taxa de clivagem após a fecundação de oócitos de doadoras da raça Holandesa à menor resistência dos oócitos de raças taurinas ao estresse térmico. Dados da literatura apoiam essa afirmação, no qual oócitos de vacas zebuínas submetidos ao estresse térmico apresentam menor comprometimento da produção *in vitro* de embriões (PAULA-LOPES et al., 2003b). No entanto, no presente estudo, taxa de clivagem semelhante foi observada no verão e no inverno, o que é sugestivo da existência de outros fatores que devam estar comprometendo a divisão celular desses embriões.

Tabela 2.1 - Taxas de desenvolvimento embrionário de oócitos provenientes de abatedouro e fertilizados in vitro com sêmen de touro Holandês para controle de qualidade dos meios e sêmen utilizados do experimento. Cravinhos, 2009 a 2010

	Época		P
	Inverno (n = 453)	Verão (n = 582)	
Taxa de clivagem (D3)	73,7% ± 1,7	80,7% ± 1,5	0,003
Taxa de blastocisto (D7)	39,0% ± 2,9	45,4% ± 1,9	0,06
Taxa de eclosão (D8)	44,7% ± 6,4	36,4% ± 4,0	0,3

Nesse mesmo contexto, apesar de alguns trabalhos terem mostrado que o efeito sazonal também se expressa na taxa de fecundação ou clivagem (MONTY JR; RACOWSKY, 1987; ZERON et al., 2001; SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002), Putney et al. (1989) observaram que a taxa de fecundação *in vivo* foi similar para novilhas em estresse térmico ou em ambiente termoneutro. Esses autores concluíram que oócitos bovinos são capazes de responder à fecundação, iniciando o processo de clivagem apesar da elevação da temperatura corpórea, tal qual possa ter ocorrido no presente estudo e em prévios (ROCHA et al., 1998; RUTLEDGE et al., 1999; RIVERA et al., 2000; TORRES-JUNIOR et al., 2008). Há também trabalhos nos quais foi mencionado que após choque térmico *in vitro*, não houve alteração no desenvolvimento embrionário até a fase de oito a 16 células, porém houve diminuição na produção de blastocistos e na sua taxa de eclosão (EDWARDS; HANSEN, 1996; 1997; KRININGER et al., 2003; PAULA-LOPES et al., 2003a; BARROS et al., 2006).

Seguindo essa linha, apesar de taxas de clivagem semelhantes terem sido observadas no presente estudo, quando a taxa de blastocisto foi avaliada encontrou-se interação entre

categoria e estação (P < 0,0001; Figura 2.1 e Tabela 2.2), indicando que o efeito de estação foi dependente da categoria. A taxa de blastocisto das RS foi inferior (P < 0,0001) à de novilhas, independentemente da estação. Além disso, durante o verão, a taxa de blastocisto das RS caiu consideravelmente (P < 0,002) comparada ao inverno, tornando-se inferior à encontrada para as PL (P < 0,001).

Figura 2.1 - Taxa de blastocisto sete dias após a fecundação *in vitro* de oócitos de vacas repetidoras de serviço (RS), em pico de lactação (PL) e novilhas (Nov) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Cravinhos, 2009 a 2010

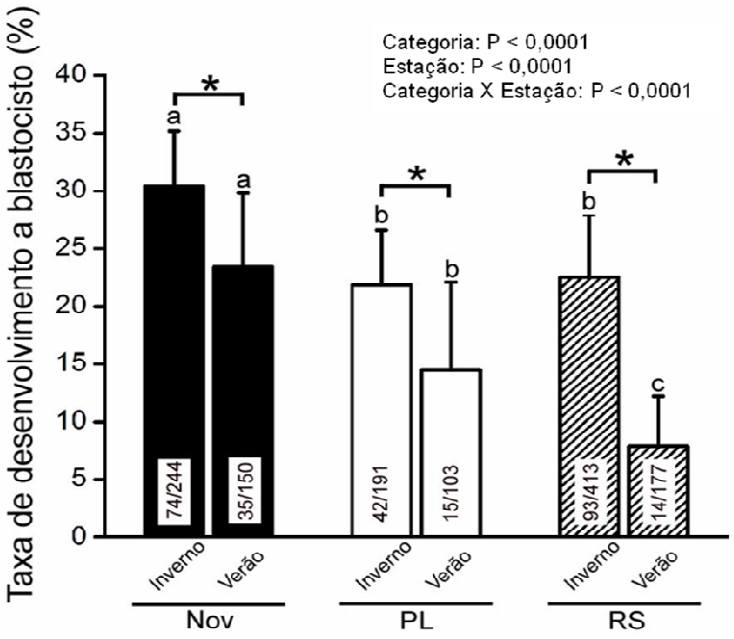


Tabela 2.2 - Taxa de blastocisto sete dias após a fecundação *in vitro* de oócitos de vacas repetidoras de serviço (RS), em pico de lactação (PL) e novilhas (Nov) da raça Holandesa, durante o verão e o inverno. Cravinhos, 2009 a 2010

	Categoria			P		
	Nov	Vaca PL	Vaca RS	Categoria	Época	Categoria x Época
Inverno	30,3%^{aA} (74/244)	22,0%^{aB} (42/191)	22,5%^{aB} (93/413)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Verão	23,3%^{bA} (35/150)	14,6%^{bB} (15/103)	7,9%^{bC} (14/177)			

Na mesma coluna - a ≠ b, P < 0,0002; na mesma linha - A ≠ B, P < 0,0001

Particularmente no verão, a taxa de blastocisto de RS foi praticamente metade da taxa observada para vacas PL e um terço da taxa obtida para novilhas. Esse resultado é sugestivo que os oócitos recuperados de vacas RS tinham qualidade severamente comprometida. Conforme exposto abaixo, essa perda de competência oocitária foi confirmada pela alta taxa de fragmentação nuclear (taxa de células TUNEL-positivas) observada nos blastocistos de RS, o que está diretamente ligado a baixa capacidade do embrião passar pelo processo de implantação com sucesso e se desenvolver a termo (FABIAN; KOPPEL; MADDOX-HYTTEL, 2005; EL-SAYED et al., 2006). Por outro lado, durante o inverno não foi observado grande comprometimento na qualidade oocitária das RS. Nessa estação, apesar da taxa de blastocisto ter sido mais baixa quando oócitos de RS foram utilizados em comparação aos oócitos de novilha, não foi detectada diferença destes em relação aos oócitos de vacas PL.

Em estudos prévios mais recentes com PIVE a partir de oócitos de fêmeas bovinas da raça Holandesas foram relatadas taxas de blastocito de 17,5% [oócitos de abatedouro de vacas; (ESCALONA, 2008)], 14,1% [(OPU de novilhas; (GIMENES, 2010)], 12,1% [(OPU de vacas não lactantes; (SALES, 2011)] e 28,9% [(vacas criadas em regime de pastagem; (RATTO et al., 2011)]. As taxas obtidas por Escalona et al. (2008) se encontram ao redor das taxas obtidas para vacas PL (verão e inverno) e RS (inverno) no presente estudo. No entanto, tanto a taxa de blastocisto observada no estudo de Gimenes (2010) com novilhas quanto no estudo de Sales (2011) com vacas não lactantes são inferiores à alcançada no presente estudo.

Dados de fecundação *in vivo* e qualidade embrionária de vacas em lactação e novilhas Holandesas durante o verão apoiam os presentes achados (SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002). Nesse estudo, os autores relataram maior taxa de fecundação (100 *vs* 55,3%), maior porcentagem de embriões viáveis (71,9 *vs* 33,3%) e melhor qualidade dos embriões (2,2 ± 0,3 *vs*. 3.8 ± 0.4, em escala de 1 = ótimo a 5 = degenerado) coletados de novilhas em comparação a vacas. Assim, evidenciou-se a superioridade das novilhas em termos de desenvolvimento embrionário durante o verão.

Em estudo com vacas Gir (TORRES-JUNIOR et al., 2008) submetidas ou não a estresse térmico em câmara climática e posterior OPU para a PIVE, observou-se redução da taxa de blastocisto no grupo que passou pelo estresse, à semelhança dos dados do presente estudo. Além disso, os autores verificaram tendência de aumento na diferença entre os grupos controle e estresse térmico com o passar das sessões de OPU, evidenciando efeito tardio e duradouro mesmo após cessado o período de exposição ao estresse.

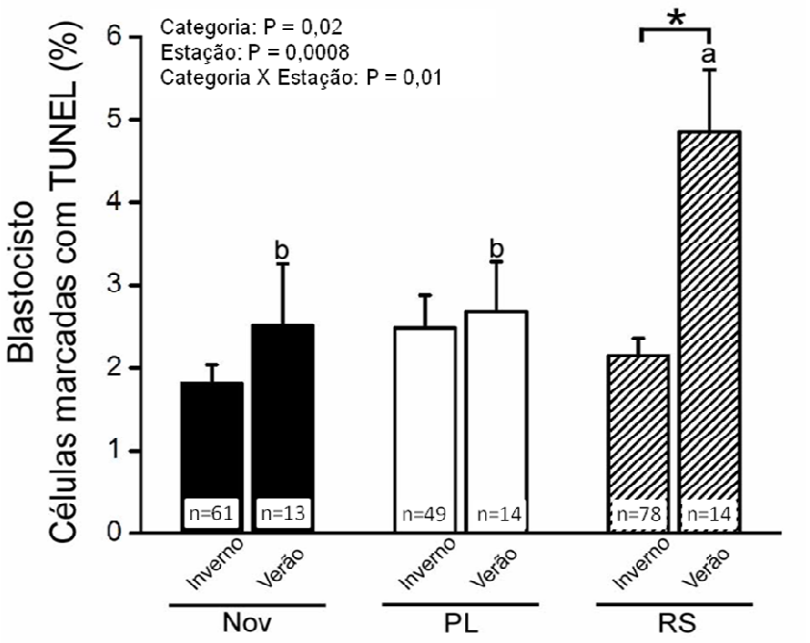
Com relação à taxa de eclosão e o número de células dos blastocistos produzidos, não houve interação entre categoria e estação (P = 0,3), possibilitando o agrupamento dos dados.

A taxa de eclosão foi semelhante entre as categorias (19,3%, n = 288; P = 0,20), mas reduziu durante o verão (23,0%, n = 218 vs. 6,5%, n = 70; P = 0,03). O número de células embrionárias foi menor em vacas RS (207,0 ± 8,3) e PL (202,5 ± 9,9) do que em novilhas (253,0 ± 12,2; P = 0,001), independentemente da estação. Além disso, durante o verão, o número de células dos blastocistos produzidos foi reduzido em relação ao inverno (230,6 ± 6,8 vs. 175,0 ± 9,0; P = 0,0005), independentemente da categoria. Resultado semelhante foi relatado por Sartori et al. (2002), que encontraram número de células embrionárias superior em embriões coletados de novilhas em comparação aos de vacas em lactação durante o verão.

Assim como a taxa de blastocisto, a qualidade dos blastocistos das RS foi comprometida, em relação àqueles de novilhas e vacas PL, durante o verão (P = 0,01), conforme evidenciado pela porcentagem de células TUNEL-positivas desses embriões. No entanto, durante o inverno, a porcentagem de núcleos fragmentados foi semelhante entre as três categorias (*P* = 0,3; Figura 2.2).

Medidas como taxa de eclosão e contagem de núcleos são bons indicadores de qualidade embrionária na PIVE. No entanto, em Holandesas há poucos trabalhos nos quais foram avaliadas as taxas de eclosão ou número de núcleos. Bilby et al. (2006) encontraram porcentagens de blastocistos eclodindo e eclodidos oito dias após a FIV variando de aproximadamente 3 a 12%, muito inferiores às observadas no presente estudo durante o inverno, provavelmente devido à precocidade na avaliação realizada por este autor. Entretanto, taxas de eclosão oito dias após a FIV semelhantes às do presente estudo foram descritas recentemente (GIMENES, 2010) para novilhas Holandesas (24,9 ± 7,1). Quanto ao número de núcleos, resultados bastante divergentes foram encontrados, relacionados possivelmente a diferenças na qualidade dos oócitos para a produção *in vitro* ou do tipo de sistema utilizado em comparação ao presente estudo. Fouladi-Nashta et al. (2007) realizaram contagem diferencial em embriões com oito dias de cultivo e obtiveram entre 132,5 e 150,5 núcleos totais (sendo entre 98,6 e 114,0 células do trofectoderma e 33,8 e 36,4 células da massa celular interna), valor inferior ao observado no presente estudo em ambas as estações (inverno: 231 ± 7 *vs*. verão: 253 ± 12) e nas três categorias (novilhas: 253 ± 12^{a} *vs* PL: 203 ± 10^{b} e RS: 207 ± 8^{b}; p<0,01). O número de núcleos totais registrado para novilhas do estudo corrente também foi superior ao relatado por Gimenes (2011; 168,9 ± 13,7).

Figura 2.2 - Porcentagem de células TUNEL-positivas em blastocistos oito dias após a fecundação *in vitro* de oócitos de novilhas (Nov), vacas em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS) da raça Holandesa, no verão e inverno. Diferença de médias (± E.P.M.) na mesma estação (a ≠ b) e na mesma categoria (*). Pirassununga, 2010



Em suma, pronunciado efeito de estresse térmico foi observado na competência oocitária de desenvolvimento a blastocisto das vacas RS. Os resultados obtidos são sugestivos de que a baixa produção de embriões das RS durante o verão possa estar relacionada com um severo comprometimento da qualidade desses gametas. Destaca-se, no entanto, que nas três categorias a taxa de blastocisto foi reduzida no verão. Como tanto novilhas quanto vacas tiveram mecanismos de termorregulação (aumento da TC) ativado de forma mais ou menos eficiente (refletido pela TR e FR) é provável que todas tenham passado pelas alterações de fluxo sanguíneo discutidas no capítulo anterior. Assim, pode-se especular que o resultado da redistribuição do fluxo sanguíneo durante o estresse térmico tenha levado a redução da perfusão vascular dos ovários e, consequentemente, dos folículos aspirados na OPU, acarretando em comprometimento da função oocitária e subsequente redução da taxa de desenvolvimento embrionário após a FIV.

12 CONCLUSÕES

As hipóteses do presente estudo foram confirmadas. Vacas RS que passaram por OPU durante o verão para a coleta de oócitos apresentaram menores taxas de blastocisto (PIVE) do que vacas PL e novilhas cujos folículos foram aspirados nessa estação. Apesar das taxas de blastocisto serem reduzidas durante o verão em todas as categorias, vacas RS apresentaram queda mais intensa dessa taxa, que comparativamente, foi cerca de metade da taxa observada para vacas PL e um terço da observada para novilha. Além disso, independentemente da estação, a taxa de blastocisto de vacas RS sempre foi inferior à de novilhas.

Durante o estresse térmico menor número de núcleos totais nos blastocistos produzidos *in vitro* foi obtido, independentemente da categoria, o que está parcialmente de acordo com nossas hipóteses. Além disso, durante o verão foi registrada maior porcentagem de núcleos fragmentados nas RS em relação às novilhas. Em conjunto, os dados geram evidências que os efeitos deletérios do estresse térmico na qualidade oocitária, apesar de presentes em todas as categorias, são mais intensos em vacas RS.

CAPÍTULO III

O estresse térmico in vivo afeta o conteúdo de mtDNA e a expressão de alguns genes de oócitos de vacas repetidoras de serviço comparativamente a novilhas e vacas Holandesas próximas ao pico de lactação

13 JUSTIFICATIVA

Informações que relacionem a baixa fertilidade de vacas RS a problemas na qualidade de seu oócitos e os mecanismos possivelmente envolvidos em sua reduzida competência oocitária são extremamente escassos. Ainda, apesar de muitos estudos terem demonstrado efeito evidente do estresse térmico sobre a capacidade de desenvolvimento oocitário após a FIV, os mecanismos exatos pelos quais o oócito é comprometido também permanecem obscuros.

Neste capítulo, 20% dos oócitos coletados de novilhas, vacas PL e RS durante o verão e o inverno foram direcionados para análises biomoleculares para gerar evidências sobre a existência de alguma relação entre a qualidade oocitária e o seu conteúdo de mtDNA, a expressão de genes envolvidos em sua replicação e transcrição, na apoptose e na resposta ao estresse térmico.

14 MATERIAIS E MÉTODOS

14.1 LOCAL E PERÍODO DE EXCECUÇÃO

Todas as análises biomoleculares referentes à quantificação de mtDNA e à expressão de genes relacionados ao estresse térmico, apoptose e transcrição/replicação de mtDNA foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, sob supervisão do Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles e do pós-doutorando Marcos Roberto Chiaratti, durante os meses de maio de 2009 a novembro de 2011. As técnicas propostas para esta fase são rotineiramente realizadas no laboratório em questão.

