

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRISCILA DOS SANTOS SILVA

**Impactos do estresse térmico por calor sobre a placenta de cabras: função  
endócrina e estresse oxidativo**

---

Pirassununga

2022

PRISCILA DOS SANTOS SILVA

**Impactos do estresse térmico por calor sobre a placenta de cabras: função  
endócrina e estresse oxidativo**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e  
Engenharia de Alimentos da Universidade de São  
Paulo para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e  
Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

d586i dos Santos Silva, Priscila  
Impactos do estresse térmico por calor sobre a  
placenta de cabras: função endócrina e estresse  
oxidativo / Priscila dos Santos Silva ; orientadora  
João Alberto Negrão. -- Pirassununga, 2022.  
107 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia  
de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Antioxidantes. 2. Apoptose. 3. Cabritos. 4.  
Hormônios placentários. 5. Região  
Intercotiledonária. I. Alberto Negrão, João,  
orient. II. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

SILVA, P. dos S. **Impactos do estresse térmico por calor sobre a placenta de cabras: função endócrina e estresse oxidativo.** 2022. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. João Alberto Negrão

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Julgamento: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Luciane Silva Martello

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Julgamento \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus por ter me concedido sabedoria, força e determinação para realizar este trabalho, pois sem Ele, eu nada seria.

Agradeço a mim, pela persistência e não ter desistido no meio do caminho, por ter superado os obstáculos, decepções, estresses, depressão... e ter chegado até a reta final e conquistado a vitória.

Dedico este trabalho a minha família, que mesmo estando longe geograficamente estão sempre ao meu lado, apoiando, incentivando, torcendo e vibrando por cada conquista. Abdicar da convivência de vocês para correr atrás dos sonhos não foi fácil, segurar as lágrimas por causa da saudade e ver os cabelos brancos chegando através da tela de computador muito menos, mas acredito que nenhum esforço foi em vão e cada momento será celebrado e abençoado.

Ao Manu, meu grande amigo, só tenho palavras de agradecimento pela sua amizade e parceira, pelas risadas, choros, desabafos, carro emprestado, torcida, incentivo... Na bíblia diz que há amigos mais chegados que irmãos e tenho certeza que você é um deles.

Dedico aos meus amigos, aos meus bons e queridos amigos que me acompanharam não só durante o doutorado, mas durante toda a trajetória na pós-graduação. Obrigada por me acolherem como família, por ter me ajudado na caminhada, sem vocês a caminhada teria sido muito mais árdua.

Dedico a Prof<sup>o</sup> Kiki, que além de professora, se tornou uma amiga querida.

Giovanna, por ter sido praticamente uma coorientadora e ter me dado todo suporte necessário durante esta caminhada.

Dedico a FZEA/Pirassununga, a conclusão dessa fase marca não só o encerramento do doutorado, mas de uma caminhada de 8 anos na FZEA/USP em Pirassununga. Então, agradeço a esse Campus (funcionários, técnicos, professores) que me recebeu de braços abertos em 2014 como residente e se tornou a minha segunda casa.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão, pela oportunidade, orientação e confiança durante o curso de mestrado.

Ao Laboratório de Fisiologia Animal (LAFA), por ceder os animais e toda a estrutura necessária para a execução deste trabalho.

A Giovana, técnica do Laboratório de Fisiologia Animal, pelo ensinamento e apoio durante a execução de cada etapa do experimento, análises laboratoriais e manejo com os animais.

À Professora Anneliese (Prof<sup>a</sup>. Kiki), pelo apoio e disponibilização dos animais para a colheita das amostras.

As Sra. Ângela e Sra. Esmeralda, técnicas do Laboratório de Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Sr. João, Funcionário da Prefeitura do Campus Fernando Costa no Setor de Caprinocultura, pelo apoio e disponibilização dos animais para a colheita das amostras.

Ao Emanuel Manica e Renata Freitas, pelo auxílio no transporte das amostras para São Paulo durante o período da pandemia.

“E ainda que... conhecesse todos os mistérios e toda a ciência... e não tivesse amor, nada seria.”

I Coríntios 13.2

## RESUMO

SILVA, P. dos S. **Impactos do estresse térmico sobre a placenta de cabras: função endócrina e estresse oxidativo.** 2022. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

A placenta como órgão multifuncional, tem por finalidade promover um ambiente adequado para o desenvolvimento fetal. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo* e *in vitro*, o efeito do estresse térmico por calor sobre a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, apoptose, função endócrina e de proteção das células cotiledonárias e intercotiledonárias do tecido placentário caprino, e os impactos sobre a prole até os 60 dias de vida. O experimento *in vivo* compreendeu um período de 120 dias no qual, a partir de 60 dias pré-parto, 46 cabras prenhes e saudáveis foram diariamente expostas a tratamento de termoneutralidade ou estresse térmico e após o parto assistido, os filhotes foram monitorados até o desmame. Neste experimento observou-se que o estresse térmico por calor tem impacto negativo sobre as características e eficiência placentária, comprometendo a atividade de suas células, através do aumento da taxa de apoptose, redução da expressão dos hormônios placentários PRL, LP e seu receptor PRLR e provocando uma redução na expressão das enzimas antioxidantes, e apesar de intensificar o comportamento materno-filial positivo, comprometeu a resposta dos cabritos com modificações na concentração do cortisol, respostas termorregulatórias e peso durante o período de avaliação. No experimento *in vitro* foi realizado cultivo de células da região cotiledonária e intercotiledonária, que foram submetidas a três tratamentos térmicos: 38,3°C, 39,3°C e 40,3°C durante 6, 12, 24 e 48 horas, e tratamento controle a 37°C (tempo 0). Dos cultivos celulares de cada período de tratamento foram dosados componentes relacionados ao estresse oxidativo, e a expressão de genes relacionados a apoptose e função placentária. Observou-se portanto, que o estresse térmico por calor causou estresse oxidativo, aumentou a expressão de genes relacionados a apoptose e modificou a expressão de LP, e embora, as células cotiledonárias e intercotiledonárias placentárias apresentaram diferentes perfis de resposta ao estresse térmico, o aumento da temperatura aumentou nestas células a atividade dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que controlam a peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Antioxidantes. Apoptose. Cabritos. Hormônios placentários. Região intercotiledonária

## ABSTRACT

SILVA, P. dos S. **Impacts of heat on the placenta of goats:** endocrine function and oxidative stress. 2022. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2022.

The placenta as a multifunctional organ that promotes a suitable environment for fetal development. Therefore, the aim of this study was to evaluate, *in vivo* and *in vitro*, the effect of heat stress on gene expression related to oxidative, apoptosis, endocrine and protective stress in cotyledonary and intercotyledonary cells of goat's placental tissue, and the impacts on their offspring until 60 days of life. The *in vivo* experiment comprises a period of 120 days in which, since 60 days prepartum, 46 pregnant goats were daily exposed to a thermoneutrality or heat stress treatments and after the partum was assisted, the offsprings were monitored from birth to weaning. In this experiment, it was observed that heat stress has a negative impact on the characteristics and efficiency of placenta cells, compromising cells activity, increasing the apoptosis rate, reducing the expression of placental hormones PRL, LP, PRLR receptor and promoting a reduction in the expression of antioxidant enzymes, and although it may intensify the positive maternal-offspring behavior, compromised the goatlings' response with modifications on cortisol concentration, thermoregulatory responses and weight during the evaluation period. In the *in vitro* experiment, cells from the intercotyledonary and intercotyledonary regions were cultivated in three heat treatments: 38.3°C, 39.3°C and 40.3°C during 6, 12, 24 and 48 hours, and control at 37°C (time 0). From the cell cultures of each period were measured the components related to oxidative stress, the gene expression related to apoptosis and placental function. From the cell cultures of each period dosed components related to the treatment of oxidative stress, and the expression of genes related to apoptosis and placental function. Therefore, it was observed, that heat stress caused oxidative stress, increased the genes expression for apoptosis and modified the expression of LP. Although placental cotyledonary and intercotyledonary cells showed different responses in face of heat stress, the increase of temperature in these cells had enhanced the activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants that control lipid peroxidation.

Keywords: Antioxidants. Apoptosis. Goat kids. Intercotyledonary region. Placental Hormones.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 HIPÓTESE .....	13
1.2 OBJETIVO GERAL.....	13
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
1.4 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
REFERÊNCIAS .....	20
<b>2 Heat stress affects the expression of key genes in the placenta, placental characteristics, and efficiency of Saanen goats and the survival and growth of their kids1 .....</b>	<b>25</b>
ABSTRACT .....	26
2.1 INTRODUCTION .....	27
2.2 MATERIALS AND METHODS .....	28
2.3 RESULTS .....	34
2.4 DISCUSSION.....	39
REFERENCES .....	42
<b>3 Os impactos do estresse por calor no pré-parto sobre a função placentária, comportamento materno-filial e desenvolvimento dos cabritos até o desmame.....</b>	<b>47</b>
RESUMO .....	47
ABSTRACT .....	48
3.1 INTRODUÇÃO.....	49
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.3 RESULTADOS .....	59
3.4 DISCUSSÃO .....	65
3.5 CONCLUSÃO.....	70
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>75</b>
<b>4 Efeitos do estresse por calor sobre os componentes envolvidos no estresse oxidativos e expressão de genes relacionados a apoptose e função das células cotiledonárias e intercotiledonária da placenta de cabras .....</b>	<b>85</b>
RESUMO .....	85
ABSTRACT .....	86
4.1 INTRODUÇÃO.....	87
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	88

4.3 RESULTADOS .....	94
4.4 DISCUSSÃO .....	98
4.5 CONCLUSÃO .....	102
REFERÊNCIAS .....	102
5 CONCLUSÕES .....	107

## 1 INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão endócrino transitório que tem ampla capacidade de síntese de hormônios como o lactogênio placentário (LP) e a prolactina (PRL), barreira de proteção enzimática por meio da enzima 11 $\beta$ -hidroxidesidrogenase tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2), entre outras funções que a tornam um órgão complexo com atribuições indispensáveis para o vínculo mãe-placenta-feto, manutenção da gestação, desenvolvimento fetal e da glândula mamária. Uma insuficiência placentária compromete as funções biológicas dependentes do seu funcionamento. (BURTON; FOWDEN, 2015; BURTON; JAUNIAUX, 2015; BYATT et al. 1992; CEDARD, 1997; COSTA, 2016; MUTINATI et al. 2013; MYATT, 2010).