14.2 ANÁLISE RELATIVA DA QUANTIDADE DE mtDNA E DE TRANSCRITOS DOS OÓCITOS

14.2.1 Construção do controle externo

As perdas de DNA oriundas da extração foram consideradas por uso de um controle externo. Para tanto, um fragmento de DNA de extensão igual a 345 pb e sem similaridade com o genoma bovino foi obtido a partir de *Taenia saginata* como já descrito (Benitez et al. 1996; Lightowlers et al. 1996; Gauci et al. 2006). Este fragmento foi purificado (Kit GFX, Amersham Biosciences) e inserido num vetor bacteriano (Kit pET-29A, Novagen, Madison, WI, USA). Em seguida, o vetor contendo o inserto foi utilizado para transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) tratadas para competência com $CaCl_2$ (Sambrook e Russel, 2001). As bactérias transformadas cresceram por uma hora em 1 mL de meio LB Broth (USB, Cleveland, Ohaio, EUA) a 37°C, e então foram plaqueadas em ágar com LB Broth mais IPTG, x-Gal e ampicilina, de acordo com as recomendações do fabricante (pGEM-T Vector System). Após 12 a 24 horas de crescimento, uma colônia branca foi selecionada e cultivada em 10 mL de meio LB com ampicilina por mais 12 a 24 horas e em

seguida foi realizada a mini-preparação (kit Flexiprep, Amersham Pharmacia Biotech). O plasmídeo foi aliquotado num volume de cinco µL à concentração de 0,25 ng/µL e estocado à -20°C.

14.2.2 Extração de DNA e RNA

O DNA genômico e o RNA foram extraídos a partir de cada oócito isoladamente, utilizando-se o *kit* TRIzol (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante com pequenas modificações. Brevemente, foi adicionado por amostra um *mix* contendo 100 µL do reagente TRIzol, 1 ng do controle externo, 5 µg de água ultrapura (tratada com pirocarbonato dietileno) e 5 µg de acrilamida linear (Ambion Inc., Austin, TX) como carreador de RNA (Sambrook e Russel, 2001).

Para a extração do RNA, a fase inorgânica do reagente TRIzol foi isolada e dissolvida em 10 µL de solução de DNase (Invitrogen) e 1 unidade/µL de RNase OUT, conforme sugerido pelo fabricante, para a degradação do DNA e conservação do RNA amostral. Finalmente, o RNA foi imediatamente transcrito em DNA complementar (cDNA) utilizando o *kit* High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Este *kit* utiliza *primers* randômicos para a conversão do RNA total em cDNA. O cDNA produzido foi armazenado à -20°C até o momento da análise dos transcritos alvo.

Para a extração do DNA, ambas, interfase e fase orgânica do TRIzol, foram utilizadas. Novamente, 5 µg de acrilamida linear foram adicionados a estas fases para carrear o DNA. O DNA extraído foi dissolvido em 20 µL de hidróxido de sódio 8 mM. Para o ajuste do pH, 1,72µL de HEPES 0,1M foi adicionado, seguido da adição de 3,3µL de água ultrapura para atingir o volume final de 25µL. As amostras foram utilizadas imediatamente para a análise quantitativa PCR (qPCR), para evitar a degradação do DNA.

14.2.3 Determinação da quantidade relativa de cDNA

Os transcritos alvo de interesse pertenciam a duas categorias: codificados pelo núcleo (genômicos) e codificados pela mitocôndria (genes mitocondriais). Os genes nucleares foram *HSPA1AB* (Heat shock 70kDa protein 1AB), *HSP90AA1* [Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic)], *BAX* (BCL-2-associated X protein), *BCL2* (B-cell lymphoma 2), *ITM2B* (Integral membrane protein 2B), *NRF1* (nuclear respiratory factor 1), *POLG* [polymerase (DNA directed), gamma], *POLG2* [polymerase (DNA directed), gamma 2], *PPARGC1A* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) e *TFAM* (mitochondrial transcription factor A). Para avaliar a razão BAX/BCL2, o BAX foi expresso em relação ao BCL2. O gene mitocondrial analisado foi o *MT-CO1* (mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I).

Como referência endógena foram inicialmente propostos os genes *HIST1H2AG* (histona), o *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e *ACTB* (beta-actina), os quais foram analisados utilizando o qBase Plus v. 2.3 (Biogazelle, 2008), como sugerido previamente (VANDESOMPELE et al., 2002).

Antes da amplificação por qPCR, o cDNA dos transcritos para os genes de interesse foi pré-amplificado utilizando-se o *kit* Taqman PreAmp Master Mix (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante. Brevemente, para cada amostra, uma reação de 10µL foi preparada contendo 45 nM de cada primer (HSPA1AB, HSP90AA1, BAX, BCL2, ITM2B, NRF1, POLG, POLG2, PPARGC1A, TFAM, MT-CO1, HIST1H2AG, GAPDH e ACTB), 1 X TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) e 4µL do cDNA (amostra). Esse mix foi submetido a 20 ciclos térmicos e armazenado a -20°C até o uso. A linearidade da pré-amplificação de todos os transcritos estudados foi confirmada como sugerido pelo fabricante do kit.

A quantificação do cDNA foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real e o equipamento ABI-7500 (Applied Biosystems). Para isso o *kit* Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) foi empregado. As reações foram feitas utilizando-se ensaios TaqMan (Applied Biosystems) baseados na amplificação com *primers*, porém com uso de sondas para detecção da quantidade de DNA amplificado. Os *primers* selecionados para avaliar a expressão dos genes alvos foram desenhados pelo serviço de *Assays-by-Design* (Applied Biosystem) a partir de sequências obtidas do banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências dos *primers* e as *probes* utilizadas estão apresentadas no quadro 3.1.

Quadro 3.1 - *Primers* e *probes* para ensaios TaqMan usados para a PCR quantitativa. Pirassununga, 2010 a 2011 (continua)

Ensaio alvo (Genebank)	Primer ou probe	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
ACTB (NM_173979.3)	ACTB-f	GGCACCCAGCACAATGAAGA	67
	ACTB-r	GCCAATCCACACGGAGTACTT	
	ACTB-FAM	FAM-TCAAGATCATCGCGCCCCC-NFQ[1]	
GAPDH (NM_001034034.1)	GAPDH-f	CCACTCCCAACGTGTCTGTT	84
	GAPDH-r	GCTTCACCACCTTCTTGATCTCATC	
	GAPDH-FAM	FAM-CTTGGCAGGTTTCTCC-NFQ	
HIST1H2AG (NM_001098720.1)	HIST1H2AG-f	CGGTGCTGGAATACCTGACA	120
	HIST1H2AG-r	GATGATGCGGGTCTTCTTGTTG	
	HIST1H2AG-FAM	FAM-CCAGCTCTAAGATCTC-NFQ	
PPARGC1A (NM_177945.3)	PPARGC1A-f	ACCATGCAAACCATAATCACAGGAT	82
	PPARGC1A-r	CTCTTCGCTTTATTGCTCCATGAAT	
	PPARGC1A-FAM	FAM-CTCGGTCTTAACAACTGC-NFQ	
NRF1 (NM_001098002.1)	NRF1-f	CTGTCGCCCAAGTGAATTATTCG	67
	NRF1-r	TGTAACGTGGCCCAGTTTTGT	
	NRF1-FAM	FAM-TCCACCTCTCCATCAGCC-NFQ	
POLG (XR_028572.2)	POLG-f	CAGCCATCGAGTCCCTGTAC	103
	POLG-r	CTGTCGGACAGCAGGAACTC	
	POLG-FAM	FAM-ACAGGCAGACCTTTCC-NFQ	
POLG2 (NM_001075191.1)	POLG2-f	CTTCTGGGAAACTACGGGAGAAC	84
	POLG2-r	GTAGCCTCTTGTTTACCAGATCCA	
	POLG2-FAM	FAM-CAAGGCACCGTGAAGAA-NFQ	

TFAM (NM_001034016.2)	TFAM-f	TTGGAAAAAGAAATCATGCAGAAACGT	96
	TFAM-r	TGAGCGAGGTCTTTTCGGTTTT	
	TFAM-FAM	FAM-CCAAGCATTGTTAACTCTCTCT-NFQ	
MT-CO1 (NC_006853.1)	MTCO1-f	GATCCGTAATAATTACCGCCGTACT	85
	MTCO1-r	TTCCGGTCTGTTAATAGCATTGTGA	
	MTCO1-FAM	FAM-CCGGCTGCTAATACAG-NFQ	
BCL2 (XM_586976.4)	BCL2-f	GCACCTGCACACCTGGAT	72
	BCL2-r	CGCATGCTAGGGCCATACAG	
	BCL2-FAM	FAM-AAGGCGTCCCAGCCTC-NFQ	
BAX (NM_173894.1)	BAX-f	GTTGTCGCCCTTTTCTACTTTGC	89
	BAX-r	CAGCCCATGATGGTCCTGATC	
	BAX-FAM	FAM-CTGGTGCTCAAGGCCCTGT-NFQ	
ITM2B (NM_001035093.1)	ITM2B-f	GTCCCAGAGTTTGCAGATAGTGA	104
	ITM2B-r	GGAATCACATAGCACTTATCCAGGTT	
	ITM2B-FAM	FAM-CATGACTTCAACAAGAAACT-NFQ	
HSP90AA1 (NM_001012670.1)	HSP90AA1-f	GACACATGCCAACAGGATCTACA	86
	HSP90AA1-r	CGGCGCTGCTGTCATC	
	HSP90AA1-FAM	FAM-CTTGGTCTCGGTATTGAC-NFQ	
*HSPA1A+HSPA1B** (NM_174550.1) (NM_203322.2)	HSPA1AB-f	CGCGAAGCGGCTGATC	83
	HSPA1AB-r	CGTTGATGACGCGGAAAGG	
	HSPA1AB-FAM	FAM-CCGGGTCTCCGAACTT-NFQ	

*Denominado *HSPA1AB* no presente estudo

Todos os genes de cada amostra específica foram sempre amplificados na mesma placa de PCR. As condições aplicadas para a amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos seguida de 40 ciclos de 95 °C por 20 segundos e 60° C por um minuto. As condições de amplificação de cada transcrito proposto foram ajustadas previamente às análises. A análise da quantidade de cada transcrito alvo foi realizada como sugerido pelo fabricante do equipamento de PCR em tempo real (Applied Biosystems).

14.2.4 Determinação da quantidade relativa de mtDNA

A quantidade de mtDNA foi determinada relativamente a um controle externo. Para tanto, a mesma metodologia e reagentes descritos acima para quantificação dos transcritos foram utilizados. A amplificação do mtDNA foi realizada com o seguinte ensaio: *primer* senso (5'-3') GCC CTA GAA CAG GGC TTA GT e anti-senso (5'-3') GGA GAG GAT TTG AAT CTC TGG em presença da sonda (5'-3') AAG GTG GCA GAG CCC GGT AAT TGC portadora do fluorocromo *reporter* FAM (6-carboxi-fluoresceína), ligado à extremidade 5', e do *quencher* BHQ1 ligado à extremidade 3'. Estes *primers* foram desenhados para amplificar uma sequência de 87 pb do RNA ribossômico 16S (MT-RNR2) completamente conservada no mtDNA de *B. taurus* e *B. indicus*, com base em sequências disponíveis no GenBank (códigos de acesso: AY526085 e AY126697, respectivamente). A reação de amplificação do mtDNA de volume final igual a 20 µL foi composta por 0,9 µM de cada *primer*, 0,25 µM de sonda, 10 µL de 1x Master Mix (kit Gene Expression Master Mix) e o equivalente a 20% do total de DNA recuperado de cada amostra. Para amplificação do controle externo, foram utilizados os mesmos *primers* descritos acima (item *Construção do controle externo*). A reação de amplificação deste foi realizada também num volume final de 20 µL composto por 0,2 µM de cada *primer*, 10 µL de 1 x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o equivalente a 6% do total de DNA recuperado de cada amostra. Ambos, mtDNA e controle externo, foram amplificados em paralelo numa mesma placa utilizando os seguintes ciclos térmicos: 95°C por 15 minutos seguido por 40 ciclos a 95°C por 20 segundos e 63° C por 1 minuto. Ao final de cada ciclo foi realizada a leitura de fluorescência. A análise da quantidade de mtDNA relativa ao controle externo foi realizada como sugerido pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems).

14.3 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE mtDNA

14.3.1 Preparo das amostras e da curva padrão

Para a quantificação do mtDNA os oócitos foram individualmente lisadas utilizando a metodologia descrita por Wai et al. (2008). Brevemente, as amostras foram submetidas a três ciclos de aquecimento (95 °C por 5 min) e resfriamento (em nitrogênio líquido por 3 minutos) e, posteriormente, centrifugadas para a mensuração do volume final do lisado.

A curva padrão utilizada para a quantificação absoluta de mtDNA foi preparada usando um fragmento de 703 pb compreendendo parte dos genes MTRNR2, MT-TL1 e MT-ND1. Esse fragmento foi obtido por amplificação por PCR em uma reação de 50µL contendo 0,5 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dinucleotídeo trifosfato (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl2 (Invitrogen), tampão de PCR 1X (Invitrogen), 0,01 U/µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 1 ng/µL do DNA genômico extraído de células sanguíneas brancas (CHIARATTI; MEIRELLES, 2006). As condições utilizadas nos ciclos de amplificação foram as seguintes: (1) desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, (2) 40 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por um minuto e (3) extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto do PCR foi purificado utilizando o gel *Wizard SV* e o sistema *PCR Clean-up* (Promega, Madison, WI) e, posteriormente, clonado utilizando o *kit* de clonagem *TOPO TA* (Invitrogen). O plasmídeo contendo o fragmento de mtDNA foi purificado usando a mini-preparação *Wizard Plus SV* (Promega). A concentração de cópias de DNA do plasmídeo foi determinada usando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) e uma solução estoque preparada com 0,2 X 10^9 cópias/lL. Essa solução estoque foi armazenada a -20°C em alíquotas únicas até a utilização.

14.3.2 Determinação da quantidade absoluta de mtDNA

A quantificação absoluta do mtDNA foi feita segundo a metodologia de PCR em tempo real e o equipamento ABI-7500 (Applied Biosystems), conforme descrito por Chiaratti et al. (2010), com pequenas modificações. Brevemente, um ensaio TaqMan foi desenvolvido

para amplificar um fragmento de 87 pb do RNA ribossômico 16S do mtDNA (MTRNR2), que é completamente conservado entre *B. taurus* e *B. indicus*.

A reação de amplificação do mtDNA de volume final igual a 20 µL foi composta por 0,9 µM de cada *primer*, 0,25 µM de sonda, 10 µL de 1x Master Mix (kit Gene Expression Master Mix) e o equivalente a 20% do total de DNA recuperado de cada amostra. A reação de amplificação do mtDNA de volume final igual a 20 µL foi composta por 0,9 µM de cada *primer*, 0,25 µM de sonda TaqMan, 10 µL de 1x Master Mix (kit Gene Expression Master Mix) e 1µL do DNA recuperado de cada amostra. As amostras foram sempre analisadas em duplicata e a média da duplicata foi usada para a quantificação. Curvas padrão foram sempre amplificadas paralelamente às amostras utilizando cinco diluições seriadas de 1:10 (10^3 – 10^7 cópias) do padrão. Esse ensaio TaqMan possui 100% de eficiência de amplificação. Baseado nos valores da curva padrão, foi possível quantificar o número inicial de cópias de mtDNA de cada amostra, utilizando o *software* SDS (V2.3; Applied Biosystems). O valor final de número de cópias de mtDNA foi corrigido pelo volume do lisado.

14.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analysis* do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformados. As variáveis contínuas como a expressão de cada gene, o número relativo de cópias de mtDNA e a relação BAX/BCL2 foram analisados por ANOVA, usando o procedimento GLIMMIX do SAS, versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

As covariáveis incluídas no modelo inicial foram animal, TR, TC, FR, categoria, estação, fazenda e as suas interações. As variáveis classificatórias foram categoria e estação (verão vs inverno). Para o modelo final de regressão logística, variáveis foram removidas com base nos critérios estatísticos de Wald por eliminação *backward* quando $P > 0.20$. As variáveis incluídas no modelo final foram: categoria e estação (verão vs inverno).

O número absoluto de cópias de mtDNA foi analisado por ANOVA, usando o procedimento GLIMMIX do SAS, versão 9.2. Quando houve efeito significativo da variável, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando-se significância quando $P < 0,05$.