Durante a fase inicial da gestação, o estabelecimento do fluxo sanguíneo da placenta está intrinsecamente relacionado com o estresse oxidativo, pois devido a insuficiente rede vascular para promover oxigenação adequada, a placenta passa por uma fase de hipóxia transitória que altera a cadeia de transportes de elétrons mitocondrial (CTEM), induzindo o aumento da atividade desta organela e através de enzimas presentes na CTEM e da própria célula como NADPH oxidase, xantina oxidase e flavinas ocorre a formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) como óxido nítrico, monóxido de carbono e peroxinitrito que por sua vez, tem efeito vasoativo, promovendo a reatividade vascular e com isso proliferação e diferenciação celular (MUTINATI et al., 2013; MYATT; CUI, 2004; WU; TIAN; LIN, 2015). Com o avançar da gestação, a demanda de oxigênio celular é suprida pelo estabelecimento da rede vascular. Com isso, no final da gestação, a ocorrência do estresse oxidativo é associada com o desenvolvimento de doenças gestacionais, como a toxemia da gestação (MUTINATI et al., 2013; MYATT; CUI, 2004).

O estresse oxidativo é definido pelo equilíbrio entre as EROS e a capacidade dos antioxidantes em eliminá-los através do sequestro dos radicais livres ou por detoxificação enzimática. Desta forma, o sistema de antioxidantes é composto por enzimas como superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px), catalases, oxiredutases que estão presentes na própria célula, e os antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas A, C, E, tocoferóis, ubiquitinóis e minerais (MUTINATI et al., 2013; MYATT; CUI, 2004; SORDILLO, 2013; WU; TIAN; LIN, 2015).

No entanto, quando submetido a situações adversas como o estresse térmico por calor, o tecido placentário fica mais sensível aos danos causados pela elevação da

temperatura e intensifica o estresse oxidativo provocando desarranjo estrutural celular devido ao aumento exacerbado de radicais livres que reagem com as cadeias de ácidos graxos provocando a peroxidação lipídica (SILVA et al. 2021; WAWRZYKOWSKI et al. 2021) que pode causar apoptose, modificações nas características histológicas e gênicas da placenta. Nesta condição, a contra resposta celular ao estresse oxidativo e ao efeito do estresse térmico por calor via síntese das proteínas de choque térmico (HSP) são intensificadas, afim de que se evite a instabilidade celular causado pela desnaturação proteica que leva ao dano na replicação, transcrição e reparo do DNA defeituoso causando o processamento inadequado do material genético e aumento da taxa de apoptose (CALAPRE; GRAY; ZIMAN, 2013; DANGI; GUPTA; DANGI, 2015; HOLLAND et al., 2017; MOHANARAO et al. 2014; SCHOOTS et al., 2018; SINGH et al. 2016).

Sendo assim, este estudo propõe que o estresse térmico por calor causa insuficiência placentária, comprometendo o balanço EROs/antioxidantes, aumentando a taxa de apoptose, influenciando negativamente na expressão de genes relacionados a função placentária e refletindo conseqüentemente no desenvolvimento da prole.

## 1.1 HIPÓTESE

O estresse térmico por calor causa estresse oxidativo e aumenta a taxa de apoptose na placenta, acentuando a expressão dos genes envolvidos no sistema de proteção celular e alterando o desempenho das células placentárias, que por fim, compromete o desenvolvimento da prole.

## 1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vivo* e *in vitro*, o efeito do estresse térmico por calor sobre os componentes do estresse oxidativo e a viabilidade de células cotiledonárias e intercotiledonárias do tecido placentário caprino no desempenho de suas funções e os impactos pós natal sobre a prole.

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar o impacto do estresse térmico por calor sobre a expressão gênica (*in vivo* e *in vitro*) e proteica (*in vivo*) do lactogênio placentário, prolactina e receptor de prolactina;
- b. Estudar os impactos, *in vivo* e *in vitro*, do estresse por calor sobre a expressão dos genes relacionados ao cortisol, como o receptor de glicocorticoide (GR), mineralocorticoide (MR) e a enzima 11 $\beta$ -HSD2 nas células cotiledonárias e intercotiledonárias do tecido placentário;
- c. Estudar o efeito *in vivo* e *in vitro* do estresse por calor sobre o perfil oxidativo de células cotiledonárias e intercotiledonárias através da dosagem do malondialdeído (MAD), capacidade antioxidante total, e dosagem e expressão gênica de enzimas produtoras de espécies reativas ao oxigênio (EROs): NADPH oxidase 1 (NOX-1) e 5 (NOX-5), óxido nítrico sintase (eNOS), e enzimas antioxidantes (SOD e glutatona peroxidase 1 (GSH-Px 1) e 3 (GSH-Px 3));
- d. Estudar o impacto do estresse por calor como indutor da apoptose das células placentárias através da técnica de Tunel e expressão gênica de Bax, Bcl-2 e caspase 3 e relação Bax/Bcl-2;

- e. Estudar o impacto do estresse por calor durante o período gestacional sobre o comportamento materno filial, as respostas termorregulatórias e peso dos cabritos do nascimento ao desmame com 60 dias.

## 1.4 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.3.1 A placenta e sua função endócrina

Em ruminantes, devido a estrutura anatômica de característica cotiledonária, a placenta pode ser dividida em duas porções: a porção materna, composta pelo epitélio uterino representado pela carúncula, e a porção fetal, que por sua vez é composta pelos cotilédones e região intercotiledonária de origem trofoblástica, onde a união da carúncula (materna) com o cotilédone (fetal) originam o placentoma (LAWN; CHIQUOINE; AMOROSO, 1969; NGUYEN et al., 2012).

Durante a gestação a placenta exerce funções cruciais para o desenvolvimento e manutenção da gestação e crescimento fetal, dentre estas, a de órgão endócrino. A síntese dos hormônios placentários tem ação autócrina, parácrina e endócrina e desta forma estabelece intrínseca relação na unidade materno-placenta-fetal que se torna cada vez mais dependente com o avançar do período gestacional (CEDARD, 1997; COSTA, 2016).

A nível celular, a placenta é composta por três tipos celulares principais, as células uninucleadas (CUN), as células binucleadas (CBN) e as células multinucleadas (CMN). Dentre estas, as CBN compõem o principal tipo celular com atividade endócrina. Na placenta de ovinos e caprinos, este tipo celular corresponde a cerca de 15 a 20% da população do trofotoderma fetal e são responsáveis pela produção e/ou armazenamento de diversos hormônios placentários como lactogênio placentário (LP), prolactina (PRL), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), estrógenos, progesterona (COSTA, 2016; HIDEN et al., 2009; WARD; WOODING; FOWDEN, 2002).

Após a fusão das CBN com as células do tecido materno, originam-se as células multinucleadas que, por sua vez, estão relacionadas com a implantação e fixação do tecido fetal ao materno, sendo denominadas também de células híbridas fetomaternais. Estas, também têm a função de transferir os metabólitos produzidos e armazenados nas CBN para a corrente sanguínea materna por exocitose (BRAUN et al., 2007; WANGO; WOODING; HEAP, 1990; WOODING, 1992). Sendo assim, a produção dos diferentes

hormônios placentários como o lactogênio placentário (LP) podem ser influenciados pela população celular placentária (BYATT et al., 1992).

Entre os hormônios placentários, mais de 300 funções tem sido atribuídas a PRL, que atua em diversos eventos fisiológicos, fatores comportamentais, imunorregulatórios, metabólicos, de crescimento e angiogênese, além de ser considerada como um dos reguladores homeostáticos do ambiente intrauterino por controlar a transferência do volume e dos íons (sódio e potássio) do líquido amniótico através da membrana amniótica para o ambiente extrauterino, evitando, desta forma, que mudanças bruscas ocorram na tonicidade do líquido amniótico e comprometa o desenvolvimento fetal. (CORBACHO; ESCALERA; CLAPP, 2002; GOOTWINE, 2004; HANDWERGER; FREEMARK, 1987).

Juntamente com a PRL, o hormônio do crescimento (GH) e o LP são proteínas homologas que formam uma família por derivarem de um mesmo peptídeo ancestral comum, sendo que a PRL e o GH são hormônios produzidos principalmente pela adenohipófise dos vertebrados e o LP é sintetizado exclusivamente pela placenta (CORBACHO; ESCALERA; CLAPP, 2002; FORSYTH, 1986). No entanto, apesar da similaridade ancestral, além destes hormônios atuarem de forma sinérgica, mas em distintas funções, a forma de ação da atividade placentária do GH/PRL é diferenciada entre as espécies e apesar de ainda não estar totalmente esclarecido a espécie-especificidade das formas de ação, esta pode estar relacionada com características reprodutivas como a habilidade de gestar múltiplos fetos (GOOTWINE, 2004).

Alguns estudos sugeriam que o LP teria surgido da duplicação do gene da PRL por apresentarem similaridade de até 50% e menos de 25% com o GH (BYATT et al., 1992). Na evolução do conhecimento, verificou-se que os mRNAs do LP codificam proteínas que são 85% idênticas ao GH e 17% idênticas a PRL (HANDWERGER; FREEMARK, 2000). Mas o que a literatura mostra de forma unânime é que o LP tem afinidade com ambos tipos de receptores, fato que o caracteriza como capaz de atuar em atividades biológicas somatogênicas e lactogênicas (BYATT et al., 1992; HANDWERGER; FREEMARK, 2000). Desta forma, os níveis de LP sintetizados refletem diretamente na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos maternos participando do controle homeostático energético materno-fetal que estimula a produção de IGF-1 regulando portanto, o crescimento fetal e a mamogênese (BYATT et al., 1992; CEDARD, 1997; COSTA, 2016; SCHOKNECHT et al., 1996).

Com o avançar da gestação também ocorre maior síntese e liberação de hormônios, como LP, PRL e IGF-I, que estão envolvidos com o desenvolvimento gestacional. Desta forma, a produção dos diversos hormônios placentários está direta ou indiretamente relacionados com vias que promovem o crescimento celular e vascular, a fim de melhorar o aporte nutricional e trocas gasosas (CORBACHO; ESCALERA; CLAPP, 2002; HOFFMAN et al., 2018).

Devido a intrínseca relação entre o status endócrino e nutricional, os níveis circulantes dos hormônios placentários podem influenciar e serem influenciados pela ação de outros hormônios de forma que favoreça o melhor aproveitamento das fontes nutricionais, a exemplo do LP que por estar envolvido no metabolismo energético influencia a ação de outros hormônios inibindo (como a leptina placentária) ou estimulando (como a insulina fetal) sua síntese e secreção (COSTA, 2016). Desta forma, a insuficiência placentária em sintetizar hormônios resultar no desenvolvimento inadequado tanto da própria placenta como dos fetos (HANDWEGER; FREEMARK, 2000; HOFFMAN et al., 2018).

### 1.3.2 O estresse térmico por calor e a defesa placentária através da enzima 11 $\beta$ -HSD2 e as proteínas de choque térmico

Em 1930, o pesquisador Hans Selye definiu o estresse como “uma resposta não específica do corpo a qualquer demanda por mudança”, na qual diversos eventos estressores como calor, frio, deficiência nutricional, doenças, entre outros podem desencadear essa resposta não específica do organismo (SANDMAN; DAVIS; GLYNN, 2012).

Quando sob condições de estresse, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é ativado desencadeando uma cascata de síntese e liberação hormonal que prepara o organismo para agir contra a fonte estressora, onde o indivíduo pode apresentar uma reação imediata de alarme, progredindo para resistência e por fim exaustão dos mecanismos de defesa colocando em risco a saúde do mesmo (SILANIKOVE, 2000). Entretanto, durante a gestação ocorre uma adaptação do organismo materno ao aumento dos níveis dos hormônios do eixo HHA (SANDMAN; DAVIS; GLYNN, 2012).

A placenta, por sua vez, também é capaz de produzir hormônios que antes eram específicos do eixo HHA. Alguns estudos demonstram que, com a síntese do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) placentário, a sua concentração na corrente sanguínea

de mulheres gestantes pode atingir níveis de 1000 até 10000 vezes maiores que mulheres não-gestantes. Pelo fato do CRH ser o principal estimulador da síntese de ACTH que por sua vez tem como produto final o cortisol, esta via torna-se um ciclo de retroalimentação, já que o cortisol através do fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), que também tem sua ação desencadeada por fatores de estresse, estimula a liberação do CRH placentário (JENSEN et al. 2010; PETRAGLIA et al. 1987; SANDMAN; DAVIS; GLYNN, 2012; THOMSON, 2013; WANG et al. 2014).

Apesar do cortisol ser considerado o principal biomarcador do estresse, durante a gestação ocorre o aumento dos receptores de glicocorticoides (GR) placentário, tornando mais eficiente sua interação com o cortisol. Em concentrações fisiológicas, o cortisol favorece o desenvolvimento fetal ao se ligar aos GR hepáticos do feto e estimular a ativação da enzima glucose-6-fosfatase, aumentando o metabolismo hepático da glicose via gliconeogênese ou glicólise, e conseqüentemente impulsionando a disponibilização de energia para suprir a necessidade fetal (JENSEN et al. 2010; LÓPEZ et al. 2012). O cortisol fetal também desempenha a importante função de controlar a população das células binucleadas (CBN) uma vez que, estas são as principais células endócrinas placentária (WARD; WOODING; FOWDEN, 2002). Desta forma, a variação nas concentrações do cortisol acarreta em comprometimento placentário e fetal por promover redução da população de CBN com conseqüente redução da produção dos hormônios placentários (BRAUN et al., 2007; FOWDEN et al., 2015) e impactar negativamente da taxa de crescimento fetal (JENSEN et al., 2010).

Em contrapartida, a placenta possui uma barreira de proteção reduzindo o efeito do cortisol por meio da enzima 11 $\beta$ -hidroxidesidrogenase (11 $\beta$ -HSD), que inativa-o convertendo em cortisona. Desta forma, quando a placenta está saudável, a enzima 11 $\beta$ -HSD é extremamente eficiente no bloqueio do excesso de glicocorticoides maternos, minimizando os efeitos sobre o feto (HONG MA; XUAN WU; NATHANIELSZ, 2003; BENEDIKTSSON et al., 1997). No entanto, quando há insuficiência da atividade placentária, ocorre redução da síntese da enzima 11 $\beta$ -HSD e aumento da concentração de cortisol no meio intrauterino que conseqüentemente causa redução do desenvolvimento fetal (MCMULLEN et al. 2004).

A natureza do estressor pode intensificar os danos causados no organismo, a exemplo do estresse térmico por calor que altera a termorregulação promovendo desequilíbrio térmico materno e fetal e conseqüentemente reduz a taxa de fluxo sanguíneo placentário comprometendo a nutrição placentária e fetal, assim como a oxigenação e

eliminação de metabólitos (ASAKURA, 2004; FAURIE; MITCHELL; LABURN, 2001; LABURN et al., 2002; REYNOLDS et al., 2006).

A nível celular, o estresse térmico provoca desestabilização da membrana prejudicando o desempenho funcional da célula e induzindo respostas de proteção por meio das proteínas de choque térmico (HSP), que promovem a adaptação, com posterior aclimatação (SINGH et al. 2016; MOHANARAO et al. 2014). Este fenômeno de medida protetiva contra injúrias subsequentes, é conhecido como tolerância ao estresse (NEUER, 2000).

Apesar das HSPs terem como função principal garantir a viabilidade celular, sendo responsáveis pela e manutenção da integridade celular durante situações de estresse, elas podem ser expressas com maior ou menor eficiência em resposta a fatores como temperatura (DANGI et al., 2012), duração do estresse térmico (DANGI; GUPTA; DANGI, 2015) e idade (DANGI et al. 2012).

Nos tecidos reprodutivos, as HSPs como a HSP 27, HSP 70 e HSP 90, estão tanto envolvidas na proteção celular em casos de hipóxia e demais complicações gestacionais, assim como na regulação dos receptores de hormônios esteroides influenciando diretamente na atividade dos mesmos (HROMADNIKOVA et al. 2015; TABIBZADEH et al. 1996), como ocorre com o GR, que para tornar-se apto a receber o hormônio dependente da intrínseca ligação com o complexo proteico da HSP 90 (LORENZ et al. 2014).

### 1.3.3 Estresse oxidativo na placenta, indutor de apoptose e a proteção celular

Na gestação, devido a formação, implantação e desenvolvimento placentário, a intensa atividade mitocondrial durante estes eventos intensifica a produção de EROs, estabelecendo o status de estresse oxidativo (MYATT; CUI, 2004).

Este é definido como um desbalanço na produção de EROs associado com a incapacidade dos agentes antioxidantes em eliminá-los. Desta forma, as EROs, que são radicais livres, atuam sobre as proteínas e lipídios causando injúria celular. Fisiologicamente, as EROs são importantes fatores para o desenvolvimento da gestação, pois permitem a implantação e desenvolvimento embrionário, atuam no combate aos patógenos, como agentes transdutores de sinais, na esteroidogênese e tem efeitos vasoativos na placenta (MUTINATI et al. 2013; MYATT; CUI, 2004).

No início da gestação, o desenvolvimento do arranjo ou rede vascular proporciona um ambiente de hipóxia devido à baixa tensão intrauterina de oxigênio, mantendo este status até o final do terço inicial quando ocorre o estabelecimento e abertura dos vasos sanguíneos promovendo a reoxigenação. Associado a este quadro de modificação na perfusão tecidual, a placenta ainda é incapaz de ter uma defesa de antioxidantes eficientes, fatores estes que proporcionam maior impacto dos efeitos do estresse oxidativo (VONNAHME; LEMLEY, 2012; WU; TIAN; LIN, 2015). No entanto, no final da gestação, o aumento do estresse oxidativo está relacionado com ocorrência de patologias gestacionais e restrição do crescimento intrauterino por promoverem aumento da taxa de apoptose das células placentárias e alteração da reatividade vascular, comprometendo a função placentária (MYATT; CUI, 2004).

Na placenta, as EROs podem ser formadas pela ação de enzimas celulares como NADPH oxidase, xantina oxidase, enzimas flavinas, reações mediadas pela enzima citocromo P450 e pelo sistema respiratório mitocondrial. Desta forma, os EROs podem ser consideradas um subproduto da esteroidogênese e, pelo fato da mitocôndria ter um intenso consumo do oxigênio e ATP produzido, esta organela torna-se uma grande produtora de EROS, que por sua vez incrementa esta produção ao longo da gestação, uma vez que, a massa mitocondrial tem uma relação positiva com a idade gestacional (MYATT; CUI, 2004; MUTINATI et al. 2013).

Apesar da ocorrência do estresse oxidativo ser esperado em algumas fases da gestação, é o equilíbrio entre a produção de EROs e ação de agentes antioxidantes que favorece a manutenção da homeostasia placentária. Sendo assim, o desequilíbrio desta condição contribui com o aumento da disponibilidade dos radicais livres prejudicando a viabilidade celular (MUTINATI et al. 2013).