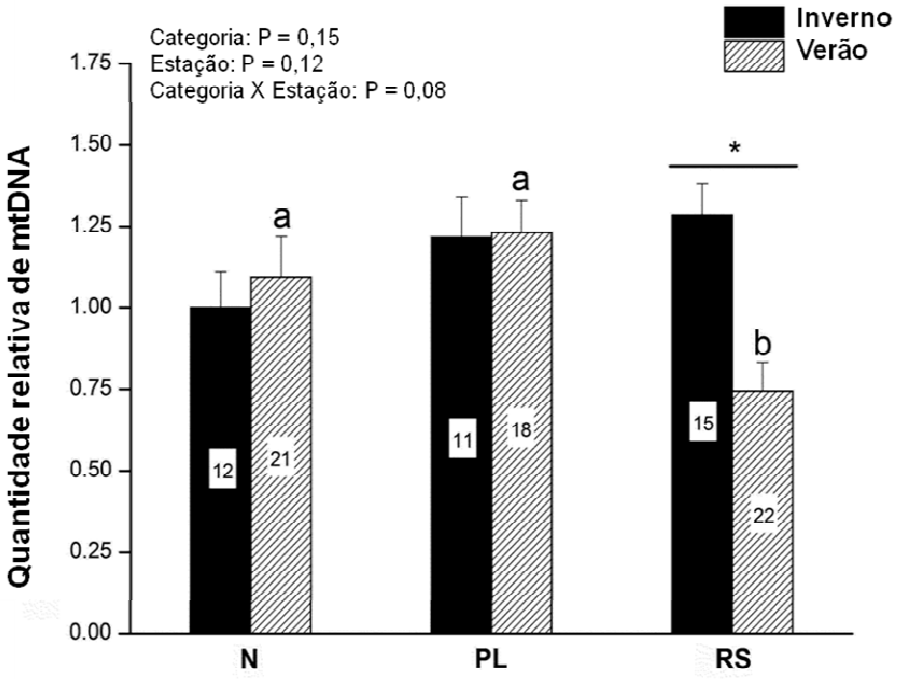
15 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dado que o número de cópias de mtDNA foi reportado como um possível marcador de viabilidade oocitária, a avaliação desta variável tornou-se um dos focos do presente estudo. Nesse contexto, visou-se determinar se a baixa competência dos oócitos coletados de vacas RS da raça Holandesa estaria relacionada ao seu reduzido conteúdo de mtDNA, comparativamente a novilhas e vacas PL. Assim, parte dos oócitos imaturos que foram coletados dos ovários de fêmeas dessas três categorias, durante o verão e o inverno (Capítulo I dessa tese) foram avaliados quanto ao conteúdo de mtDNA. Todas as avaliações foram feitas com oócitos únicos. Os resultados obtidos estão parcialmente de acordo com as hipóteses pré-estabelecidas, uma vez que a redução do número de cópias de mtDNA foi observada exclusivamente nos oócitos coletados de vacas RS durante o verão. Assim, pode-se dizer que durante o verão, oócitos de vacas RS continham menor conteúdo de mtDNA do que oócitos de novilhas (P = 0,01) ou de vacas PL (P = 0,0008; Figura 3.1). Além disso, considerando-se apenas a categoria RS, houve uma redução de 1,72 vezes (P = 0,0004) no conteúdo de mtDNA dos oócitos quando estes foram coletados durante o verão em relação ao inverno (Figura 1). Esse resultado é sugestivo de que haja maior comprometimento na qualidade dos gametas de RS durante o verão do que nas demais categorias.

Sabe-se que o mtDNA codifica 13 dos 80 polipeptídios envolvidos na OXPHOS, além de 22 tRNAs e 2 rRNAs envolvidos no processo de tradução dos mRNAs mitocondriais (LARSSON; CLAYTON, 1995). Em outras palavras, a função mitocondrial depende de uma comunicação cadenciada entre o nDNA e as cópias de mtDNA. Em bovinos, como o número de mitocôndrias parece permanecer constante até o período de desenvolvimento embrionário inicial (MAY-PANLOUP et al., 2005b; CHIARATTI et al., 2010), a quantidade de mitocôndrias presentes nos oócitos deve ser suficiente para popular cada blastômero e suprir a ATP requerida para a formação de blastocistos viáveis [revisado por Dumollard, Dunchen & Carroll (2007)]. Em camundongos isso é ainda mais crítico, pois o número de mitocôndrias parece ficar constante até o período pré-implantacional (CHIARATTI; MEIRELLES, 2010; WAI et al., 2010). Em ambas as espécies, um mínimo número de cópias de mtDNA deve ser necessário para garantir o desenvolvimento normal enquanto a replicação de mtDNA não é reativada (CHIARATTI; MEIRELLES, 2010). Assim, parece lógico que quantidades

insuficientes de mtDNA nos oócitos podem comprometer a produção de energia e, consequentemente, o desenvolvimento embrionário subsequente.

Figura 3.1 - Conteúdo relativo de mtDNA em oócitos de vacas repetidoras de serviço (RS), vacas próximas ao pico em lactação (PL) e novilhas (N) Holandesas durante o verão e o inverno. Pirassununga, 2010 a 2011



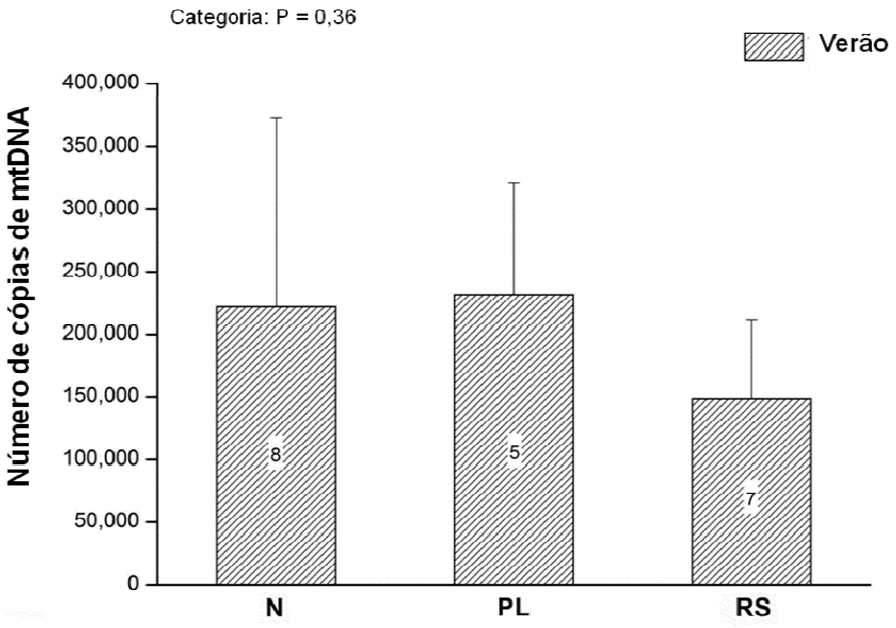
De fato, grande quantidade de mitocôndrias é acumulada durante a oogênese enquanto o folículo cresce (CAO et al., 2007; ZENG et al., 2009), enfatizando a importância potencial do conteúdo de mtDNA para o desenvolvimento embrionário inicial [revisado por Smith, Thundathil & Filion (2005) e May-Panloup et al. (2007)]. Muito se tem especulado sobre uma possível correlação do número de cópias de mtDNA com o potencial do oócito em se tornar um blastocisto competente a implantar-se no útero. Embora ainda haja carência de estudos que demonstrem o que determina a variação no número de cópias de mtDNA nos oócitos e seu efeito no desenvolvimento embrionário, numerosos autores já associaram o número de cópias de mtDNA à fertilidade em diversas espécies (REYNIER et al., 2001; MAY-PANLOUP et al., 2005a; EL SHOURBAGY et al., 2006; SANTOS; EL SHOURBAGY; ST. JOHN, 2006), inclusive em bovinos (TAMASSIA et al., 2004b; HUA et al., 2007; IWATA et al., 2011). Nesse contexto, foi previamente demonstrado que a transferência de citoplasma pode ser um meio para resgatar completamente oócitos com comprometimento em seu

desenvolvimento, seja por transferir mitocôndrias saudáveis ou outros fatores citoplasmáticos (CHIARATTI et al., 2011).

Os achados supracitados corroboram os resultados do presente estudo, no qual oócitos coletados de vacas RS durante o verão contiveram menor conteúdo de mtDNA e foram associados a menores taxas de produção de blastocistos *in vitro* e maiores taxas de fragmentação nuclear. Ou seja, o comprometido da competência de desenvolvimento desses gametas pode estar relacionado ao seu reduzido número de cópias de mtDNA.

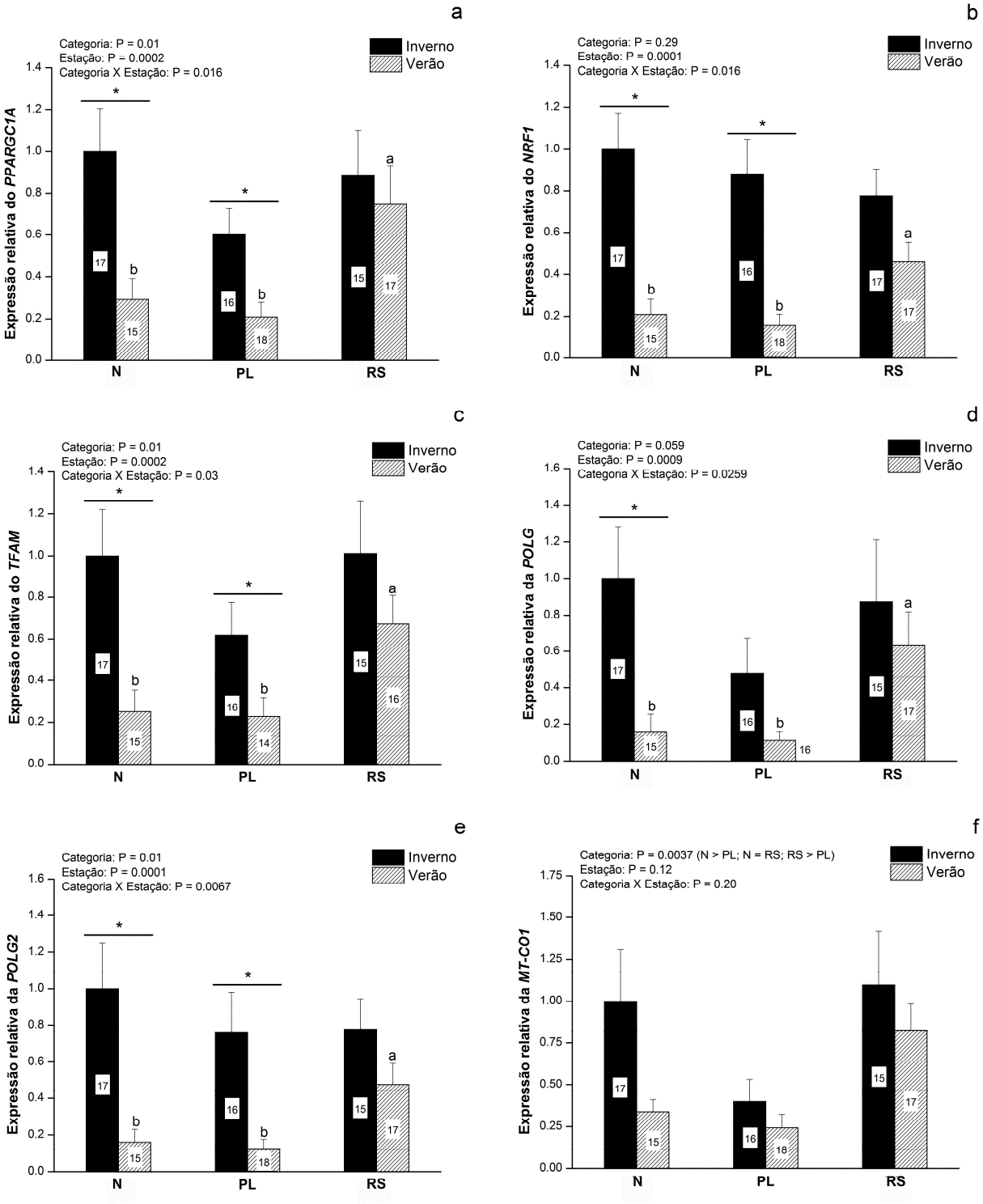
A avaliação absoluta da quantidade de mtDNA realizada no presente estudo visou a confirmação dos resultados obtidos na quantificação relativa ora reportada e, portanto, foi realizada apenas durante o verão (Figura 3.2). Nessa avaliação, encontrou-se redução numérica do conteúdo de mtDNA nos oócitos de vacas RS em relação as demais categorias (PL e novilhas). No entanto, devido à escassez de para a realização desta análise, não foi possível detectar diferença estatística nessa comparação. De qualquer maneira, com base na quantificação relativa, pode-se inferir que o comprometimento da qualidade oocitária desses animais pode estar relacionada a seu reduzido número de cópias de mtDNA.

Figura 3.2 - Conteúdo absoluto de mtDNA em oócitos de vacas repetidoras de serviço (RS), vacas próximas ao pico em lactação (PL) e novilhas (N) Holandesas durante o verão. Pirassununga, 2010 a 2011



Com o intuito de melhor investigar a relação entre o número de cópias de mtDNA e a competência oocitária de vacas RS, a expressão de genes envolvidos na replicação e transcrição do mtDNA foi realizada (Figura 3.3). Os oócitos usados para esse propósito foram os mesmos utilizados nas análises de quantificação relativa de mtDNA. Mais uma vez, a hipótese do presente estudo foi parcialmente aceita, pois apenas oócitos coletados de vacas RS durante o verão apresentaram alterações do perfil de expressão desses genes, o que se assemelha ao resultado obtido na quantificação do mtDNA. Assim, foi evidenciado que oócitos de vacas RS em estresse térmico possuem maior expressão dos genes nucleares *PPARGC1A* (Figura 3.3a), *NRF1* (Figura 3.3b), *TFAM* (Figura 3.3c), *POLG* (Figura 3.3d) e *POLG2* (Figura 3.3e) em relação aos oócitos de vacas PL e novilhas coletados em mesma estação. Por outro lado, a expressão do gene mitocondrial MT-CO1 (comumente conhecido como COX1) sofreu *upregulation* nos oócitos de vacas RS comparada aos de PL, independente de estação (Figura 3f).

Figura 3.3 - Expressão do *PPARGC1A* (a), *NRF1* (b), *TFAM* (c), *POLG* (d), *POLG2* (e) e *MT-CO1* em oócitos coletados de vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS), vacas próximas ao pico em lactação (PL) e novilhas (N), durante o verão e o inverno. Pirassununga, 2010 a 2011



Esses resultados fornecem indícios da ativação de mecanismos compensatórios em resposta a reduzida quantidade de mtDNA encontrada nos oócitos de vacas RS em estresse térmico. Essa conclusão é apoiada pela correlação negativa e altamente significante observada entre o conteúdo de mtDNA e a expressão de *PPARGC1A* (r = -0,39; P = 0,0005), *NRF1* (r = -0,37; P = 0,001), *TFAM* (r = -0,46; P = 0.0001), *POLG* (r = -0,51; P = 0,0001) e *POLG2* (r = -0,48; P = 0,0001). Assim, o aumento da expressão de genes que controlam a replicação e transcrição de mtDNA nos oócitos coletados de vacas RS durante o verão pode ter levado a um aumento da taxa de transcrição do mtDNA, conforme indicado pela *upregulation* de *MT-CO1*, para compensar o baixo número de cópias de mtDNA neles presente. Essa resposta pode ilustrar uma tentativa do oócito em aumentar o aparato necessário para garantir uma eficiente OXPHOS e, assim, suficiente geração de energia para suprir as necessidades metabólicas durante a fase de desenvolvimento embrionário inicial.

Recentemente, foi relatado que o desenvolvimento de embriões que passaram por depleção parcial de seu conteúdo de mtDNA foi acompanhado por aumento da expressão dos genes *TFAM* e *NRF1*, que sabidamente controlam a replicação e transcrição de mtDNA, reestabelecendo seu conteúdo de mtDNA. Assim, pode-se especular que os oócitos de vacas RS do presente estudo estejam respondendo de forma semelhante ao baixo conteúdo de mtDNA, ou seja, estão ativando a via de replicação e transcrição compensatoriamente.

Sabe-se que em nível nuclear, o *PPARGC1A* regula a expressão dos fatores de respiração nuclear 1 e 2 (*NRF1* e *NRF2*) que, por sua vez, coordenam, também no núcleo, a expressão de polipeptídios da OXPHOS bem como fatores que controlam a replicação, transcrição e tradução do mtDNA (KELLY, D. P.; SCARPULLA, 2004; SMITH; THUNDATHIL; FILION, 2005; SCARPULLA, 2008b; a). O TFAM, por sua vez, é uma proteína codificada no núcleo que tem função de fator de empacotamento do mtDNA (FISHER et al., 1992) e fator de transcrição, promovendo e regulando a replicação e transcrição do mtDNA (CHANG; CLAYTON, 1984). A replicação do mtDNA é conduzida por uma DNA polimerase específica (POLG) que também é codificada pelo núcleo. No presente estudo, todos os genes nucleares analisados apresentaram consistente aumento de expressão em oócitos de RS em estresse térmico. Estes genes estão envolvidos em diversos pontos da via de replicação e transcrição do mtDNA, alguns inclusive com relação causa-efeito bastante evidente (aumento de *NRF1* em resposta ao aumento de *PPARGC1A*). Portanto, essa resposta coordenada em termos de expressão gênica fortalece a possibilidade de ocorrência da ativação de mecanismos para compensar a queda do conteúdo de mtDNA presente nestes oócitos.