No estresse por calor, o aumento da temperatura causa peroxidação lipídica na membrana celular e dano oxidativo nas proteínas e DNA, além de estimular a ação da enzima xantina oxidase a promover disfunção circulatória limitando, portanto a tolerância ao calor (DANGI; GUPTA; DANGI, 2015; HALL et al., 2019).

Os danos celulares provocados pelas EROs desestabilizam a célula impossibilitando o desempenho de suas funções e impulsiona o aumento da taxa de apoptose celular. A apoptose causada pelas EROs podem ser induzidas por ativações da via intrínseca ou extrínseca, onde os sinais enviados para iniciar o processo de apoptose podem ser mediados pela ativação dos receptores de morte da superfície celular ou via mitocondrial (WU; TIAN; LIN, 2015).

Em contrapartida, como forma de defesa contra as ações das espécies reativas de oxigênio, a placenta tenta eliminar ou minimizar os efeitos causados através da supressão do estresse oxidativo, promovendo a invasão das células trofoblásticas e angiogênese e suprimindo a apoptose celular (JONES et al. 2010; WU; TIAN; LIN, 2015).

Por esse fato, todos os principais agentes antioxidantes são encontrados na placenta e expressos pelos diferentes tipos celulares (MYATT; CUI, 2004), sendo que as enzimas antioxidantes podem ser expressas em diferentes regiões da placenta, variando de acordo com a intensidade do fluxo sanguíneo da região (HEMPSTOCK et al. 2003). Desta forma, os antioxidantes conseguem limitar os danos causados pelas EROs ao promover a catalise da conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (JONES et al. 2010) e juntamente com as HSPs impede o desencadear da apoptose através da inibição da caspase 3 aumentando desta forma a sobrevivência celular (WHITLOCK et al. 2005).

## REFERÊNCIAS

- ASAKURA, H. Fetal and Neonatal Thermoregulation. **Journal of Nippon Medical School**, v. 71, p. 360–370, 2004.
- BENEDIKTSSON, R. et al. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. **Clinical Endocrinology**, v. 46, n. 2, p. 161–166, 1997.
- BRAUN, T. et al. Maternal betamethasone administration reduces binucleate cell number and placental lactogen in sheep. **Journal of Endocrinology**, v. 194, n. 2, p. 337–347, 2007.
- BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta: a multifaceted, transient organ. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 370, p. 1–8, 2015.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta? **The American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 213, n. 4, p. S6.e1-S6.e4, 2015.
- BYATT, J. C. et al. Ruminant placental lactogens: structure and biology. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 9, p. 2911–2923, 1992.
- CALAPRE, L.; GRAY, E. S.; ZIMAN, M. Heat stress: A risk factor for skin carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 337, n. 1, p. 35–40, 2013.
- CEDARD, L. The Endocrine Function of the Placenta: Interactions Between Trophic Peptides and Hormones. **Placental function and fetal nutrition**, v. 39, p. 59–74, 1997.
- CORBACHO, A. M.; ESCALERA, G. M. De; CLAPP, C. Roles of prolactin and related members of the prolactin / growth hormone / placental lactogen family in angiogenesis. **Journal of Endocrinology**, v. 173, p. 219–238, 2002.

COSTA, M. A. The endocrine function of human placenta : an overview. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 32, n. 1, p. 14–43, 2016.

DANGI, S. S. et al. Expression profile of HSP genes during different seasons in goats (Capra hircus). **Trop Anim Health Prod**, v. 44, n. APRIL, p. 1905–1912, 2012.

DANGI, S. S. et al. Modulatory effect of betaine on expression dynamics of HSPs during heat stress acclimation in goat ( Capra hircus ). **Gene**, v. 575, n. 2, p. 543–550, 2016.

DANGI, S. S.; GUPTA, M.; DANGI, S. K. Expression of HSPs : an adaptive mechanism during long-term heat stress in goats ( Capra hircus ). **International Journal of Biometeorology**, v. 59, p. 1095–1106, 2015.

FAURIE, a S.; MITCHELL, D.; LABURN, H. P. Feto-maternal relationships in goats during heat and cold exposure. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 2, p. 199–204, 2001.

FORSYTH, I. A. Variation Among Species in the Endocrine Control of Mammary Growth and Function: The Roles of Prolactin , Growth Hormone , and Placental Lactogen. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 886–903, 1986.

FOWDEN, A. L. et al. Review : Endocrine regulation of placental phenotype. **Placenta**, v. 36, p. S50–S59, 2015.

GOOTWINE, E. Placental hormones and fetal – placental development. **Animal Reproduction Science**, v. 83, p. 551–566, 2004.

HALL, D. M. et al. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. **American Journal of Physiology Heart Circ Physiol**, v. 52242, n. June 2000, p. 509–521, 2019.

HANDWEGER, S.; FREEMARK, M. The Roles of Placental Growth Hormone and Placental Lactogen in the Regulation of Human Fetal Growth and Development. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 13, p. 343–356, 2000.

HANDWERGER, S.; FREEMARK, M. Role of placental lactogen and prolactin in human pregnancy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 219, p. 399–420, 1987.

HEMPSTOCK, J. et al. Intralobular differences in antioxidant enzyme expression and activity reflect the pattern of maternal arterial bloodflow within the human placenta. **Placenta**, v. 24, n. 5, p. 517–523, 2003.

HIDEN, U. et al. Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. **Journal of Anatomy**, v. 215, n. 1, p. 60–68, 2009.

HOFFMAN, F. et al. Maternal nutritional restriction during late gestation impairs development of the reproductive organs in both male and female lambs. **Theriogenology**, v. 108, p. 331–338, 2018.

HONG MA, X.; XUAN WU, W.; NATHANIELSZ, P. W. Gestation-related and betamethasone-induced changes in 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in the baboon placenta. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 2003.

HROMADNIKOVA, I. et al. Assessment of placental and maternal stress responses in patients with pregnancy related complications via monitoring of heat shock protein mRNA levels. **Molecular Biology Reports**, v. 42, p. 625–637, 2015.

JENSEN, E. C. et al. Physiologic changes in maternal cortisol do not alter expression of growth-related genes in the ovine placenta. **Placenta**, v. 31, n. 12, p. 1–13, 2010.

JONES, M. L. et al. Antioxidant Defenses in the Rat Placenta in Late Gestation: Increased Labyrinthine Expression of Superoxide Dismutases, Glutathione Peroxidase 3, and Uncoupling Protein 21. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 2, p. 254–260, 2010.

LABURN, H. P. et al. Effects on fetal and maternal body temperatures of exposure of pregnant ewes to heat, cold, and exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 802–808, 2002.

LAWN, A. M.; CHIQUOINE, A. D.; AMOROSO, E. C. The development of the placenta in the sheep and goat: an electron microscope study. **Journal of Anatomy**, v. 3, p. 557–578, 1969.

LORENZ, O. R. et al. Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein. **Molecular Cell**, v. 53, n. 6, p. 941–953, 2014.

MCMULLEN, S. et al. Alterations in placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$  HSD) activities and fetal cortisol:cortisone ratios induced by nutritional restriction prior to conception and at defined stages of gestation in ewes. **Reproduction**, v. 127, n. 6, p. 717–725, 2004.

MUTINATI, M. et al. Oxidative stress during pregnancy in the sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 3, p. 353–357, 2013.

MYATT, L.; CUI, X. Oxidative stress in the placenta. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, p. 369–382, 2004.

NEUER, A. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 2, p. 149–159, 2000.

NGUYEN, P. T. T. et al. Multilevel Regulation of Steroid Synthesis and Metabolism in the Bovine Placenta. **Molecular Reproduction & Development**, v. 79, p. 239–254, 2012.

PETRAGLIA, F. et al. Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotropin-releasing factor in human placenta. **Nature**, v. 328, p. 717–719, 1987.

REYNOLDS, L. P. et al. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. **The Journal of Physiology**, v. 572, n. Pt 1, p. 51–8, 2006.

SANDMAN, C. A.; DAVIS, E. P.; GLYNN, L. M. Psychobiological Stress and Preterm Birth. In: **Preterm Birth - Mother and Child**. [s.l.: s.n.]p. 1–31.

SCHOKNECHT, P. A. et al. Effect of chronic infusion of placental lactogen on ovine fetal growth in late gestation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 519–528, 1996.

SCHOOTS, M. H. et al. Oxidative stress in placental pathology. **Placenta**, v. 69, p. 153–161, 2018.

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**, v. 67, n. 1–2, p. 1–18, 2000.

SILVA, P. S. et al. Heat stress affects the expression of key genes in the placenta, placental characteristics, and efficiency of Saanen goats and the survival and growth of their kids. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4970–4979, 2021.

SORDILLO, L. M. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. **Veterinary medicine international**, v. 2013, p. 154045, jan. 2013.

TABIBZADEH, S. et al. Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Human Reproduction**, v. 11, p. 633–640, 1996.

THOMSON, M. The physiological roles of placental corticotropin releasing hormone in pregnancy and childbirth. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 69, p. 559-573, 2013.

VONNAHME, K. A.; LEMLEY, C. O. Programming the offspring through altered uteroplacental hemodynamics: How maternal environment impacts uterine and umbilical blood flow in cattle, sheep and pigs. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 97–104, 2012.

WANG, W. S. et al. Involvement of CRH and hCG in the induction of aromatase by cortisol in human placental syncytiotrophoblasts. **Placenta**, v. 35, p. 30-36, 2014.

WANGO, E. O.; WOODING, F. B.; HEAP, R. B. The role of trophoblastic binucleate cells in implantation in the goat: a morphological study. **Journal of anatomy**, v. 171, p. 241–57, 1990.

WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. The Effects of Cortisol on the Binucleate Cell Population in the Ovine Placenta During Late Gestation. **Placenta**, v. 23, p. 451–458, 2002.

WAWRZYKOWSKI, J. et al. The comparison of pro- and antioxidative parameters in plasma and placental tissues during early phase of placental development in cows. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 2, p. 1291–1297, 2021.

WHITLOCK, N. A. et al. Heat shock protein 27 delays Ca<sup>2+</sup>-induced cell death in a

caspase-dependent and -independent manner in rat retinal ganglion cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, n. 3, p. 1085–1091, 2005.

WOODING, F. B. P. The synepitheliochorial placenta of ruminants: Binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, v. 13, n. 2, p. 101–113, 1992.

WU, F.; TIAN, F. J.; LIN, Y. Oxidative stress in placenta: Health and diseases. **BioMed Research International**, n. 1–15, 2015.

## 2 Heat stress affects the expression of key genes in the placenta, placental characteristics, and efficiency of Saanen goats and the survival and growth of their kids

O presente capítulo apresentado nesta tese refere-se ao artigo aceito dia 09 de novembro de 2020 pelo **Journal Dairy Science** (Fator de impacto: 4,034).

### ARTICLE IN PRESS



J. Dairy Sci. 104

<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18301>

© 2021 American Dairy Science Association®. Published by Elsevier Inc. and FASS Inc. All rights reserved.

### Heat stress affects the expression of key genes in the placenta, placental characteristics, and efficiency of Saanen goats and the survival and growth of their kids

P. S. Silva,<sup>1</sup> H. B. Hooper,<sup>1</sup> E. Manica,<sup>1</sup> G. K. F. Merighe,<sup>1</sup> S. A. Oliveira,<sup>1</sup> A. S. Traldi,<sup>2</sup> and J. A. Negrão<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 13635-900, Brazil

<sup>2</sup>Department of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 13635-900, Brazil

#### ABSTRACT

Heat stress is detrimental during gestation; however, the effects of heat stress on goat placental characteristics and kid survival remain unclear. The objective of this study was to evaluate the effects of heat stress at final gestation on cortisol concentration, placenta characteristics, and the expression of genes related to placenta. Forty-six primiparous and multiparous Saanen goats were subjected to control (CT; under a thermoneutral environment: air temperature between 12°C and 25°C and the relative humidity from 45 to 73%, n = 23) or heat stress (HS; under a climatic chamber: air temperature at 37°C and the relative humidity at 60 to 70% from 0800 to 1600 h, n = 23) from the last 60 d of pregnancy until the first colostrum suckling. The heat challenge imposed on HS goats during the parturition period increased their rectal temperature, respiratory frequency, and cortisol levels in plasma and amniotic fluid versus CT goats. In the placenta, HS treatment also increased the expression of the *HSPA1A* gene. Heat-stressed goats also showed significantly lower expression of *HSD11B2* and greater expression of *MC2R* and *NR3C1* than CT goats, suggesting that heat stress decreased the effectiveness by which the HSD11B2 enzyme converts cortisol to cortisone and increased placental responsiveness to cortisol. The HS goats took longer to release the placenta with lighter placental cotyledons, and HS goats had a lower ratio between the kid's weight at birth and placenta weight than CT goats. There was no treatment effect on the kids' survival or weights at birth, but the kids from goats subjected to HS presented lesser cortisol concentration and greater mortality rates at weaning than kids from CT goats. Finally, the overexpression of *HSPA1A*

by HS goats suggests a protective response of placenta. However, the heat stress negatively affected the placenta's expulsion length, placental cotyledons number, weight and area, the ratio between kid's weight and placenta weight, and cortisol signaling. Indeed, the up-regulation of *MC2R* and *NR3C1* and downregulation of *HSD11B2* on placenta caused by heat stress were associated with greater cortisol concentrations in the amniotic fluid of HS goats. Although HS and CT kids had adequate weights and survival rate during the first weeks of life, the heat stress increased the mortality at weaning of HS kids versus CT kids, suggesting that the heat stress effect persists and can change the ability of kids to respond to weaning challenge.

**Key words:** placenta, stress, cortisol, receptor

#### INTRODUCTION

The development of the placenta during pregnancy is essential for physiological adjustments that induce adequate parturition and newborn survival (Rizzo and Arduini, 2009; Burton and Fowden, 2015). Heat stress (HS) has been considered a risk factor that increases newborn mortality and reduces growth and milk yield (Cottrell and Seckl, 2009; Laporta et al., 2017; Cherak et al., 2018; Fabris et al., 2019). However, the effect of HS on placenta weight, cotyledon number, cotyledon weight, cotyledon area, and placenta efficiency (the relationship between the kid's weight and the placenta weight) remains unclear (Dwyer et al., 2005; Konyali et al., 2007; Oeak et al., 2015).

During pregnancy, the enzyme 11- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) reduces the effect of cortisol on the placenta and fetus, converting cortisol (active form) to cortisone (inactive form) (Benediktsson et al., 1997; Clarke et al., 2002; Ghaemmaghami et al., 2014). However, an excessive increase in cortisol synthesis by the female, fetus, and placenta negatively affect the placental nutrient supply and fetal growth (Braun et

Received February 1, 2020.

Accepted November 9, 2020.

\*Corresponding author: [jnegrao@usp.br](mailto:jnegrao@usp.br)

## ABSTRACT

Heat stress is detrimental during gestation; however, the effects of heat stress on goat placental characteristics and kid survival remain unclear. The objective of this study was to evaluate the effects of heat stress at final gestation on cortisol concentration, placenta characteristics, and the expression of genes related to placenta. Forty-six primiparous and multiparous Saanen goats were subjected to control (CT, under a thermoneutral environment: air temperature between 12°C and 25°C and the relative humidity from 45 to 73%, n = 23) or heat stress (HS, under a climatic chamber: air temperature at 37°C and the relative humidity at 60 to 70% from 0800 to 1600 h, n = 23) from the last 60 days of pregnancy until the first colostrum suckling. The heat challenge imposed on HS goats during the pre-partum period significantly increased their rectal temperature, respiratory frequency, and cortisol levels in plasma and amniotic fluid versus CT goats. In the placenta, HS treatment also significantly increased the expression of the *HSPA1A* gene. Heat-stressed goats also showed significantly lesser *11BHSD2I* gene expression and greater *ACTHR* and *GR* gene expression than CT goats suggesting that HS decreased the effectiveness by which the 11BHSD2I enzyme converts cortisol to cortisone and increased placental responsiveness to cortisol. Heat stress goats took significantly longer to release the placenta with lighter placental cotyledons, and HS goats had a worse ratio between the kid's weight at birth and placenta weight than CT goats. There was no treatment effect on the kids' survival or weight at birth, but the kids from goats subjected to HS presented significantly lesser cortisol concentration and greater mortality rates at weaning than kids from CT goats. Finally, the overexpression of the *HSPA1A* gene by HS goats suggests a protective response of placenta. However, the heat stress negatively affected the placenta's expulsion length, placental cotyledons number, weight and area, the ratio between kid's weight and placenta weight, and cortisol signaling. Indeed, the upregulation of the *ACTHR* and *GR* genes and downregulation of the *11BHSD2* gene on placenta caused by heat stress were associated with greater cortisol concentrations in the amniotic fluid of HS goats. Although, HS and CT kids had adequate weights and survival rate during the first weeks of life, the heat stress increased the mortality at weaning of HS kids versus CT kids suggesting that the heat stress effect persists and can change the ability of kids to respond to weaning challenge.

Key words: Cortisol. Placenta. Receptors. Stress

## 2.1 INTRODUCTION

The development of the placenta during pregnancy is essential for physiological adjustments that induce adequate parturition and newborn survival (BURTON; FOWDEN, 2015; RIZZO; ARDUINI, 2009; ). Heat stress (HS) has been considered a risk factor that increases newborn mortality and reduces growth and milk yield (CHERAK et al. 2018; COTTRELL; SECKL, 2009; FABRIS et al. 2019; LAPORTA et al. 2017). However, the effect of HS on placenta weight, cotyledon number, cotyledon weight and area as well as their relationship with kid birth weight used to calculate the placenta efficiency (DWYER et al. 2005; KONYALI et al. 2007; OCAK et al. 2015) remains unclear.

During pregnancy, the enzyme 11-B-hydroxysteroid dehydrogenase (11B-HSD) reduces the impact of cortisol on the placenta and fetus, converting cortisol (active form) to cortisone (inactive form) (BENEDIKTSSON et al. 1997; CLARKE et al. 2002; GHAEMMAGHAMI et al. 2014). However, an excessive increase in cortisol synthesis by the female, fetus, and placenta negatively impact the placental nutrient supply and fetal growth (BRAUN et al. 2007; TOGHER et al. 2014; VAUGHAN et al. 2016). On the other hand, heat shock proteins (HSPs) that participate in the process of adaptation and acclimatization of animals are also involved in placental development (BAHR et al. 2014; OZAYDIN et al. 2016; SHOCHET et al. 2016). Although an increase in HSP synthesis has been related to positive responses during different heat challenges (CHONG et al. 1998; DANGI et al. 2016; MOHANARAO et al. 2014; NEUER, 2000), the relationships between HSPs and the placenta during HS in pregnancy remain unclear.