Outra informação interessante é que nos oócitos de vacas PL e novilhas a expressão desses genes nucleares (com exceção do *POLG* em oócitos de vacas PL) sofreu *downregulation* durante o inverno comparativamente ao verão. No entanto, em oócitos de RS esse fenômeno não foi observado. A deficiência em armazenar mRNA suficiente devido ao estresse térmico pode ser uma possível explicação para esse achado. Sabe-se que durante o desenvolvimento oocitário e follicular, o oócito acumula mRNA materno e proteínas. O mRNA armazenado tem papel crítico durante o período de maturação, fecundação e clivagens iniciais do embrião até que o genoma embrionário seja ativado (HYTTEL et al., 2001). Em outras palavras, o acúmulo de mRNA materno durante o crescimento folicular possibilita que oócito adquira competência de desenvolvimento embrionário (TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001). A ocorrência de perturbações a fisiologia do oócito durante o período de desenvolvimento folicular, como é o caso do estresse térmico (ROTH et al., 2000) pode potencialmente acarretar em redução da competência oocitária de fecundação e subsequente desenvolvimento. Portanto, o estresse térmico pode ter comprometido o adequado acúmulo de mRNA (inclusive dos genes mitocondriais) nos oócitos de vacas PL e novilhas, o que determinou a baixa expressão desses genes durante o verão.

Em estudo recente (GENDELMAN; ROTH, 2012) não foram observadas alterações dos genes *MOS*, *GDF9*, *POU5F1* e *GAPDH* em oócitos em vesícula germinativa quando estes foram coletados no verão e no inverno. No entanto, baixa ($P < 0,05$) expressão desses genes foi detectada nos oócitos coletados no verão quando já estavam em fase de maturação, evidenciando que o efeito deletério do estresse térmico pode ser mais tardio. Redução do mRNA de alguns desses transcritos foi também observada em estádios subsequentes de duas, quatro e oito células e até mesmo na fase de blastocisto. Assim, foi demonstrado que a exposição de um *pool* ovariano de oócitos ao estresse térmico ambiental parece prejudicar o armazenamento de mRNA materno e/ou o mecanismo de renovação por transcrição, afetando a expressão gênica antes e depois da ativação do genoma embrionário. Esse comprometimento pode explicar parcialmente o efeito residual do estresse térmico do verão (após término do estresse) na taxa de concepção de vacas leiteiras.

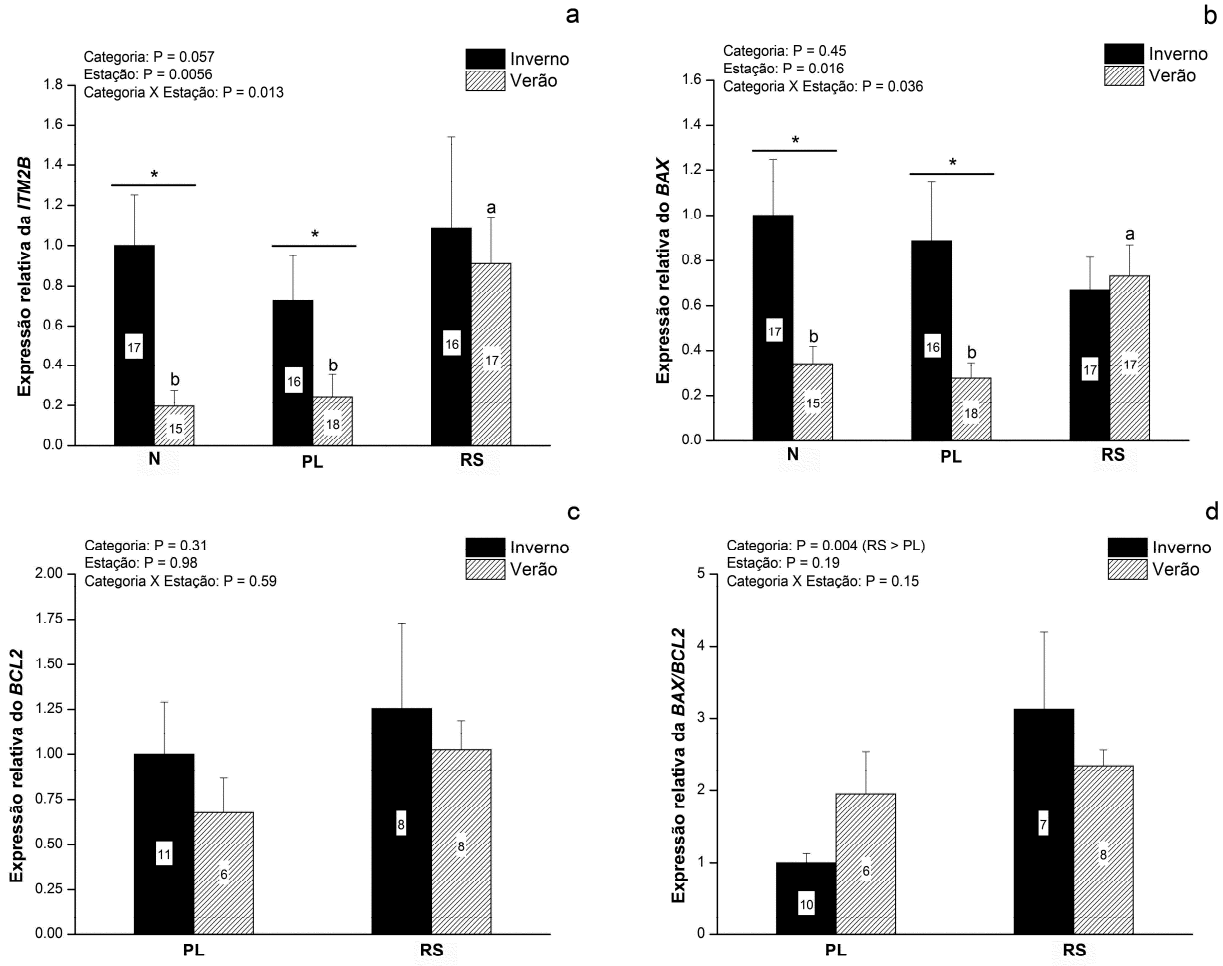
No presente estudo, alterações na expressão de transcritos podem ser observadas já na fase de oócito em vesícula germinativa, o que possivelmente deva ter se refletido nas fases subsequentes como no estudo citado anteriormente. A diferença entre estes estudos pode residir na intensidade e duração do estresse ambiental. No estudo anterior a temperatura máxima no verão foi referida como 33ºC, enquanto no presente estudo esta foi superior a 39ºC e com maior umidade. Além disso, no presente estudo os oócitos foram coletados

quando as vacas e novilhas já estavam há três meses em condição de estresse (crônico), enquanto no anterior não houve controle do tempo de exposição (ovários de abatedouro). De qualquer maneira, em ambos os estudos, a taxa de clivagem não sofreu alteração pelo estresse térmico, mas foi observada redução da taxa de blastocistos quando os oócitos foram coletados no verão. Assim, pode-se especular que a exposição ao estresse térmico pode atrapalhar o acúmulo de mRNA necessário para o desenvolvimento embrionário ou atrapalhar os mecanismos de renovação do mRNA e que esses efeitos deletérios podem ser observados em fases iniciais (vesícula germinativa) ou mais tardias de acordo com a intensidade e duração do estresse. Em ambos os casos o desenvolvimento embrionário é prejudicado.

Visando investigar se a baixa competência oocitária evidenciada em oócitos de RS durante o verão (capítulos anteriores) poderia estar também relacionada a alterações na expressão de genes relacionados à cadeia apoptótica, os genes *ITM2B* (Figura 3.4a), *BAX* (Figura 3.4b) e *BCL-2* (Figura 3.4c) foram avaliados. Semelhante ao observado nos genes nucleares relacionados ao mtDNA, a expressão de *ITM2B* e *BAX* foi aumentada durante o verão em oócitos de vacas RS comparadas a vacas PL e novilhas. Além disso, diferentemente dos oócitos de RS, os oócitos de PL e novilhas apresentaram *downregulation* de *ITM2B* e *BAX* durante o verão em comparação ao inverno, o que está inversamente correlacionado com o conteúdo relativo de mtDNA ($r = -0.42$ e $r = -0.45$, respectivamente; $P < 0,0002$). Portanto, de forma semelhante aos genes nucleares mitocondriais, o padrão de expressão dos genes apoptóticos é diferente entre oócitos de RS e das demais categorias no verão, o que pode explicar em parte a diferente qualidade oocitária entre elas durante o estresse térmico.

Com relação à expressão de *BCL-2*, transcritos deste gene foram encontrados em apenas um dos 15 oócitos de novilhas analisados durante o verão. Por essa razão, não foi possível incluir os oócitos de novilhas coletados durante o verão nas análises subsequentes relacionadas à razão entre *BAX* e *BCL-2* (*BAX/BCL-2*). Quando oócitos de RB, PL e novilhas foram comparados exclusivamente durante o inverno, nenhum efeito foi observado na expressão de *BCL-2* ($P = 0,61$). Além disso, nenhum efeito foi observado na expressão de *BCL-2* quando oócitos coletados durante o verão e inverno foram coletados de RS e PL (figura 4c). Como parte dos oócitos coletados durante o verão (PL = 12/18 e RS = 9/17) e o inverno (novilhas = 5/17, PL = 5/16 e RB = 9/17) também falharam em expressar *BCL-2*, a análise acurada desse gene não pode ser realizada nesse estudo. No entanto, a avaliação da razão *BAX*/*BCL-2* evidenciou aumento ($P = 0,0038$) em oócitos coletados de RS do que naqueles coletados de PL (Figura 3.4d), independente de estação.

Figura 3.4 - Expressão de *ITM2B* (a), *BAX* (b), *BCL-2* (c) e razão de expressão entre *BAX* e *BCL-2* (d) em oócitos de vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS), próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas (N) durante o verão e o inverno. Pirassununga, 2010 a 2011



As proteínas da família BCL2, dentre elas a BAX (pró-apoptótica) e a BCL2 (anti-apoptótica), regulam a apoptose por integrarem os sinais de sobrevivência e morte gerados dentro e fora da célula (ADAMS; CORY, 1998). Em resposta a estímulos apoptóticos, a BAX é translocada para a membrana mitocondrial (BETTAIEB; AVERILL-BATES, 2005; STANKIEWICZ et al., 2005), levando à abertura dos poros transmembrânicos de permeabilização (QIAN et al., 2004; BETTAIEB; AVERILL-BATES, 2005; STANKIEWICZ et al., 2005) e à liberação do citocromo c (QIAN et al., 2004; BETTAIEB; AVERILL-BATES, 2005; WADA et al., 2005).

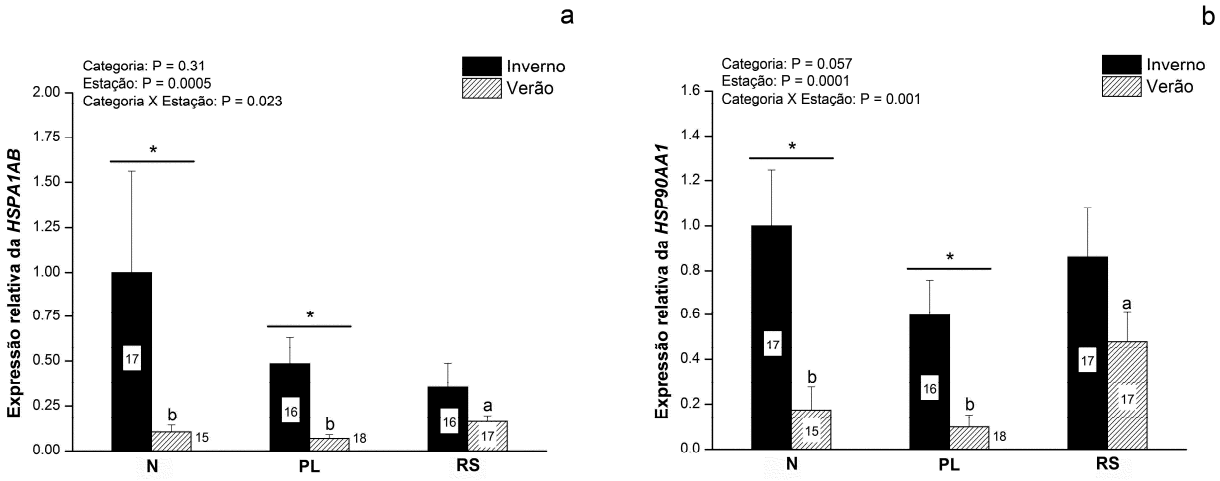
Já foi discutido anteriormente que a razão entre essas duas classes (pró e anti-apoptótica) é um grande determinante de sobrevivência ou morte celular por estímulo apoptótico (MOTYL, 1999). Portanto, a maior razão *BAX/BCL*-2 encontrada nos oócitos de vacas RS no presente estudo pode ser um indicativo que a via pró-apoptótica esteja sendo

ativada. A maior expressão de *ITM2B* também observada nos oócitos de RS coletados durante o verão dá suporte a essa suposição, uma vez que estudos prévios demonstraram que a associação entre ITM2B e mitocôndria está correlacionada com a perda de potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c e, consequentemente, indução de apoptose (FLEISCHER; AYLLON; REBOLLO, 2002).

Em suma, a *upregulation* de *ITM2B* e *BAX* e o aumento da razão *BAX*/*BCL2* fornecem evidências da ocorrência de apoptose em oócitos recuperados vacas RS durante o verão. Essa *upregulation* pode ser uma consequência da queda do conteúdo de mtDNA no oócito de vacas RS durante o verão, já que tanto o *ITM2B* (r = -0,42; P < 0,0001) quanto o *BAX* (r = -0,45; P = 0,0002) foram negativamente correlacionados ao conteúdo de mtDNA. Alternativamente, a correlação positivo de *ITM2B* e *BAX* com *PPARGC1A*, *NRF1*, *TFAM*, *POLG*, *POLG2* e *MT-CO1* sugere que a *upregulation* de genes apoptóticos pode ser consequência do aumento da expressão de genes relacionados ao mtDNA.

As HSP são chaperonas que promovem a proteção celular contra o dano pelo calor, prevenindo a desnaturação proteica (KIANG; TSOKOS, 1998; KREGEL, 2002). Foi mostrado previamente que sua transcrição é aumentada pelo choque térmico, bem como por outros agentes estressores (KIANG; TSOKOS, 1998), e que pode ser usada como um indicador de estresse em embriões bovinos (WRENZYCKI et al., 2001). No presente estudo, foi observada *downregulation* dos genes *HSPA1AB* e *HSP90AA1* nos oócitos coletados de vacas PL e novilhas durante o verão (em relação ao inverno) e maior expressão desses genes em oócitos de vacas RS em estresse térmico, seguindo o padrão observado para a maioria dos genes analisados previamente (Figura 3.5).

Figura 3.5 - Expressão do *HSPA1AB* e *HSP90AA1* em oócitos de vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS), próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas (N) no verão e no inverno. Pirassununga, 2010 a 2011



Na maioria dos estudos com estresse térmico, seja em oócitos, embriões ou células somáticas, *in vivo* ou *in vitro*, relata-se aumento da expressão das HSP frente a esse estímulo. Essa resposta parece bastante lógica, já que pequenas alterações térmicas já são suficientes para causar grandes alterações na conformação de proteínas como desnaturação, entrelaçamento ou agregação inespecífica (WELCH; SUHAN, 1985; SZALAY et al., 2007; TOIVOLA et al., 2010). A produção de chaperonas previne a formação destes agregados proteicos não específicos e auxiliam na aquisição da conformação nativa das proteínas (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010), sendo a principal linha de defesa da célula ao estresse térmico.

Em estudos prévios foi relatado que o aumento da expressão gênica de *HSP* em resposta ao estresse térmico é rápido e transitório (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010). Por exemplo, quando as condições de crescimento fisiológico (25°C) de células de levedura é alterado para condições de choque térmico (37°C), a expressão da maioria das *HSP* é aumentada rapidamente, atingindo níveis máximos após 10 a 15 minutos (EISEN et al., 1998). De forma semelhante, a maioria dos trabalhos em bovinos que mostram aumento da expressão de *HSP* está relacionada a condições de estresse térmico agudo. Como no presente estudo optou-se por trabalhar com animais que já estavam em estresse térmico crônico (há cerca de três meses), pode-se especular que tenha havido uma elevação imediata da transcrição dos genes *HSPA1AB* e *HSP90AA1* no início da exposição ao estresse térmico conforme descrito acima e, portanto, que o pico de transcrição já tenha ocorrido. Isso pode explicar a reduzida expressão de *HSPA1AB* e *HSP90AA1* observada nos oócitos coletados de vacas PL e novilhas.

Essa baixa expressão de *HSPA1AB* e *HSP90AA1* também pode ser reflexo dos efeitos do estresse térmico crônico sobre a capacidade de síntese e armazenamento de mRNA materno durante o crescimento dos oócitos (GENDELMAN; ROTH, 2012), que pode estar sendo afetado desde a fase de folículo secundário. Como o acúmulo de mRNA é fundamental na aquisição de competência oocitária (TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001), essas alterações podem estar potencialmente reduzindo sua qualidade (GENDELMAN; ROTH, 2012). Assim, a baixa expressão de *HSPA1AB* e *HSP90AA1* em oócitos cronicamente expostos ao estresse térmico pode ser em parte resultante da incapacidade de acúmulo de mRNA por este gameta, o que reduz sua qualidade e corrobora a baixa produção embrionária observada no presente estudo.

Adicionalmente, em outro estudo, a distribuição de HSP70 no ooplasma de oócitos imaturos e maturos não foi afetada pela exposição *in vitro* destes a elevadas temperaturas

(KAWARSKY; KING, 2001). Quando embriões foram expostos às mesmas condições de estresse, houve aumento da transcrição desse gene, indicando sua competência de resposta frente ao agente agressor, o que não ocorreu em oócitos. Juntos, este estudo e os resultados apresentados nesta tese, são sugestivos de que a termolabilidade oocitária pode ocorrer devido a ausência de capacidade de indução da transcrição de *HSP* frente ao estesse térmico, reduzindo assim a ativação de mecanismos protetores e, consequentemente, reduzindo a competência do oócito. Isso pode explicar a reduzida taxa de blastocistos produzidos *in vitro* relatadas previamente tanto quando a exposição dos oócitos ao estresse térmico foi feita antes (presente estudo) quanto depois (EDWARDS; HANSEN, 1996) da OPU.

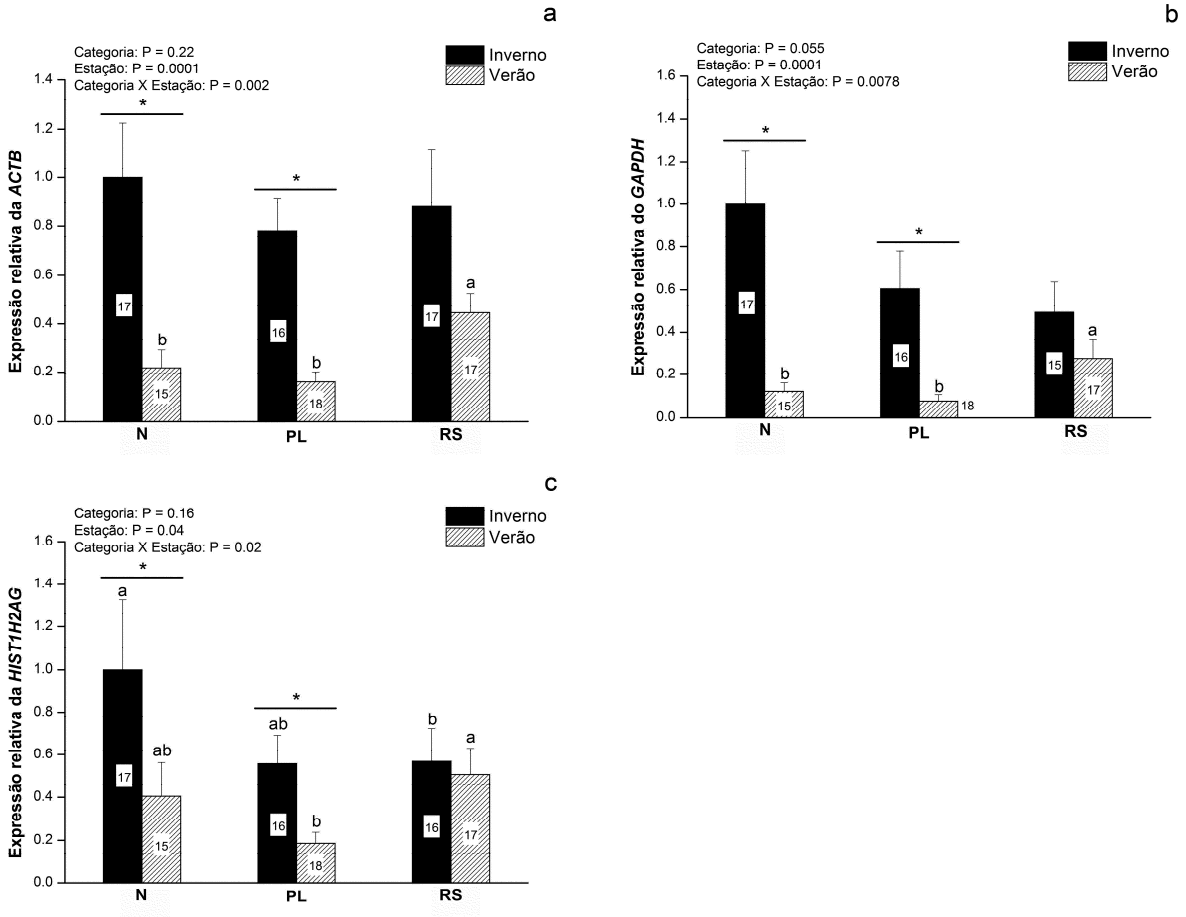
É conhecido que as chaperonas já estão presentes em altos níveis em condições fisiológicas por serem necessárias à organização da estrutura tridimensional das proteínas (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010). Assim, o aumento da necessidade por chaperonas durante algum tipo de estresse reflete o fato de serem requeridas em grande quantidade em relação às proteínas desnaturadas (HEIKKILA et al., 1982; COURGEON; MAISONHAUTE; BEST-BELPOMME, 1984; YURA et al., 1984; MICHEL; STARKA, 1986; RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010). Pode-se especular que, no presente estudo, o aumento da expressão das HSP estudadas esteja ocorrendo exclusivamente nos oócitos de vacas RS coletados no verão pela somatória dos efeitos do estresse térmico na desnaturação proteica e a presença de algum outro fator estressante exclusivo das RS. Foi relatado, por exemplo, que distúrbios metabólicos periparto como distocia e retenção de placenta aumentam o risco da ocorrência de repetição de serviços (BONNEVILLE-HEBERT et al., 2011); e que o excesso de oócitos anormais observado em RS estava associado com elevadas concentrações plasmáticas de uréia (KURYKIN et al., 2011). Nesse sentido, os oócitos de vacas RS coletados no verão podem estar expostos a uma somatória de agentes estressores que estejam estimulando *upregulation* desses genes. No entanto, apesar da ativação de mecanismos protetores, a qualidade oocitária dessas vacas é comprometida.

Finalmente, observou-se que os genes *ACTB*, *GAPDH* e *HIST1H2AG* não tiveram o comportamento de genes endógenos esperado, ou seja, a expressão desses genes foi alterada pelas condições testadas no estudo (categoria e estação). O padrão de expressão desses genes foi muito semelhante ao padrão encontrado para os genes nucleares relacionados à função mitocondrial, apoptose e estresse térmico (Figura 3.6), ou seja, a expressão de *ACTB*, *GAPDH* e *HIST1H2AG* foi aumentada durante o verão nos oócitos de vacas RS em relação aos oócitos de vacas PL e novilhas. Além disso, redução da expressão desses genes também foi observada no verão em relação ao inverno nos oócitos de vacas PL e novilhas, o que não foi visto nas

RS. A expressão de *ACTB*, *GAPDH* e *HIST1H2AG* apresentou correlação negativa com a quantidade de mtDNA e positiva com todos os genes descritos acima, apoiando potente efeito do estresse térmico na qualidade oocitária de vacas RS.

O fato de terem sido usados oócitos individuais e dos genes *ACTB*, *GAPDH* e *HIST1H2AG* terem comportamento consistente com os demais minimiza a importância do uso desses genes como endógenos. Seu uso seria interessante somente para corrigir para uma possível degradação de RNA enquanto as amostras foram estocadas a -80C. De qualquer maneira, a expressão de sete outros genes recentemente sugeridos como endógenos (GOOSSENS et al., 2005; BETTEGOWDA et al., 2006; MAMO et al., 2011; GENDELMAN; ROTH, 2012) será avaliada para tornar o trabalho ainda mais confiável

Figura 3.6 - Expressão do *ACTB* (a), *GAPDH* (b) e *HIST1H2AG* (c) em oócitos de vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS), próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas (N) no verão e no inverno. Pirassununga, 2010 a 2011



É importante ressaltar que devido a essa forte alteração na expressão dos genes que seriam utilizados como controle interno (*ACTB*, *GAPDH* e *HIST1H2AG*), este uso foi evitado e esses genes foram considerados apenas como outros genes alvo em nosso estudo.

16 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que durante o verão há indícios da ativação de mecanismos compensatórios da deficiência da função mitocondrial (menor número de cópias de mtDNA e maior expressão de genes nucleares relacionados à sua replicação/transcrição: *PPARGC1A*, *NRF1*, *TFAM*, *POLG* e *POLG2*) nos oócitos de vacas RS em comparação as demais categorias (PL e novilhas). A *upregulation* desses genes pode ser uma estratégia compensatória para garantir a geração de energia para suprir as necessidades metabólicas durante a fase de desenvolvimento embrionário inicial. Há também indícios da ativação da via pró-apoptótica em oócitos de vacas RS coletados durante o verão (maior relação BAX/BCL-2 e maior expressão de ITM2B e BAX). Essa *upregulation* pode ser uma consequência do reduzido conteúdo de mtDNA e do aumento da expressão de genes relacionados ao mtDNA nos oócitos de vacas RS durante o verão, já que tanto o *ITM2B* quanto o *BAX* foram negativamente correlacionados ao conteúdo de mtDNA e positivamente correlacionados com *PPARGC1A*, *NRF1*, *TFAM*, *POLG*, *POLG2* e *MT-CO1*. Maior expressão dos genes *HSPA1AB* e *HSP90AA1* também foi detectada nos oócitos coletados de vacas RS durante o verão em relação às demais categorias, seguindo o padrão observado para a maioria dos genes analisados previamente, se correlacionando positivamente a todos eles e negativamente ao conteúdo de mtDNA. Nesse caso, o aumento de transcrição de chaperonas pode ser uma resposta protetora à exposição desses oócitos a uma somatória de fatores estressores (estresse térmico e outros que podem estar presentes nas RS). A expressão de *ACTB*, *GAPDH* e *HIST1H2AG* também foi aumentada durante o verão nos oócitos de vacas RS em relação aos oócitos de vacas PL e novilhas. Portanto, para todos os genes avaliados houve padrão semelhante de expressão nas distintas categorias e estações, sendo que a *upregulation* desses transcritos foi evidenciada em oócitos de RS em estresse térmico, podendo estar relacionada à baixa competência de desenvolvimento desses gametas.

CAPÍTULO IV

Taxa de concepção de vacas repetidoras de serviço, em pico de lactação e novilhas submetidas ao mesmo protocolo de IATF utilizando mesma partida de sêmen no verão e no inverno

17 JUSTIFICATIVA

A sazonalidade da taxa de concepção de vacas RS já foi relatada em estudos retrospectivos. No entanto, esses estudos não são delineados para avaliar precisamente determinadas respostas. Em outras palavras, vacas que foram inseminadas após observação de cio ou sincronizadas para IATF com diferentes protocolos foram avaliadas, não havendo distribuição homogênea do sêmen ou contemporaneidade entre os grupos. Assim, o presente estudo foi conduzido prospectivamente visando à obtenção de uma resposta mais confiável acerca do comportamento da taxa de concepção de vacas RS durante o verão e o inverno, comparando-as a vacas PL e novilhas.

18 MATERIAIS E MÉTODOS

18.1 LOCAL E PERÍODO DE EXECUÇÃO

O presente estudo, que inclui um teste de concepção, foi realizado de agosto a setembro de 2010 e 2011 (período denominado inverno) e de março a abril de 2011 (período denominado verão). Os animais utilizados eram propriedade da Fazenda Santa Rita do Iguaçú, município de Céu Azul (25°8′59″S 53°50′44″O) e das Fazendas Frisia e São Cristóvão, município de Carambeí (24°56′59″S 50°6′35″O), ambas no estado do Paraná.

18.2 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

Os rebanhos das fazendas utilizadas nesse estudo (Santa Rita do Iguaçú, São Cristóvão e Frisia, respectivamente) eram compostos por 540, 327 e 205 vacas Holandesas em lactação, com produção média de 32,2, 31,3 e 32,1 kg de leite por dia. Para a inclusão dos animais no estudo foram obedecidos critérios de seleção de acordo com sua categoria, incluindo idade (novilhas), produção leiteira, DEL e número de eventos reprodutivos (vacas). Inicialmente, 600 fêmeas foram incluídas no trabalho, no entanto, parte delas foi excluída das análises por motivos diversos, como falha em um ou mais tratamentos, alteração do horário de inseminação, perda do dispositivo de progesterona, problemas de saúde, descarte ou morte. Assim, o número final de animais contemplado na avaliação da taxa de concepção à IATF foi de 580, sendo 233 vacas RS, 198 vacas PL e 140 novilhas. Parte dessas fêmeas foi avaliada durante o verão (119 RS, 88 PL e 78 novilhas) e parte no inverno (114 RS, 110 PL e 71 novilhas).

Quanto ao alojamento e a alimentação dos animais, o manejo já estabelecido nas propriedades em que foi realizado o experimento foi mantido, sendo que fêmeas em lactação (PL e RS) foram mantidas em *freestalls* (baias de estabulação livre) com acesso a um piquete adjacente com pastagem e água *ad libitum* e novilhas foram alojadas em piquetes com áreas de sombreamento água *ad libitum* e regime de semi-confinamento. A ração total foi formulada para alcançar ou exceder os requerimentos nutricionais mínimos para cada

categoria: novilhas (14% PB, 26,7% FDA e 47% FDN) e vacas Holandesas em lactação (18% PB, 21,2% FDA e 34,4% FDN) pesando 650 kg e produzindo 45 kg de leite com gordura corrigida para 3,5% quando consumindo 26 kg de MS/d (NRC, 2001). As vacas em lactação foram ordenhadas três vezes ao dia, com intervalo médio de oito horas entre duas ordenhas consecutivas.

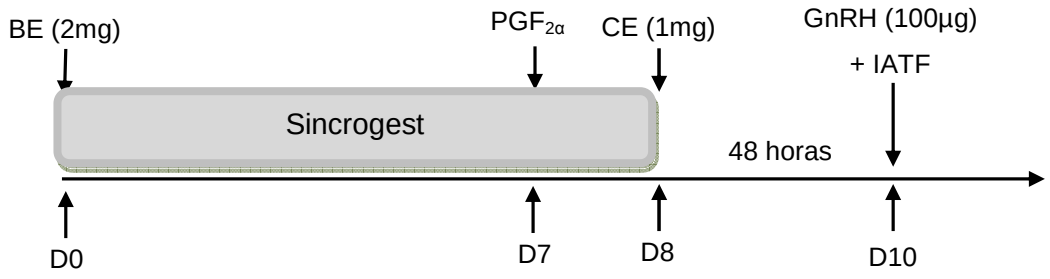
18.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente experimento foi delineado em fatorial 3 X 2 (categoria da fêmea x estação do ano). Fêmeas das três categorias foram submetidas a protocolos de sincronização da emergência de onda folicular e ovulação para IATF nas duas estações propostas, nas três fazendas descritas acima. Em cada réplica, números similares de vacas RS, PL e novilhas passaram pelos mesmos procedimentos e foram inseminadas sem a observação de estro.

18.4 SINCRONIZAÇÃO DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO

Todas as fêmeas receberam em dia aleatório do ciclo estral (D0), um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, OuroFino Saúde Animal, Brasil) e 2 mg de BE (Sincrodiol®, OuroFino Saúde Animal, Brasil) i.m.. No D7, 500 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, OuroFino Saúde Animal, Brasil) foram administradas i.m. e no D8, o dispositivo de progesterona foi removido juntamente à administração de 1 mg de cipionato de estradiol (produto cedido pela OuroFino Saúde Animal, Brasil) i.m. Passadas 48 horas da retirada do dispositivo de progesterona, 100 µg de acetato de buserelina (GnRH; Sincroforte®, OuroFino Saúde Animal, Brasil) i.m. foram administrados e a IATF foi realizada (Figura 4.1). O sêmen utilizado em todas as IATF foi proveniente de uma única partida do mesmo touro da raça Holandês Preto e Branco (Kane 014HO04368, Accelerated Genetics®, Baraboo, WI, EUA).

Figura 4.1 - Desenho esquemático do delineamento experimental. Sincronização da emergência de onda folicular e ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). BE = benzoato de estradiol; $PGF_{2\alpha}$ = prostaglandina $F_{2\alpha}$; CE = cipionato de estradiol. Céu Azul e Carambeí, 2010 a 2011



BE = benzoato de estradiol; $PGF_{2\alpha}$ = prostaglandina $F_{2\alpha}$; CE = cipionato de estradiol.

18.5 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia de 35 a 40 dias após a IATF em todas as fêmeas.

18.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analysis* do SAS. A TR foi analisada por ANOVA, usando o procedimento GLIMMIX do SAS, versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). A variável binomial, taxa de concepção, foi analisada por regressão logística, usando o procedimento GLIMMIX do SAS.

Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas. Os valores foram expressos como média ± E.P.M..