Some authors have reported that CORT action is regulated by its interactions with the corticotropin-releasing hormone receptor (CRHR), adrenocorticotrophic hormone receptor (ACTHR), glucocorticoid receptor (GR), and mineralocorticoid receptor (MR) in different tissues (COTTRELL; SECKL, 2009; KIRSCHKE et al. 2014). Other authors have argued that 11B-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 (11BHSD1 and 11BHSD2) and HSPs (HSPB1, HSPD1, HSPA1A and HSP1) have protective roles in different tissues (DANGI et al. 2016; GHAEMMAGHAMI et al. 2014; MOHANARAO et al. 2014). However, the interactions between these receptors, enzymes, and proteins that can modulate CORT synthesis and action under HS remain unknown in the placenta. In this context, HS can be an additional challenge during pregnancy because it changes the relationships between cortisol synthesis and the expression of the GR, MR, ACTHR,

CRHR, 11BHSD1, 11BHSD2, HSPB1, HSPD1, HSPA1A, and HSP1 genes in the placenta. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of HS at the final stage of pregnancy on placenta efficiency, the expression of key genes in the placenta, cortisol concentrations in the amniotic fluid and plasma of goats and kids, and the weight and survival rate of kids.

## 2.2 MATERIALS AND METHODS

All animal handling and study procedures were approved by the Animal Ethics Committee (CEUA, protocol 3709280316) of the Faculty of Animal Science and Food Engineering (FZEA) of the University of São Paulo (USP) in accordance with Brazilian federal law.

This study was performed at the Laboratory of Animal Physiology of the Basic Sciences Department in the Faculty of Animal Science and Food Engineering (FZEA/USP) in Pirassununga, Brazil (latitude 21° 57' 02" S, longitude 47° 27' 50" W). The climate in this area is classified as subtropical with an annual average temperature of 23°C, annual average air humidity of 73%, a rainy season from November to March, and annual rainfall that varies from 1300 to 2000 mm. Data were collected between June and September.

All goats had free access to water and food. Goats were fed twice per day (0700 and 1600 h) with a total diet based on the proportion of dry matter that contained 50% concentrate (corn and soybean meal) and 50% roughage (coast-cross hay and corn silage); this was supplemented with a mineral and vitamin mix. This diet provided 100% of the animals' nutritional requirements (NRC, 2007), and the feed intake was adjusted weekly for each goat to result in 15% leftover food. Adjustments were made weekly considering the animal's body weight, physiological phase (gestation or lactation), and milk yield; the feed bunks were checked to guarantee leftovers. All kids were monitored from birth to the end of the first suckling, and the kids that did not suck colostrum until 2 h after birth received goat colostrum. After the first colostrum suckling, the kids were separated from their mothers and housed in collective pens. Kids received 0.8 L/d of goat milk from 1 to 15 days; from day 15 to weaning at 60 d of age, the kids received 1.5 L/d of goat milk. From day 1 to 44 of age, milk was provided twice daily (0700 and 1700 h); from day 45 to weaning, milk was provided once daily (at 0700 h). After day 3 of age, all kids had ad libitum access to water, hay, and mixed grains; the leftovers were observed but not

weighted. All kids received the same management and standard procedures indicated for their age.

#### 2.1.1. Experimental design

Forty-six Saanen goats were used: 14 primiparous and 33 multiparous,  $3.0 \pm 1.0$  years old on average, with an average body weight of  $55.5 \pm 5.5$  kg and average body score of  $3.5 \pm 1.0$ . The breeding season occurred in a controlled manner using three distinct Saanen males of the same breed, and these three males were equally distributed among treatments. The pregnancy diagnosis was performed 40 days after the breeding season to confirm the age and number of fetuses. The goats were randomly assigned to one of the following treatments: control (CT: under a thermoneutral environment,  $n = 23$ ) or HS (under a climatic chamber,  $n = 23$ ) according to their previous parity, number of fetuses, milk yield, body weight, and body condition scores. Goats were subjected to either CT or HS treatment from the last 60 days of pregnancy until the first colostrum suckling.

In the CT environment, the air temperature varied from  $12^{\circ}\text{C}$  to  $25^{\circ}\text{C}$ , and the relative humidity from 45 to 73%. These environmental conditions were considered thermoneutral for the goats (PEREIRA et al. 2011; SILVA, 2000). The HS goats were maintained inside a climatic chamber with a heating system that maintained the air temperature at  $37^{\circ}\text{C}$  and the relative humidity at 60 to 70% from 0800 to 1600 h; after this period, the heating system was turned off, and the air temperature and humidity returned gradually to the environmental conditions. After the first colostrum suckling, HS goats were returned to the same thermoneutral condition as the CT goats. The HS and CT goats were housed in similarly covered pens with approximately  $3\text{ m}^2$  per animal, a concrete floor with wooden platform bedding, and a fence wall that allowed airflow.

#### 2.1.2. Data collection and sampling

In all experiments, the air temperature (AT) and relative humidity (RH) data were recorded every 15 min using a data-logger (HOBO U12-013, Bourne, MA, USA), and the temperature-humidity index (THI) was calculated daily as proposed by Mader et al. (2006) in the CT and HS environments. When compared to the CT treatment, HS goats were exposed to a stressful environment from the last 60 days of pregnancy until the first

colostrum suckling (Table 1). After the first colostrum suckling, HS goats were returned to the same thermoneutral condition as the CT goats.

Table 1 - Mean and standard deviation estimate of air temperature (AT, °C), relative humidity (RH, %), and temperature-humidity index (THI) in the control (CT) and heat stress (HS) environments (treatments) during heat challenge (1000 h to 1600 h) from the last 60 days of pregnancy until the first colostrum suckling.

Item	Environments (treatments) <sup>1</sup>	
	CT	HS
AT (°C)	25.2 ± 0.9	37.1 ± 3.4
RH (%)	54 ± 4.2	60 ± 5.4
THI <sup>2</sup>	72 ± 1.2	89 ± 9.9

<sup>1</sup>Environments: CT - control treatment; HS - heat stress treatment.

<sup>2</sup>Temperature-humidity index (THI) was calculated as proposed by Mader et al. (2006).

Respiratory frequency (RF) was estimated by counting the flank movements for 1 min, and rectal temperature (RT) was determined by using a digital thermometer. These data were taken at 1500 h on the following days: 15<sup>th</sup> pre-parturition (considered day – 15); at parturition (day 0); and on the 15<sup>th</sup> post-parturition (day +15). The RF and RT data were measured pre- and post-parturition to confirm the effectiveness of the HS treatment.

During the last 60 days of pregnancy, all goats were visually monitored every 4 h; if characteristic signs indicated that parturition was starting, then each goat was accompanied individually for 24 h. During delivery, the contractions were visually observed, and each amniotic fluid sample was collected in sterile tubes after the amniotic sac was ruptured or punctured when part of the placenta was exposed or when the kid was expelled with intact placenta. Each placenta was immediately recovered after delivery; placenta samples were immediately stored at –80°C for gene expression analyses, and amniotic fluid samples were stored at –30°C until cortisol analysis.

Next, each placenta was washed with physiological saline (0.9%), dried, weighed, and stored at 4°C for dissection and measurements of all cotyledons. Each cotyledon from the placentas was counted, dissected, weighed, and measured for width and length using a digital caliper (Starfer Ferramentas, SP, SP, Brazil) after which their area was calculated. As suggested by previous authors (DWYER et al. 2005; OCAK et al. 2015), all the cotyledons were classified as small ( $\leq 1$  cm in length), medium ( $> 1$  and  $\leq 5$  cm in length), large ( $> 5$  cm and  $\leq 10$  cm in length), or extra-large ( $> 10$  cm in length). The characteristics of each placenta were registered, and the placental efficiency was

calculated considering the relationship between the kid's weight and the placenta weight in grams (DWYER et al. 2005).

After birth, blood samples were taken from mothers and offspring by jugular vein punctures. All kids were then weighed. Goats and kids were monitored from birth to the end of the first suckling; those that did not suck colostrum until 2 h after birth received the colostrum in a bottle. Plasma samples were stored at  $-30^{\circ}\text{C}$  until the cortisol analysis.

Pregnancy duration was measured as days from copulation to delivery. Parturition length was measured as minutes from the appearance of fetal membranes or amniotic fluid until the full delivery of the last kid. The data concerning the duration of parturition considered the number of kids, and the parturition was classified as single, double, and triples; and the duration was evaluated individually. Here, the duration of parturition was short and lesser than 60 minutes, which is normal for single and multiple pregnancies (KONYALI et al. 2007). The placenta expulsion length was measured as the time, in minutes, from the delivery of the last kid to the full expulsion of the placenta.

In the present study, 43 experimental goats had natural parturition (eutocic) and three were assisted (dystocic) during the parturition. The goats that experienced dystocia (2 goats from CT and 1 goat from HS treatment) were excluded from statistical analysis.

### 2.1.3. Laboratory analysis

Cortisol levels in the amniotic fluid and the plasma were measured by immunoassay analysis using a commercial kit (Monobind, Lake Forest, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Here, the cortisol intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.5% and 4.4%, respectively.

A part of the placenta sample was used for gene expression analysis by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The placenta samples used for gene expression were taken from 3-year-old goats with eutocic parturition, single placenta, two kids, and similar parturition lengths and placenta expulsion lengths relative to the averages ( $15.00 \pm 4.00$  min and  $35.00 \pm 20.00$  min). As fifty percent of all experimental goats presented these characteristics, and these characteristics are considered normal for goats (Konyali et al., 2007; Mellado et al., 2012), 14 goats (7 goats from CT and 7 goats from HS treatment) were evenly distributed to previous milk production and parturition day to have 14 representative placenta samples. Placental tissue (150 mg) included the membranes and cotyledon from 14 experimental goats (7 samples from CT and 7 from HS goats) used

for RNA extraction. The RNA of these samples was extracted and purified using a PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The quality of each RNA sample was evaluated by the optical density at the 260 and 280 nm absorbance waves, and the 260/280 absorption rate was approximately 2. The RNA concentrations were determined using Qubit 2.0 Fluorometric Quantification (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Total RNA samples were treated with RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA) to exclude genomic DNA contamination from the analysis. The RNA was reverse-transcribed into cDNA using the GoScript Reverse Transcriptase kit (Promega, Madison, WI, USA).