19 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A repetição de serviços e o estresse térmico são importantes fatores que afetam negativamente a fertilidade de vacas leiteiras. No entanto, nenhum estudo prospectivo prévio comparou as taxas de concepção de vacas RS, PL e novilhas submetidas ao mesmo protocolo de sincronização da ovulação para IATF e inseminadas com a mesma partida de sêmen do mesmo touro. Buscou-se com essa proposta, excluir fontes de variação comuns em trabalhos retrospectivos e obter, assim, resultados mais confiáveis acerca do impacto desses fatores na fertilidade. As características das vacas e novilhas que foram utilizadas no presente estudo estão apresentadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Variáveis produtivas e reprodutivas das vacas (repetidoras de serviço – RS e próximas ao pico de lactação – PL) e novilhas Holandesas utilizadas na avaliação da taxa de concepção nas diferentes estações. Céu Azul e Carambeí, 2010 a 2011

	Novilhas		PL		RS	
	Inverno (n = 71)	Verão (n = 78)	Inverno (n = 110)	Verão (n = 88)	Inverno (n =114)	Verão (n = 119)
DEL	-	-	115,2 ± 5,2	89,9 ± 2,7	324,5 ± 14,5	364,8 ± 15,1
Produção de leite (kg)	-	-	42,6 ± 0,7	34,5 ± 1,0	32,0 ± 1,0	21,8 ± 0,8
Serviços prévios (n)	0,52 ± 0,08	0,33 ± 0,06	0,97 ± 0,09	0,61 ± 0,07	5,5 ± 0,3	6,2 ± 0,3
Lactações prévias (n)	0	0	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1

Não foi detectada interação entre categoria e estação para as variáveis analisadas. No entanto, houve evidente efeito de categoria na taxa de concepção, sendo esta superior em novilhas, seguida por PL e depois por RS, independente da estação do ano (Tabela 4.2 e Figura 4.2). Resultado semelhante foi observado quando se comparou a taxa de concepção de vacas RS e não-RS que foram inseminadas ou receberam embrião no verão e no inverno, conforme revisado por Baruselli et al. (2011). Assim, a baixa taxa de concepção de vacas RS em relação às demais categoria é consistente entre esse e outros previamente realizados, o que confirma a baixa fertilidade que caracteriza essa categoria.

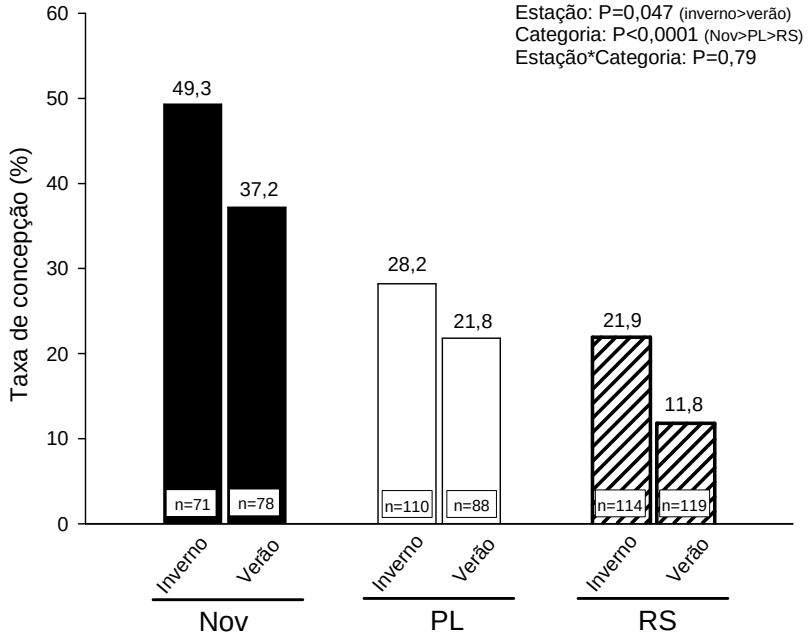
Efeito sazonal da taxa de concepção foi também observado, ou seja, maior taxa de concepção foi obtida no inverno e menor taxa no verão, independente da categoria estudada

(Tabela 4.2 e Figura 4.2). Esses dados corroboram achados de estudos retrospectivos realizados no Brasil, nos quais foram analisadas as taxas de concepção resultantes de 12.875 IAs e 4.822 TEs em vacas em lactação (todos os serviços) e de 5.693 IAs e 3.858 TE em vacas repetidoras de serviço nas diferentes estações do ano entre 2001 e 2006 (RODRIGUES et al., 2007b; a).

Tabela 4.2 - Taxa de concepção (%) de vacas repetidoras de serviço (RS), próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas Holandesas sincronizadas para inseminação artificial em tempo fixo utilizando mesmo protocolo e mesma partida de sêmen, durante o verão e o inverno. Céu Azul e Carambeí, 2010 a 2011

	Novilha	PL	RS	Valores de P
Categorias	43,0%[a]	25,4%[b]	16,7%[c]	< 0,0001
	Verão	Inverno		
Estações	30,8%	21,8%		0,05

Figura 4.2 - Taxa de concepção de vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS), próximas ao pico de lactação (PL) e novilhas (Nov) no verão e no inverno. Céu Azul e Carambeí, 2010 a 2011



Já está bem estabelecido que o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas pode ser severamente comprometido pelo estresse térmico (HANSEN et al., 2001). e que vacas em lactação possuem elevada taxa metabólica devido à produção de leite, o que reduz sua habilidade de dissipar o calor (KADZERE et al., 2002), aumentando sua temperatura corporal (DEMETRIO et al., 2007). De fato, os efeitos negativos da alta produção leiteira sobre a qualidade oocitária, a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial estão exacerbados durante o estresse térmico (HANSEN; ARECHIGA, 1999). No Capítulo 1 dessa tese observou-se que vacas em lactação (tanto RS quanto PL) aumentaram sua TC, TR e FR e reduziram a produção de blastocistos quando expostas ao estresse térmico crônico. As novilhas, apesar de somente terem aumentado sua TC, também apresentaram reduzidas taxas de blastocisto no verão. Esses dados corroboram os resultados do atual capítulo, uma vez que queda de concepção foi detectada em todas as categorias durante o verão. Sartori et al. (2002) também demonstraram aumento da TR muito mais intenso em vacas Holandesas em lactação do que em novilhas, em resposta a mesma elevação da temperatura ambiental. No entanto, redução da qualidade embrionária (avaliada pelo menor número de células embrionárias) foi reportada apenas em vacas, diferentemente dos dados ora encontrados.

Há tempos refere-se que redução da fertilidade durante períodos de estresse térmico deva estar relacionada com a alta sensibilidade de oócitos e de embriões em fase inicial de desenvolvimento (EALY; DROST; HANSEN, 1993; AMBROSE et al., 1999; ROTH, 2008). Nos capítulos anteriores, evidências de comprometimento oocitário foram reforçadas pela baixa taxa de produção embrionária obtida quando oócitos foram coletado durante o verão, independente da categoria. Recentemente, o padrão sazonal observado na PIVE apoia a ocorrência de distúrbios oocitários pelo calor, uma vez que o efeito do estresse térmico *in vivo* no oócito se reflete na redução da produção *in vitro* de embriões (VIEIRA et al., 2011; PONTES et al., 2012).

20 CONCLUSÃO

No presente estudo, observou-se baixa taxa de concepção de vacas RS em relação a vacas PL e novilhas tratadas com mesmo protocolo para IATF e inseminadas com mesma partida de sêmen do mesmo touro, reforçando dados previamente reportados. Além disso, o impacto negativo do verão sobre a taxa de concepção foi observado em todas as categorias, reforçando seu efeito deletério sobre a fertilidade de fêmeas bovinas da raça Holandesa.

21 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

Quando expostas a condições de estresse térmico crônico, vacas RS e PL apresentam maior elevação da TC do que novilhas, ultrapassando os limites que determinam o início da retenção de calor, o que levou ao aumento da TR dessas categorias e, consequentemente, ao aumento da FR (mecanismo evaporativo para a perda de calor). A alta correlação entre a FR, TR e TC encontrada nas vacas RS e PL apoia essa conclusão. As novilhas, por sua vez, foram capazes de manter a TR e FR semelhantes no verão e no inverno, apesar de haver aumento da TC durante o verão. A maior sensibilidade de vacas lactantes ao estresse térmico possivelmente está relacionada à sua alta taxa metabólica, a qual é diretamente proporcional a sua produção leiteira. De maneira semelhante, o número de folículos visualizados no dia da OPU e o número de oócitos totais e viáveis foram menores durante o verão nas vacas RS e PL e relação às novilhas. É possível que a maior sensibilidade das vacas frente ao estresse térmico e a reduzida ingestão de matéria seca durante esse período tenham intensificado o BEN. Essa condição metabólica pode comprometer a responsividade hepática ao GH, resultando em reduzidas concentrações de IGF-I, hormônio este que está diretamente relacionado à quantidade e qualidade de folículos recrutados.

Apesar de não alterar a taxa de clivagem, o estresse térmico *in vivo* (doadora de oócito) reduziu a taxa de blastocistos produzidos *in vitro* a partir de oócitos das três categorias. No entanto, em vacas RS essa redução foi mais acentuada, representando cerca de metade das taxas obtidas em PL e um terço das obtidas em novilhas. Além disso, durante o verão, maior porcentagem de núcleos fragmentados foi registrada nos embriões de RS em relação às novilhas, indicando que os efeitos deletérios do estresse térmico sobre os oócitos devam ser mais intensos nessas vacas.

Nos oócitos de RS coletados durante o verão foram encontrados indícios da ativação de mecanismos compensatórios da deficiência da função mitocondrial (menor número de cópias de mtDNA e maior expressão de genes nucleares relacionados à sua replicação/transcrição: *PPARGC1A*, *NRF1*, *TFAM*, *POLG* e *POLG2*) em comparação as PL e novilhas. A *upregulation* desses genes pode ser uma estratégia para garantir a geração de energia para suprir as necessidades metabólicas durante a fase de desenvolvimento embrionário inicial. Indícios da ativação da via pró-apoptótica também foram observados nos oócitos dessas vacas RS durante o verão (maior relação BAX/BCL-2 e maior expressão de

ITM2B e BAX). Essa *upregulation* pode ser consequência do reduzido conteúdo de mtDNA e do aumento da expressão de genes relacionados ao mtDNA nos oócitos de vacas RS durante o verão, já que tanto o *ITM2B* quanto o *BAX* foram negativamente correlacionados ao conteúdo de mtDNA e positivamente correlacionados com *PPARGC1A*, *NRF1*, *TFAM*, *POLG*, *POLG2* e *MT-CO1*. Além disso, maior expressão dos genes *HSPA1AB* e *HSP90AA1* foi detectada nesses mesmos oócitos, correlacionando-se positivamente aos demais e negativamente ao conteúdo de mtDNA. Nesse caso, o aumento de transcrição de chaperonas pode ser uma resposta protetora a exposição desses oócitos a uma somatória de fatores estressores (estresse térmico e outros que podem estar presentes nas RS). Finalmente, a expressão de *ACTB*, *GAPDH* e *HIST1H2AG* também foi aumentada durante o verão nos oócitos de vacas RS em relação aos de vacas PL e novilhas, seguindo padrão semelhante dos demais genes avaliados. Esses dados são indicativos que a baixa competência de desenvolvimento desses gametas esteja relacionada à *upregulation* dos transcritos estudados, uma vez que o aumento da expressão ocorreu exclusivamente em oócitos de RS em estresse térmico. Os efeitos deletérios do estresse térmico na qualidade oocitária, apesar de presentes em todas as categorias, são mais intensos em vacas RS, afetando consideravelmente sua produção de embriões.

O uso de mesmo protocolo de sincronização da ovulação para IATF e mesma partida de sêmen de um único touro Holandês, permitiu a comparação das taxas de concepção de vacas RS, PL e novilhas inseminadas no verão e no inverno. Assim, uma avaliação mais precisa pode ser realizada com relação à fertilidade desses animais frente ao estresse térmico. Independente da estação avaliada, reduzidas taxas de concepção foram observadas em vacas RS em relação às demais categorias. Além disso, queda considerável dessa taxa foi detectada durante o verão em todas as categorias, a semelhança do que foi observado com as taxas de blastocisto relatadas previamente.

Estudos complementares são necessários para que se possa determinar mais precisamente os mecanismos envolvidos na baixa fertilidade de RS e na queda de fertilidade durante o verão. A avaliação da expressão de genes oocitários relacionados com a maturação do oócito, bem como a aplicação da transferência de citoplasma para o estudo da influência de fatores citoplasmáticos na recuperação da competência de desenvolvimento desses gametas são alguns tópicos que devem ser abordados em pesquisas futuras. A elucidação desses mecanismos pode possibilitar o desenvolvimento de estratégias para contornar o problema da baixa fertilidade de RS e minimizar o impacto do estresse térmico na qualidade oocitária, subsequente desenvolvimento embrionário e prenhez.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1322-1326, 1998.

ADEYEMO, O., HEATH, E., ADADEVOH, B. K., STEINBACH, J., OLALOKU, E. A.. Some physiological and behavioral responses in Bos indicus and Bos taurus heifers acclimatized to the hot humid seasonal equatorial climate. **International Journal of Biometeorology**, v. 23, n. 3, p. 231-241, 1979.

AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2611-2616, 1999.

AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 390-396, 2002.

ALEXANDER, G., HALES, J. R. S., STEVENS, D., DONNELLY, J. B. Effects of acute and prolonged exposure to heat on regional blood flows in pregnant sheep. **Journal of Developmental Physiology**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 1987.

AMBROSE, J. D.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; THATCHER, M. J.; KASSA, T.; BINELLI, M.; HANSEN, P. J.; CHENOWETH, P. J.; THATCHER, W. W. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2369-2376, 1999.

ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J. L.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 943-956, 1996.

ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2044-2050, 1994.

BACCARI JR., F. **Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes**. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 2001. 142 p.

BAGE, R.; PETYIM, S.; LARSSON, B.; HALLAP, T.; BERGQVIST, A. S.; GUSTAFSSON, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Oocyte competence in repeat-breeder heifers: effects of an optimized ovum pick-up schedule on expression of oestrus, follicular development and fertility. **Reproduction Fertility and Development**, v. 15, n. 1-2, p. 115-123, 2003.

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, n. 1, p. 210-218, 2006.

BARTLETT, P. C.; KIRK, J. H.; MATHER, E. C. Repeated insemination in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. **Theriogenology**, v. 26, n. 3, p. 309-322, 1986.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N.; GIMENES, L. U.; FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; BO, G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v., n., p., 2011.

BAUMAN, D. E.; VERNON, R. G. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. **Annual Review of Nutrition,** v. 13, n., p. 437-461, 1993.

BEATTY, D. T.; BARNES, A.; TAYLOR, E.; PETHICK, D.; MCCARTHY, M.; MALONEY, S. K. Physiological responses of Bos taurus and Bos indicus cattle to prolonged, continuous heat and humidity. **Journal of animal science**, v. 84, n. 4, p. 972-985, 2006.

BENNETT, I. L., FINCH, V. A., HOLMES, C. R. Time spent in shade and its relationship with physiological factors of thermoregulation in three breeds of cattle. **Applied Animal Behavior Science**, v. 13, n., p. 227-236, 1985.

BERMAN, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; MAMEN, M.; HERZ, Z.; WOLFENSON, D.; ARIELI, A.; GRABER, Y. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 6, p. 1488-1495, 1985.

BERMAN, A. Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. **Journal of animal science**, v. 83, n. 6, p. 1377-1384, 2005.

BETTAIEB, A.; AVERILL-BATES, D. A. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40Â°C protects cells against heat shock-induced apoptosis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 205, n. 1, p. 47-57, 2005.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 3, p. 267-278, 2006.

BILBY, T. R.; BLOCK, J.; DO AMARAL, B. C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F. T.; HANSEN, P. J.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3891-3903, 2006.

BIRKY JR, C. W. Relaxed and stringent genomes: Why cytoplasmic genes don't obey Mendel's laws. **Journal of Heredity**, v. 85, n. 5, p. 355-365, 1994.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L. A.; SIRARD, M. A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1061-1075, 1997.

BOLS, P. E.; LEROY, J. L.; VANHOLDER, T.; VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v. 62, n. 5, p. 906-914, 2004.

BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C.; KOGUT, J.; KRUIP, T. A. M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular. Puncture. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 277-289, 1997.

BONNEVILLE-HEBERT, A.; BOUCHARD, E.; TREMBLAY, D. D.; LEFEBVRE, R. Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling of dairy cows in Quebec. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 75, n. 2, p. 147-151, 2011.

BUCHAN, J. R.; PARKER, R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. **Molecular Cell,** v. 36, n. 6, p. 932-941, 2009.

BULMAN, D. C.; LAMMING, G. E. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 54, n. 2, p. 447-458, 1978.

BURATINI, J., JR.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BO, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (Bos indicus) heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 421-431, 2000.

CAO, L.; SHITARA, H.; HORII, T.; NAGAO, Y.; IMAI, H.; ABE, K.; HARA, T.; HAYASHI, J. I.; YONEKAWA, H. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 386-390, 2007.