The expression of target genes was determined by RT-PCR equipment (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) using primers for *GR*, *MR*, *11BHSD1*, *11BHSD2*, *CRH*, *CRHR*, *ACTHR*, *HSPB1*, *HSPD1*, *HSPA1A*, *HSP1*, and *UBC* (housekeeping) described in Table 2. Each gene was amplified in a separate reaction, and each reaction was performed in duplicate. Each reaction was performed with a 20- $\mu$ L reaction mixture comprised of 1  $\mu$ L of cDNA sample (mean concentration, 10 ng/ $\mu$ L); 10  $\mu$ L of SYBR Green (Invitrogen, Burlington, ON, Canada); 0.8  $\mu$ L of the primer pairs described in Table 1 (final concentration, 0.4  $\mu$ M); and 8.2  $\mu$ L of ultrapure water. The thermocycling conditions for all genes were as follows: incubation stage at 95°C for 10 min; 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min; and the treatment was finished with a dissociation (melt) curve. For each set of primers, the PCR efficiency was close to 100%. The RT-PCR efficiency was confirmed for all the primer pairs used, and specific products were verified using melt curve analysis and 1.5% agarose gel electrophoresis.

Table 2 - Primer sequences for the genes analyzed using RT-PCR.

Genes <sup>1</sup>	Primer sequences	Genbank code <sup>2</sup>
<i>11BHSD1</i>	3'AGCAGACCAACGGGAGCATT5'	AF548027.2
	5'GGAGAAGAACCCATCCAGAGCA3'	
<i>11BHSD2</i>	3'CGAGCACTTGAATGGGCAGTT5'	AF074706.2
	5'CCTGGGTAATAGCGGCGGAGT3'	
<i>CRH</i>	3'CATCACAGCACCCCCAGCC5'	NM_001013400
	5'GCAGCGCTCGGAAAAAGTT3'	

Continua

Continuação

Table 2 - Primer sequences for the genes analyzed using RT-PCR.

Genes <sup>1</sup>	Primer sequences	Genbank code <sup>2</sup>
<i>CRHR</i>	3'ACTACGACAATGAGAAGTGCTGGTT5'	XM_018065278
	5'AGCACCAGAGTGGCCTTCAC3'	
<i>GR</i>	3'CCATTTCTGTTCACGGTGTG5'	XM_005683087
	5'CTGAACCGACAGGAATTGGT3'	
<i>MR</i>	3'GGGTCTATCTGTAGCCCTGGAA5'	XM_005691196
	5'TGTCTGGACTGGGAACCACAT3'	
<i>ACTHR</i>	3'ACATGGGTTACCTCGAGCC5'	NM_174109
	5'AGATTGTGATGTAGCGGTCA3'	
<i>HSPB1</i>	3'CGGACGCACCCAGACCAGCCAGCAT5'	NM_001025569.1
	5'GGCTGTGGGCCGGATAACCAGTCGCG3'	
<i>HSPD1</i>	3'ACTGGCTCCTCATCTCACTC5'	NM_001166609.1
	5'TGTTCAATAATCACTGTCCTTCC3'	
<i>HSPA1A</i>	3'AACATGAAGAGCGCCGTGGAGG5'	U09861
	5'GTTACACACCTGCTCCAGCTCC3'	
<i>HSP1</i>	3'GCATTCTCAGTTCATTGGCTATCC5'	NM_001012670.2
	5'GTCCTTCTTCTCTTCCCTCCTCTTC3'	
<i>UBC</i>	3'ATGCAGATCTTTGTGAAGAC5'	NM_001206307.1
	5'CTTCTGGATGTTGTAGTC3'	

<sup>1</sup>Genes: *11BHS1* – 11-B-hydroxysteroid dehydrogenase type 1; *11BHS2* – 11-B-hydroxysteroid dehydrogenase type 2; *CRH* - corticotropin-releasing hormone; *CRHR* - corticotropin-releasing hormone receptor; *ACTHR* - adrenocorticotropin hormone receptor; *GR* - glucocorticoid receptor; *MR* - mineralocorticoid receptor; *HSPB1* - heat shock proteins 27 kDa; *HSPD1* - heat shock proteins 60 kDa; *HSPA1A* - heat shock proteins 70 kDa; *HSP1* - heat shock proteins 90 kDa; *UBC* - ubiquitin.

<sup>2</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Phospholipase A2 (*YWHAZ*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), and ubiquitin C (*UBC*) gene expression were determined in goat placenta samples to identify the most stable reference gene. The *YWHAZ* gene was not expressed, and the *GAPDH* gene showed a high cycle threshold (CT) variability among samples. The *UBC* gene was identified as the most stably expressed and was selected as the reference gene. The expression of target genes was calculated by Livak's method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), i.e., comparing the expression levels of target genes with the reference one (*UBC*) and the cycle threshold of the control at each specific point (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

#### 2.1.4. Statistical methods

The data were analyzed using SAS 9.4 Statistical Analysis System software (SAS Institute, Cary, NC, USA) after verifying the normality via the Shapiro-Wilk PROC single variable residual. Initially, simple descriptive statistics were applied using the FREQ and MEANS procedures. Cortisol release pre-parturition (day -15), at parturition (day 0), and post-parturition (day +15) and kids' weights on days 0, 15, 30, 45, and 60 (weaning) were subjected to analysis of variance using the mixed procedure, which separated the treatment (CT or HS), day, parity, number of fetuses, sex of kids, and their interactions as causes of variation. In the model, the treatment, parity, number of fetuses, and day were considered fixed effects. The sex of kids and the animals were considered random effects. In our study, there was no male effect or interaction male-treatment. At parturition, morphologic and histologic analyses and gene expression in the placenta were evaluated using analysis of variance by the generalized model (GLM) procedure, which separated the treatment (CT or HS), parity, number of fetuses, sex of the kids, and their interactions as causes of variation. The treatment and the parity and number of fetuses were considered fixed effects, and the sex of the kids were considered random effects. In our study, there was no effect of parturition day or interactions between treatment--parturition day for gene expression. When there was a significant effect, the means were compared using Fisher's test with the threshold for significance defined as  $P \leq 0.05$ . The frequency procedure (FREQ) was used to analyze the percentage of natural or assisted parturition and the percentage of surviving kids at birth and weaning. The means were compared using a chi-squared test. Data are presented as the mean  $\pm$  the standard error of the mean.

### 2.3 RESULTS

#### 2.3.1. Goat responses, parturition, and placental characteristics

The HS goats were exposed to heat stress compared to CT goats; in fact, the HS challenge increased the air temperature (from 25.2 to 37.1°C), relative humidity (from 54 to 60%), and THI (from 72 to 91) during the pregnancy (Table 1). For these reasons, pre-partum HS goats showed significantly ( $P \leq 0.05$ ) greater rectal temperatures, respiratory frequencies, and cortisol concentrations than CT goats (Table 3). Indeed, goats subjected

to HS presented significantly greater cortisol concentrations in the amniotic fluid than goats subjected to the CT treatment. However, at parturition and postpartum, goats from both treatments showed similar rectal temperatures, respiratory frequencies, and plasma cortisol levels (Table 3).

Table 3 - Rectal temperature (RT), respiratory frequency (RF), and cortisol in plasma (P) and amniotic fluid (AF) of goats subjected to control (CT) or heat stress (HS) treatments.

Item	Days <sup>3</sup>	Treatments <sup>1, 2</sup>			
		CT (n = 21)	HS (n = 22)	SEM	P-value
RT (°C)	-15	38.6 <sup>b</sup>	39.3 <sup>a</sup>	0.07	0.01
	+15	39.0	39.1	0.08	0.40
RF (min)	-15	94.2 <sup>b</sup>	142.7 <sup>a</sup>	7.0	0.01
	+15	90.7	93	6.4	0.80
Cortisol in P <sup>4</sup> (ng/mL)	-15	21.6 <sup>b</sup>	26.3 <sup>a</sup>	0.9	0.01
	0	41.3	40.4	2.9	0.80
	+15	29.7	32.2	1.2	0.10
Cortisol in AF <sup>5</sup> (ng/mL)	0	32.6 <sup>b</sup>	39.4 <sup>a</sup>	2.3	0.04

<sup>1</sup>Treatments: CT - control treatment; HS - heat stress treatment.

<sup>2</sup>The goats that experienced dystocia (2 from CT and 1 from HS treatment) were excluded from statistical analysis.

<sup>3</sup>Relative to parturition.

<sup>4</sup>P: plasma.

<sup>5</sup>AF: amniotic fluid.

<sup>ab</sup>Means within a row with different superscripts differ ( $P \leq 0.05$ ).

### 2.3.2. Parturition and placental characteristics

There was no treatment effect on pregnancy duration, type of parturition (natural or assisted), parturition length (min), or placenta weight nor was there any interaction between the treatments and parity, body weight, or body condition scores on placenta characteristics. However, the goats subjected to the HS treatment spent significantly ( $P \leq 0.05$ ) more time delivering their placentas than goats that were subjected to the CT treatment (Table 4).

Table 4 - Pregnancy duration (days), type of parturition (natural or assisted), parturition length (min), and placenta expulsion length (min) of goats subjected to control (CT) or heat stress (HS) treatments.

Item	Treatment <sup>1</sup>			
	CT (n = 21)	HS (n = 22)	SEM	P-value
Pregnancy duration (days)	150	149	0.5	0.30
Natural delivery (%) <sup>2</sup>	91	96	-	0.50
Assisted delivery (%) <sup>2</sup>	9	4	-	0.50
Parturition length (min)	17.1	11.8	2.4	0.07
Placenta expulsion length (min)	19.3 <sup>b</sup>	50.5 <sup>a</sup>	9.0	0.01

<sup>1</sup>Treatments: CT - control treatment; HS - heat stress treatment.