CARRIQUIRY, M.; WEBER, W. J.; FAHRENKRUG, S. C.; CROOKER, B. A. Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4889-4900, 2009a.

CARRIQUIRY, M.; DAHLEN, C. R.; WEBER, W. J.; LAMB, G. C.; CROOKER, B. A. Postpartum ovarian activity in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4876-4888, 2009b.

CHANG, D. D.; CLAYTON, D. A. Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. **Cell**, v. 36, n. 3, p. 635-643, 1984.

CHAO, D. T.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 family: Regulators of cell death. **Annual Review of Immunology**, v. 16, n., p. 395-419, 1998.

CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V. Increase in mitochondrial DNA quantity and impairment of oxidative phosphorylation in bovine fibroblast cells treated with ethidium bromide for 15 passages in culture. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 55-62, 2006.

CHIARATTI, M. R.; BRESSAN, F. F.; FERREIRA, C. R.; CAETANO, A. R.; SMITH, L. C.; VERCESI, A. E.; MEIRELLES, F. V. Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 1, p. 76-85, 2010.

CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V. Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 1, p. 1-2, 2010.

CHIARATTI, M. R.; FERREIRA, C. R.; PERECIN, F.; MEO, S. C.; SANGALLI, J. R.; MESQUITA, L. G.; DE CARVALHO BALIEIRO, J. C.; SMITH, L. C.; GARCIA, J. M.; MEIRELLES, F. V. Ooplast-mediated developmental rescue of bovine oocytes exposed to ethidium bromide. **Reproductive BioMedicine Online,** v. 22, n. 2, p. 172-183, 2011.

CHOSHNIAK, I.; MCEWAN JENKINSON, D.; BLATCHFORD, D. R.; PEAKER, M. Blood flow and catecholamine concentration in bovine and caprine skin during thermal sweating. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 71, n. 1, p. 37-42, 1982.

CLAYTON, D. A. Nuclear-mitochondrial intergenomic communication. **BioFactors**, v. 7, n. 3, p. 203-205, 1998.

CLAYTON, D. A. Transcription and replication of mitochondrial DNA. **Human Reproduction**, v. 15, n. SUPPL. 2, p. 11-17, 2000.

CLAYTON, D. A. Mitochondrial DNA replication: What we know. **IUBMB Life**, v. 55, n. 4-5, p. 213-217, 2003.

COLLIER, R. J.; DOELGER, S. G.; HEAD, H. H.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Effects of heat stress during pregnancy on maternal hormone concentrations, calf birth weight and postpartum milk yield of Holstein cows. **Journal of animal science**, v. 54, n. 2, p. 309-319, 1982.

COLLIER, R. J.; COLLIER, J. L.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 445-454, 2008.

COOTE, P. J.; COLE, M. B.; JONES, M. V. Induction of increased thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. **Journal of General Microbiology,** v. 137, n. 7, p. 1701-1708, 1991.

COURGEON, A. M.; MAISONHAUTE, C.; BEST-BELPOMME, M. Heat shock proteins are induced by cadmium in Drosophila cells. **Experimental Cell Research** v. 153, n. 2, p. 515-521, 1984.

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP TH, A. M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, n. 2, p. 197-204, 1989.

DEMETRIO, D. G.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G.; VASCONCELOS, J. L. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5073-5082, 2007.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77, n., p. 21-49, 2007.

EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 10, p. 2899-2905, 1993.

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, n. 2, p. 341-346, 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. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, n. 1, p. 25-33, 1997.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, n. 2, p. 138-145, 1997.

EISEN, M. B.; SPELLMAN, P. T.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. 1998. Proceedings of the National Academy of Science, p. 14863–14868.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, n. 1, p. 84-96, 2006.

EL SHOURBAGY, S. H.; SPIKINGS, E. C.; FREITAS, M.; ST. JOHN, J. C. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. **Reproduction**, v. 131, n. 2, p. 233-245, 2006.

ESCALONA, F., MERCADO J., RODRIGUEZ, A., RODRÍGUEZ-SALLABERRY, C., KOWALSKY, A. A. Different response of Bos indicus vs. Bos taurus oocyte on maturation,

cleavage and embryo development under in vitro system. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 3, p. 188, 2008.

FABIAN, D.; KOPPEL, J.; MADDOX-HYTTEL, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, v. 64, n. 2, p. 221-231, 2005.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 4, p. 437-442, 1995.

FERRAZ, M. L., WATANABE, Y. F., SÁ FILHO, M. F., REIS, E. L., BARUSELLI, P. S. Influência dos meses do ano no número, na qualidade ovocitária e na produção in vitro de embriões em vacas Nelore (Bos indicus). XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, Goiânia, Brasil, p. 16.

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M. R.; RODRIGUES, C. A.; FREITAS, B. G.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. Heat stress and embryo production in high-producing dairy cows. XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Porto de Galinhas, PE, Brasil, 2010: Acta Scientiae Veterinariae p. s277–s315, 2010.

FISHER, R. P.; LISOWSKY, T.; PARISI, M. A.; CLAYTON, D. A. DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 5, p. 3358-3367, 1992.

FLEISCHER, A.; AYLLÃ³N, V.; DUMOUTIER, L.; RENAULD, J. C.; REBOLLO, A. Proapoptotic activity of ITM2Bs, a BH3-only protein induced upon IL-2-deprivation which interacts with Bcl-2. **Oncogene**, v. 21, n. 20, p. 3181-3189, 2002.

FLEISCHER, A.; AYLLON, V.; REBOLLO, A. ITM2Bs regulates apoptosis by inducing loss of mitochondrial membrane potential. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 12, p. 3498-3505, 2002.

FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 9-17, 2007.

FREITAS, B. G.; RODRIGUES, C. A.; SALES, J. N. S.; TEIXEIRA, A. A.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; RANIERI, A. L.; BARUSELLI, P. S. Perda embrionária (entre 30 e 60 dias)

à inseminação artificial e à transferência de embrião de vacas Holandesas de alta produção. XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Porto de Galinhas, PE, Brasil, 2010: Acta Scientiae Veterinariae, p. 393, 2010.

GARESSE, R.; VALLEJO, C. G. Animal mitochondrial biogenesis and function: A regulatory cross-talk between two genomes. **Gene**, v. 263, n. 1-2, p. 1-16, 2001.

GAUGHAN, J. B.; MADER, T. L.; HOLT, S. M.; JOSEY, M. J.; ROWAN, K. J. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **Journal of animal science**, v. 77, n. 9, p. 2398-2405, 1999.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 1, p. 1-9, 2012.

GIMENES, L. U. **Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular**. 2010. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. 122 p. Tese (Doutorado em Ciências).

GONG, J. G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 110, n. 1, p. 91-97, 1997.

GOOSSENS, K.; VAN POUCKE, M.; VAN SOOM, A.; VANDESOMPELE, J.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L. J. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. **BMC Developmental Biology,** v. 5, n., p. 27, 2005.

GRADEN, A. P.; OLDS, D.; MOCHOW, C. R.; MUTTER, L. R. Causes of fertilization failure in repeat breeding cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 51, n. 5, p. 778-781, 1968.

GRAGEROV, A. I.; MARTIN, E. S.; KRUPENKO, M. A.; KASHLEV, M. V.; NIKIFOROV, V. G. Protein aggregation and inclusion body formation in Escherichia coli rpoH mutant defective in heat shock protein induction. **FEBS Letters,** v. 291, n. 2, p. 222-224, 1991.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1309-1312, 1998.

GUSTAFSSON, H.; LARSSON, K. Embryonic mortality in heifers after artificial insemination and embryo transfer: differences between virgin and repeat breeder heifers. **Research in Veterinary Science**, v. 39, n. 3, p. 271-274, 1985.

GUSTAFSSON, H.; EMANUELSON, U. Characterisation of the repeat breeding syndrome in Swedish dairy cattle. **Acta Vet Scand**, v. 43, n. 2, p. 115-125, 2002.

GWAZDAUSKAS, F. C.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination which may affect conception. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 7, p. 873-877, 1973.

HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; CHASE, C. C., JR.; 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. **Journal of animal science**, v. 74, n. 2, p. 295-303, 1996.

HANSEN, P. J. Effects of environment on bovine reproduction. In: Current therapy in large animal, 1997, Philadelphia:Theriogenology, p. 4003-4415.

HANSEN, P. J.; ARECHIGA, C. F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **Journal of animal science**, v. 77 Suppl 2, n., p. 36-50, 1999.

HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E., 3RD; CHASE, C. C., JR. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 91-103, 2001.

HEIKKILA, J. J.; SCHULTZ, G. A.; IATROU, K.; GEDAMU, L. Expression of a set of fish genes following heat or metal ion exposure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 20, p. 12000-12005, 1982.

HUA, S.; ZHANG, Y.; LI, X. C.; MA, L. B.; CAO, J. W.; DAI, J. P.; LI, R. Effects of granulosa cell mitochondria transfer on the early development of bovine embryos in vitro. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, n. 2, p. 237-246, 2007.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.

HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; LAURINCIK, J.; THOMSEN, P. D.; CALLESEN, H.; VOS, P. L.; HENDRIKSEN, P. J.; DIELEMAN, S. J.; SCHELLANDER, K.; BESENFELDER, U.; GREVE, T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 21-30, 2001.

IWATA, H.; GOTO, H.; TANAKA, H.; SAKAGUCHI, Y.; KIMURA, K.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, n. 3, p. 424-432, 2011.

JENG, J. Y.; YEH, T. S.; LEE, J. W.; LIN, S. H.; FONG, T. H.; HSIEH, R. H. Maintenance of mitochondrial DNA copy number and expression are essential for preservation of mitochondrial function and cell growth. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 347-357, 2008.

KADZERE, C. T.; MURPHY, M. R.; SILANIKOVE, N.; MALTZ, E. Heat stress in lactating dairy cows: A review. . **Livestock Production Science**, v. 77, n., p. 59–91, 2002.

KAMIJO, Y. I.; LEE, K.; MACK, G. W. Active cutaneous vasodilation in resting humans during mild heat stress. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 3, p. 829-837, 2005.

KAMWANJA, L. A.; CHASE, C. C., JR.; GUTIERREZ, J. A.; GUERRIERO, V., JR.; OLSON, T. A.; HAMMOND, A. C.; HANSEN, P. J. Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. **Journal of animal science**, v. 72, n. 2, p. 438-444, 1994.

KAWARSKY, S. J.; KING, W. A. Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. **Zygote**, v. 9, n. 1, p. 39-50, 2001.

KELLY, C. F.; BOND, T. E. Bioclimatic factors and their measurements. In: National Academy of Sciences, 1971, Washington:National Academy of Sciences, p. 71-92.

KELLY, D. P.; SCARPULLA, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. **Genes and Development**, v. 18, n. 4, p. 357-368, 2004.

KERNER, M. J.; NAYLOR, D. J.; ISHIHAMA, Y.; MAIER, T.; CHANG, H. C.; STINES, A. P.; GEORGOPOULOS, C.; FRISHMAN, D.; HAYER-HARTL, M.; MANN, M.; HARTL, F. U. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 209-220, 2005.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 847-856, 2000.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & Therapeutics,** v. 80, n. 2, p. 183-201, 1998.

KIRBY, C. J.; SMITH, M. F.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 273-285, 1997.

KREGEL, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 5, p. 2177-2186, 2002.

KRININGER, C. E., 3RD; BLOCK, J.; AL-KATANANI, Y. M.; RIVERA, R. M.; CHASE, C. C., JR.; HANSEN, P. J. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 1-2, p. 13-24, 2003.

KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D.; CHENG, K. H.; CAMPBELL, S. D.; AL-QYSI, H. M.; NOLAN, W. T.; LEPOCK, J. R. Factors influencing survival and growth of mammalian cells exposed to hypothermia. I. Effects of temperature and membrane lipid perturbers. **Journal of Cellular Physiology**, v. 115, n. 2, p. 179-185, 1983.

KUCEJ, M.; BUTOW, R. A. Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids. **Trends in Cell Biology,** v. 17, n. 12, p. 586-592, 2007.

KURYKIN, J.; WALDMANN, A.; TIIRATS, T.; KAART, T.; JAAKMA, U. Morphological Quality of Oocytes and Blood Plasma Metabolites in Repeat Breeding and Early Lactation Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v., n., p., 2011.

LAMBOWITZ, A. M.; KOBAYASHI, G. S.; PAINTER, A.; MEDOFF, G. Possible relationship of morphogenesis in pathogenic fungus, Histoplasma capsulatum, to heat shock response. **Nature**, v. 303, n. 5920, p. 806-808, 1983.

LARSSON, N. G.; CLAYTON, D. A. **Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders**: secondary title, 1995. 29**,** 151-178 p.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of animal science**, v. 48, n. 1, p. 76-86, 1979.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHARDJO, I.; SRINIVASULA, S. M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E. S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479-489, 1997.

LINARES, T. Embryonic development in repeat breeder and virgin heifers seven days after insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 4, n., p. 9, 1981.

LINDQUIST, S. Varying patterns of protein synthesis in Drosophila during heat shock: implications for regulation. **Developmental Biology**, v. 77, n. 2, p. 463-479, 1980.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annual Review of Biochemistry,** v. 55, n., p. 1151-1191, 1986.

LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE, D. L. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1745-1753, 2000.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 1, p. 48-53, 1994.

LOPES, A. S.; MARTINUSSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 3, p. 196-203, 2006.

LOUREIRO, B.; BRAD, A. M.; HANSEN, P. J. Heat shock and tumor necrosis factor-alpha induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9-dependent mechanism. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1129-1137, 2007.

LUBLIN, A.; WOLFENSON, D. Lactation and pregnancy effects on blood flow to mammary and reproductive systems in heat-stressed rabbits. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 115, n. 4, p. 277-285, 1996.

MAIA, A. S. C.; DASILVA, R. G.; BATTISTON LOUREIRO, C. M. Sensible and latent heat loss from the body surface of Holstein cows in a tropical environment. **International Journal of Biometeorology**, v. 50, n. 1, p. 17-22, 2005.

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. **Journal of animal science**, v. 68, n. 1, p. 266-280, 1990.

MAMO, S.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; LEAL, C. L.; AL NAIB, A.; MCGETTIGAN, P.; MEHTA, J. P.; EVANS, A. C.; FAIR, T. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v. 12, n., p. 151, 2011.

MAY-PANLOUP, P.; CHRÃ©TIEN, M. F.; JACQUES, C.; VASSEUR, C.; MALTHIÃ¨RY, Y.; REYNIER, P. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, v. 20, n. 3, p. 593-597, 2005a.

MAY-PANLOUP, P.; VIGNON, X.; CHRÃ©TIEN, M. F.; HEYMAN, Y.; TAMASSIA, M.; MATHIÃ¨RY, Y.; REYNIER, P. Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n., p., 2005b.

MAY-PANLOUP, P.; CHRETIEN, M.; MALTHIERY, Y.; REYNIER, P. Mitochondrial DNA in the Oocyte and the Developing Embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77, n., p. 51-83, 2007.

MAYER, M. P. Gymnastics of molecular chaperones. **Molecular Cell,** v. 39, n. 3, p. 321-331, 2010.

MCGUIRE, M. A.; BEEDE, D. K.; COLLIER, R. J.; BUONOMO, F. C.; DELORENZO, M. A.; WILCOX, C. J.; HUNTINGTON, G. B.; REYNOLDS, C. K. Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. **Journal of animal science**, v. 69, n. 5, p. 2050-2056, 1991.

MERTON, J. S.; ASK, B.; ONKUNDI, D. C.; MULLAART, E.; COLENBRANDER, B.; NIELEN, M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up-in vitro production embryo-production program. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 885-893, 2009.

MICHAELS, G. S.; HAUSWIRTH, W. W.; LAIPIS, P. J. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. **Developmental Biology**, v. 94, n. 1, p. 246-251, 1982.

MICHEL, G. P.; STARKA, J. Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of Zymomonas mobilis. **Journal of Bacteriology,** v. 165, n. 3, p. 1040-1042, 1986.

MITRA, R.; CHRISTISON, G. I.; JOHNSON, H. D. Effect of prolonged thermal exposure on growth hormone (GH) secretion in cattle. **Journal of animal science**, v. 34, n. 5, p. 776-779, 1972.

MONTY JR, D. E.; RACOWSKY, C. In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. **Theriogenology**, v. 28, n. 4, p. 451-465, 1987.

MORITA, Y.; PEREZ, G. I.; PARIS, F.; MIRANDA, S. R.; EHLEITER, D.; HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A.; FUKS, 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, n. 10, p. 1109-1114, 2000.

MOTYL, T. Regulation of apoptosis: Involvement of Bcl-2-related proteins. **Reproduction Nutrition Development**, v. 39, n. 1, p. 49-59, 1999.

NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; BERNABUCCI, U. Climatic effects on productive traits in livestock. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 1, p. 75-81, 2006.

NOVER, L.; SCHARF, K. D.; NEUMANN, D. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. **Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 1298-1308, 1989.

NRC, Nutritional Requirements of Dairy Cattle. Washington, DC.: Natl. Acad. Sci., 2001. v.7th reviewed edition

O'FARRELL, K. J.; LANGLEY, O. H.; HARTIGAN, P. J.; SREENAN, J. M. Fertilisation and embryonic survival rates in dairy cows culled as repeat breeders. **Veterinary Record**, v. 112, n. 5, p. 95-97, 1983.

PATRIARCA, E. J.; MARESCA, B. Acquired thermotolerance following heat shock protein synthesis prevents impairment of mitochondrial ATPase activity at elevated temperatures in Saccharomyces cerevisiae. **Experimental Cell Research,** v. 190, n. 1, p. 57-64, 1990.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical research Communications**, v. 295, n. 1, p. 37-42, 2002.

PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; MAJEWSKI, A. C.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 7, p. 2343-2351, 2003a.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE, C. C., JR.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E., 3RD; 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, n. 2, p. 285-294, 2003b.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 1, p. 63-67, 1992.

PIPER, P. W.; MILLSON, S. H.; MOLLAPOUR, M.; PANARETOU, B.; SILIGARDI, G.; PEARL, L. H.; PRODROMOU, C. Sensitivity to Hsp90-targeting drugs can arise with mutation to the Hsp90 chaperone, cochaperones and plasma membrane ATP binding cassette transporters of yeast. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 23, p. 4689-4695, 2003.

POLLARD, B. C.; ESTHEIMER, M. D.; DWYER, M. E.; GENTRY, P. C.; WEBER, W. J.; LEMKE, E.; BAUMGARD, L. H.; HENDERSON, D. A.; CROOKER, B. A.; COLLIER, R. J. The influence of parity, acclimatization to season, and recombinant bovine somatotropin (rbST) on diurnal patterns of prolactin and growth hormone in Holsteins exposed to heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 1, p. 121 (Abstr.), 2005.

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; STERZA, F. A. M.; SENEDA, M. M. Comparison of oocyte and embryo production among Bos taurus, Bos indicus and indicus-taurus donor cows. International Embryo Transfer Society, 2010 **Reproduction, Fertility and Development**, p. 248, 2010.

PONTES, J. H. F.; BASSO, A. C.; MENDANHA, M. F.; BARUSELLI, P. S. Effect of the season on the OPU⁄IVP efficiency in Holstein cow. VII Reuniuão Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2012 Acta Scientiae Veterinariae, p. (em via de publicação).

PURWANTO, B. P.; ABO, Y.; SAKAMOTO, R.; FURUMOTO, F.; YAMAMOTO, S. Diurnal patterns of heat production and heart rate under thermoneutral conditions in Holstein Friesian cows differing in milk production. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, n., p. 139–142, 1990.

PUTNEY, D. J.; MULLINS, S.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; GROSS, T. S. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 19, n. 1-2, p. 37-51, 1989.

QIAN, L.; SONG, X.; REN, H.; GONG, J.; CHENG, S. Mitochondrial mechanism of heat stress-induced injury in rat cardiomyocyte. **Cell Stress and Chaperones**, v. 9, n. 3, p. 281-293, 2004.

RATTO, M. H.; PERALTA, O. A.; MOGOLLON, G.; STROBEL, P.; CORREA, J. Transvaginal ultrasound-guided cumulus oocyte complexes aspiration and in vitro embryo production in suckled beef and lactating dairy cattle on pasture-based management conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 1-2, p. 1-6, 2011.

REYNIER, P.; MAY-PANLOUP, P.; CHRÃ©TIEN, M. F.; MORGAN, C. J.; JEAN, M.; SAVAGNER, F.; BARRIÃ¨RE, P.; MALTHIÃ¨RY, Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 5, p. 425-429, 2001.

RHOADS, M. L.; RHOADS, R. P.; VANBAALE, M. J.; COLLIER, R. J.; SANDERS, S. R.; WEBER, W. J.; CROOKER, B. A.; BAUMGARD, L. H. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1986-1997, 2009.

RHOADS, M. L.; KIM, J. W.; COLLIER, R. J.; CROOKER, B. A.; BOISCLAIR, Y. R.; BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Effects of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 170-179, 2010.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The heat shock response: life on the verge of death. **Molecular Cell,** v. 40, n. 2, p. 253-266, 2010.

RIVERA, R. M.; AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Short communication: seasonal effects on development of bovine embryos produced by in vitro fertilization in a hot environment. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 2, p. 305-307, 2000.

RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 107-115, 2001.

RIVERA, R. M.; KELLEY, K. L.; ERDOS, G. W.; HANSEN, P. J. Effects of a physiologicaly-relevant heat-shock on the cytoskeleton of 2-cell bovine embryos. Research Symposium for the Animal Molecular and Cellular Biology, 2003a, Marineland, p. 6p, 2003.

RIVERA, R. M.; KELLEY, K. L.; ERDOS, G. W.; HANSEN, P. J. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically relevant heat shock. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 6, p. 2068-2077, 2003b.

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J. F.; O'FARRELL, K. J.; MACSIURTAIN, M.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 939-949, 2005.

ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEL, J. D.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in Bos taurus but not in Bos indicus cows. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 657-665, 1998.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Comparação entre a taxa de concepção após inseminação artificial ou a transferência de embriões em vacas Holandesas de alta produção repetidoras de serviço. XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Costa do Sauípe, 2007: Acta Scientiae Veterinariae, p. 1255, 2007a.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Taxa de concepção à inseminação artificial e à transferência de embriões em vacas Holandesas de alta produção. XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Costa do Sauípe, 2007. Acta Scientiae Veterinariae, p. 1254, 2007b.

ROMAN-PONCE, H.; THATCHER, W. W.; CATON, D.; BARRON, D. H.; WILCOX, C. J. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **Journal of animal science**, v. 46, n. 1, p. 175-180, 1978.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 120, n. 1, 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. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 745-751, 2001a.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 737-744, 2001b.

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, n. 6, p. 1898-1906, 2004a.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 2072-2078, 2004b.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 235-244, 2005.

ROTH, Z. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: Mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n., p. 238-244, 2008.

RUTLEDGE, J. J.; MONSON, R. L.; NORTHEY, D. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Seasonality of cattle embryo production in a temperate region. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 330-330, 1999.

RUTLEDGE, J. J. Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 105-111, 2001.

SALES, J. N. S. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas Bos indicus e Bos taurus. 2011.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. 161 p. Tese (Doutorado em Ciências).

SANTOS, T. A.; EL SHOURBAGY, S.; ST. JOHN, J. C. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 3, p. 584-591, 2006.

SARTORI, R.; ROSA, G. J.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2813-2822, 2002.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; 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. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2803-2812, 2002.

SAS.INSTITUTE. **SAS User's Guide: Statistics**: secondary title. Cary, NC: SAS Institute, 2002-2003.

SCARPULLA, R. C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 611-638, 2008a.

SCARPULLA, R. C. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 1147, n., p. 321-334, 2008b.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 37-43, 2001.

SHADEL, G. S.; CLAYTON, D. A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. **Annual Review of Biochemistry,** v. 66, n., p. 409-436, 1997.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

SMITH, L. C.; THUNDATHIL, J.; FILION, F. Role of the mitochondrial genome in preimplantation development and assisted reproductive technologies. **Reproduction Fertility and Development**, v. 17, n. 1-2, p. 15-22, 2005.

SOTO, P.; SMITH, L. C. BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 7, p. 637-646, 2009.

STANKIEWICZ, A. R.; LACHAPELLE, G.; FOO, C. P. Z.; RADICIONI, S. M.; MOSSER, D. D. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 46, p. 38729-38739, 2005.

STEUERWALD, N.; BARRITT, J. A.; ADLER, R.; MALTER, H.; SCHIMMEL, T.; COHEN, J.; BRENNER, C. A. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. **Zygote**, v. 8, n. 3, p. 209-215, 2000.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. Illinois International Embryo Transfer Society Inc, 1998. 180 p.

SZALAY, M. S.; KOVACS, I. A.; KORCSMAROS, T.; BODE, C.; CSERMELY, P. Stress-induced rearrangements of cellular networks: Consequences for protection and drug design. **FEBS Letters**, v. 581, n. 19, p. 3675-3680, 2007.

TAMASSIA, M.; NUTTINCK, F.; MAY-PANLOUP, P.; REYNIER, P.; HEYMAN, Y.; CHARPIGNY, G.; STOJKOVIC, M.; HIENDLEDER, S.; RENARD, J. P.; CHASTANT-MAILLARD, S. In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. **Biology of Reproduction,** v. 71, n. 2, p. 697-704, 2004a.

TAMASSIA, M.; NUTTINCK, F.; MAY-PANLOUP, P.; REYNIER, P.; HEYMAN, Y.; CHARPIGNY, G.; STOJKOVIC, M.; HIENDLEDER, S.; RENARD, J. P.; CHASTANT-MAILLARD, S. In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with

oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 697-704, 2004b.

TAN, S. J.; LU, K. H. Effects of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 33, n., p. 335, 1990.

THOMPSON, J. G.; PARTRIDGE, R. J.; HOUGHTON, F. D.; COX, C. I.; LEESE, H. J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, n. 2, p. 299-306, 1996.

TITO, E. A. L. Clima: influência na produção de leite. In: Simpósio Brasileiro de Ambiência na Produção de Leite, 1998, Piracicaba:FEALQ, p. 10-23.

TOIVOLA, D. M.; STRNAD, P.; HABTEZION, A.; OMARY, M. B. Intermediate filaments take the heat as stress proteins. **Trends in Cell Biology,** v. 20, n. 2, p. 79-91, 2010.

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

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 51-75, 2001.

TSUJIMOTO, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria? **Genes to Cells**, v. 3, n. 11, p. 697-707, 1998.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology,** v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

VASSENA, R.; MAPLETOFT, R. J.; ALLODI, S.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 923-932, 2003.

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas à recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2005 Acta Scientiae Veterinariae, p. 1-4.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Evolução no uso das técnicas de fertilização in vitro na última década e impacto na indústria de embriões bovinos e produção animal no Brasil. XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Porto de Galinhas, 2010: Acta Scientiae Veterinariae, p. 325-334, 2010.

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; SILVA, P. R. L.; SALES, J. N. S.; SÁ FILHO, M. F.; RANIERI, A. L.; BARUSELLI, P. S. Superovulatory response and pregnancy rates of Holstein cows in vivo embryo production within different categories during summer and winter. XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologias de Embriões, 2011. Acta Scientiae Veterinariae, p. 39, 365, 2011.

VIGH, L.; NAKAMOTO, H.; LANDRY, J.; GOMEZ-MUNOZ, A.; HARWOOD, J. L.; HORVATH, I. Membrane regulation of the stress response from prokaryotic models to mammalian cells. **Annals of New York Academic Science**, v. 1113, n., p. 40-51, 2007.

VOGEL, J. L.; PARSELL, D. A.; LINDQUIST, S. Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. **Current Biology**, v. 5, n. 3, p. 306-317, 1995.

WADA, S.; CUI, Z. G.; KONDO, T.; ZHAO, Q. L.; OGAWA, R.; SHOJI, M.; ARAI, T.; MAKINO, K.; FURUTA, I. A hydrogen peroxide-generating agent, 6-formylpterin enhances heat-induced apoptosis. **International Journal of Hyperthermia**, v. 21, n. 3, p. 231-246, 2005.

WAI, T.; AO, A.; ZHANG, X.; CYR, D.; DUFORT, D.; SHOUBRIDGE, E. A. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 1, p. 52-62, 2010.

WALDMANN, A.; REKSEN, O.; LANDSVERK, K.; KOMMISRUD, E.; DAHL, E.; REFSDAL, A. O.; ROPSTAD, E. Progesterone concentrations in milk fat at first insemination--effects on non-return and repeat-breeding. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1-2, p. 33-41, 2001.

WALLACE, D. C. **A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine**: secondary title, 2005. 39**,** 359-407 p.

WARD, F. A.; LONERGAN, P.; ENRIGHT, B. P.; BOLAND, M. P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 433-446, 2000.

WELCH, W. J.; FERAMISCO, J. R. Purification of the major mammalian heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 24, p. 14949-14959, 1982.

WELCH, W. J.; SUHAN, J. P. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. **Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 4, p. 1198-1211, 1985.

WILLIAMS, R. S. Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 26, p. 12390-12394, 1986.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n., p. 535-547, 2000.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A., JR.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Hum Reprod**, v. 16, n. 5, p. 893-901, 2001.

WRIGHT, J. **Photomicrographic illustration of embryo codes**. Savoy, IL: International Embryo Transfer Society, 1998. 167–170 p. (Manual of the International Embryo Transfer Society)

WU, C. W.; PING, Y. H.; YEN, J. C.; CHANG, C. Y.; WANG, S. F.; YEH, C. L.; CHI, C. W.; LEE, H. C. Enhanced oxidative stress and aberrant mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells during methamphetamine induced apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 220, n. 3, p. 243-251, 2007.

YANG, M. Y., LU, K. H. The influence of bovine oocyte ,type on in vitro fertilization and subsequent development in vitro. **Theriogenology**, v. 33, n., p. 335, 1990.

YOST, H. J.; LINDQUIST, S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. **Cell**, v. 45, n. 2, p. 185-193, 1986.

YOUSEF, M. K. **Stress physiology: definition and terminology.** . Boca Raton, Florida: Stress Physiology in Livestock, 1984, v.1 Basic Principles. 5 p.

YURA, T.; TOBE, T.; ITO, K.; OSAWA, T. Heat shock regulatory gene (htpR) of Escherichia coli is required for growth at high temperature but is dispensable at low temperature. **Proceedings of the Natlional Academic Science, U S A**, v. 81, n. 21, p. 6803-6807, 1984.

YUSUF, M.; NAKAO, T.; RANASINGHE, R. B.; GAUTAM, G.; LONG, S. T.; YOSHIDA, C.; KOIKE, K.; HAYASHI, A. Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. **Theriogenology**, v. 73, n. 9, p. 1220-1229, 2010.

ZENG, H. T.; YEUNG, W. S. B.; CHEUNG, M. P. L.; HO, P. C.; LEE, C. K. F.; ZHUANG, G. L.; LIANG, X. Y.; O, W. S. In vitro-matured rat oocytes have low mitochondrial deoxyribonucleic acid and adenosine triphosphate contents and have abnormal mitochondrial redistribution. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 3, p. 900-907, 2009.

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. **Reproduction**, v. 121, n. 3, p. 447-454, 2001.

ZEUTHEN, E. Synchrony in Tetrahymena by heat shocks spaced a normal cell generation apart. **Experimental Cell Research**, v. 68, n. 1, p. 49-60, 1971.

Anexo A - Índice de temperatura e umidade (ITU) para bovinos (Adaptado de Armstrong, 1994).

°C	UR %										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
22,2											72
22,8										72	73
23,3									72	73	74
23,9								72	73	74	75
24,4							72	73	74	75	76
25,0						72	73	74	75	76	77
25,6					72	73	74	75	76	77	78
26,1					73	74	75	76	77	78	79
26,7				72	73	74	75	76	77	78	80
27,2				72	73	75	76	77	78	79	81
27,8				73	74	75	77	78	78	80	82
28,3			72	73	75	76	78	79	80	82	83
28,9			73			77	78	80	81	83	84
29,4		72	73	75	76	78	79	81	82	84	85
30,0		72	74	75	77	78	80	81	83	84	86
30,6	72	73	74	76	77	79	81	82	84	85	87
31,1	72	73	75	76	78	80	81	83	85	86	88
31,7	72	74	75	77	79	80	82	84	86	87	89
32,2	73	74	76	78	79	81	83	85	86	88	90
32,8	73	75	76	78	80	82	84	86	87	89	91
33,3	74	75	77	79	81	83	85	86	88	90	92
33,9	74	76	78	80	81	83	85	87	89	91	93
34,4	75	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94
35,0	75	77	79	81	83	85	87	89	91	93	95
35,6	76	77	79	81	83	85	88	90	92	94	96
36,1	76	78	80	82	84	86	88	91	93	95	97
36,7	76	78	80	83	85	87	89	91	94	96	98
37,2	77	79	80			88	92	92	94	97	
37,8	77	79	82	84	86	88	91	93	95	98	
38,3	78	80	82	84	87	89	92	94	96		
38,9	78	80	83	85	87	90	92	95	97		
39,4	79	81	83	86	88	91	93	96			
40,0	79	81	84	86	89	91	94	96			
40,6	80	82	84	87	89	92	94	97			
41,1	80	82	85	88	90	93	95				
41,7	81	83	85	88	91	94	96				
42,2	81	83	86	89	92	94	97				
42,8	81	84	87	89	92	95					
43,3	82	84	87	90	93	96					
43,9	82	85	88	91	94	96					
44,4	83	85	88	91	94	97					
45,0	83	86	89	92	95						
45,6	84	86	89	92	96						
46,1	84	87	90	93	96						
46,7	85	87	90	94	97						
47,2	85	88	91	94	98						
47,8	85	88	92	95							
48,3	86	89	92	96							

Legenda:

- Ausência de estresse – até 72
- Estresse moderado - 72 a 79
- Estresse Térmico – 79 a 89
- Severo estresse térmico – 90 a 98
- Ocorrência de morte – acima de 98