<sup>2</sup>Except for natural delivery and assisted delivery, the goats that experienced dystocia (2 from CT and 1 from HS treatment) were excluded from statistical analysis.

<sup>ab</sup>Means within a row with different superscripts differ ( $P \leq 0.05$ ).

Furthermore, HS goats presented a significantly greater number of cotyledons than the CT goats (Table 5). Thus, goats subjected to HS exhibited significantly lighter medium, large, and extra-large cotyledons than CT goats did. Furthermore, the HS goats exhibited worse placental efficiency than the CT goats (Table 5).

Table 5 - Characteristics of the placenta, cotyledons, and placental efficiency of goats subjected to control (CT) or heat stress (HS) treatments.

Item	Treatment <sup>1, 2</sup>			
	CT (n = 21)	HS (n = 22)	SEM	P ≤
Placenta number (n)	26	28	-	-
Single	17	16	-	-
Double	3	6	-	-
Triplet	1	0	-	-
Placenta weight (g)	448.7	480.3	31.6	0.40
Single	447.3	550.6	41.8	0.09
Double	508.3	386.6	42.7	0.06
Triplet	336.7	-	-	-
Cotyledon number (n)	65.3 <sup>b</sup>	94.1 <sup>a</sup>	5.2	0.01
Small <sup>3</sup>	5.7	5.0	1.2	0.60
Medium <sup>4</sup>	59.3 <sup>b</sup>	76.6 <sup>a</sup>	5.5	0.03
Large <sup>5</sup>	14.2	9.7	1.8	0.09
Extra large <sup>6</sup>	1.2	1.0	0.1	0.10

Continua

Continuação

Table 5 - Characteristics of the placenta, cotyledons, and placental efficiency of goats subjected to control (CT) or heat stress (HS) treatments.

Item	Treatment <sup>1, 2</sup>			
	CT (n = 21)	HS (n = 22)	SEM	P ≤
Cotyledon weight (g)	6.2	5.0	0.5	0.09
Small <sup>3</sup>	0.05	0.06	0.01	0.57
Medium <sup>4</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.3 <sup>b</sup>	0.08	0.03
Large <sup>5</sup>	3.6 <sup>a</sup>	3.0 <sup>b</sup>	0.1	0.01
Extra large <sup>6</sup>	8.4	6.5	1.2	0.10
Cotyledon area (cm <sup>2</sup> )	26.8	23.8	1.1	0.07
Small <sup>3</sup>	0.4	0.4	0.02	0.70
Medium <sup>4</sup>	7.8 <sup>a</sup>	6.5 <sup>b</sup>	0.3	0.01
Large <sup>5</sup>	18.4 <sup>a</sup>	16.5 <sup>b</sup>	0.6	0.05
Extra large <sup>6</sup>	46.4	37.4	5.7	0.30
Placenta efficiency <sup>7</sup> (g)	13.1 <sup>a</sup>	9.9 <sup>b</sup>	1.3	0.03

<sup>1</sup>Treatments: CT - control treatment; HS - heat stress treatment.

<sup>2</sup>The goats that experienced dystocia (2 goats from CT and 1 goat from HS treatment) were excluded from statistical analysis.

<sup>3</sup>Small: ≤ 1 cm in length; <sup>4</sup>Medium: > 1 and ≤ 5 cm; <sup>5</sup>Large: > 5 cm and ≤ 10 cm; <sup>6</sup>Extra large: > 10 cm in length as proposed by Dwyer et al. (2005).

<sup>7</sup>Placental efficiency was calculated as proposed by Dwyer et al. (2005).

<sup>ab</sup>Means within a row with different superscripts differ ( $P \leq 0.05$ ).

### 2.3.3. Placental gene expression

The HS goats showed significantly ( $P \leq 0.05$ ) greater expression of the *ACTHR* and *GR* genes and lesser expression of the *11BHSD2* gene than the CT goats. There was a significant effect of HS for the *HSPA1A* gene, and HS goats presented significantly greater *HSPA1A* expression than CT goats. However, there was no treatment effect on the expression of the *MR*, *HSP1*, *HSPD1*, or *HSPB1* genes in the placenta (Table 6). For both experimental groups, there was no observable *11BHSD1*, *CRH*, and *CRHR* expression in the placental samples.

Table 6 - Relative expression of *11BHS2*, *ACTHR*, *GR*, *MR*, *HSPB1*, *HSPD1*, *HSPA1A*, and *HSP1* genes in the placenta of goats subjected to control (CT) or heat stress (HS) treatments.

Genes <sup>3</sup> ( <i>mRNA</i> )	Treatment <sup>1, 2</sup>			
	CT (n = 7)	HS (n = 7)	SEM	P-value
<i>11BHS2</i>	25.06 <sup>a</sup>	4.16 <sup>b</sup>	2.82	0.01
<i>ACTHR</i>	3.44 <sup>b</sup>	9.40 <sup>a</sup>	1.0	0.01
<i>GR</i>	20.70 <sup>b</sup>	42.67 <sup>a</sup>	4.71	0.01
<i>MR</i>	1.17	0.83	0.30	0.35
<i>HSPB1</i>	4.26	3.36	0.53	0.86
<i>HSPD1</i>	5.39	5.89	2.65	0.91
<i>HSPA1A</i>	3.05 <sup>b</sup>	5.44 <sup>a</sup>	0.48	0.05
<i>HSP1</i>	3.47	1.91	0.56	0.20

<sup>1</sup>Treatments: CT - control treatment; HS - heat stress treatment.

<sup>2</sup>The placenta samples were taken from goats with eutocic parturition, single placenta, two kids, similar age, parturition lengths and placenta expulsion lengths; 7 goats from CT and 7 goats from HS treatment were evenly distributed to previous milk production and parturition day to have representative placenta samples.

<sup>3</sup>Genes: *11BHS2* - 11B-hydroxysteroid dehydrogenase type 2; *ACTHR* - adrenocorticotropic hormone receptor; *GR* - glucocorticoid receptor; *MR* - mineralocorticoid receptor; *HSPB1* - heat shock proteins 27 kDa; *HSPD1* - heat shock proteins 60 kDa; *HSPA1A* - heat shock proteins 70 kDa; *HSP1* - heat shock proteins 90 kDa.

<sup>ab</sup>Means within a row with different superscripts differ ( $P \leq 0.05$ ).

#### 2.3.4. Kids' survival and growth performance

Although plasma cortisol concentrations in kids from the HS group were significantly lesser than those from the CT group, there was no treatment effect on kid's survival and birth weight. In contrast, kids from the HS goats had significantly greater mortality at weaning than kids from the CT group (Table 7).

Table 7 - Body weight (kg), survival rate (%), and plasma cortisol levels (ng/mL) of kids from goats subjected to control (CT) or heat stress (HS) treatments.

Item	Days <sup>2</sup>	Treatments <sup>1</sup>			
		CT (n = 37)	HS (n = 40)	SEM	P-value
Body weight (kg)	0	3.72	3.46	0.11	0.09
	15	4.04	3.84	0.07	0.08
	30	5.04	5.01	0.12	0.88
	45	6.47	6.63	0.16	0.50

Continua

Continuação

Table 7 - Body weight (kg), survival rate (%), and plasma cortisol levels (ng/mL) of kids from goats subjected to control (CT) or heat stress (HS) treatments.

Item	Days <sup>2</sup>	Treatments <sup>1</sup>			
		CT (n = 37)	HS (n = 40)	SEM	P-value
	60	7.78	7.9	0.19	0.68
Survival rate (%)	0	100	100	-	-
	60	100 <sup>a</sup>	90 <sup>b</sup>	-	0.04
Cortisol in P <sup>3</sup> (ng/mL)	0	94.81 <sup>a</sup>	70.25 <sup>b</sup>	5.43	0.01

<sup>1</sup>Treatments: CT - control treatment; HS - heat stress treatment.

<sup>2</sup>Relative to parturition.

<sup>3</sup>P: plasma.

## 2.4 DISCUSSION

In our study, HS goats presented significantly greater respiratory frequencies, rectal temperatures, and cortisol concentrations at 15 days pre-parturition than goats from the CT group showing that HS goats were under stress during the last 60 days of pregnancy. In fact, HS goats were subjected to environmental conditions with THI values above 80, which is considered the comfort limit for Saanen goats (PEREIRA et al. 2011; SILANIKOVE; KOLUMAN, 2015; SILVA, 2000). Consequently, HS goats were subjected to a maximum THI of 91 (with a mean THI of  $89 \pm 2.1$  from 1000 to 1600 h from the last 60 day of pregnancy until colostrum suckling). This value is considered a severe and dangerous stressor for goats (SILANIKOVE; KOLUMAN, 2015). In our study, the greater rectal temperatures and respiratory frequencies of HS goats were associated with physiological mechanisms for losing heat in response to HS. Other authors have reported an increase in respiratory frequency and rectal temperature under HS at similar THI values (AL-TAMIMI, 2007; PEREIRA et al. 2011).

At parturition, the plasma cortisol concentrations of the goats from both treatments were similar and greater than at 15 days pre-parturition and 15 days post-parturition. These results confirm that parturition was associated with a physiological increase of cortisol caused by fetus birth and related to the spontaneous delivery of newborns (LÓPEZ et al. 2012; MASTORAKOS; ILIAS, 2003; VAUGHAN et al. 2016). However, in our study, there was a significant increase in cortisol concentrations in the amniotic fluid of HS goats versus the amniotic fluid of CT goats. This greater cortisol concentration in the amniotic fluid of HS goats during pregnancy suggests that enzymatic conversion

of cortisol (active) to cortisone (inactive) was negatively changed by heat stress (BENEDIKTSSON et al. 1997; CLARKE et al. 2002; MARCA-GHAEMMAGHAMI et al. 2015). In fact, HS goats presented lesser 11BHS2 gene expression than CT goats, which suggests that excessive cortisol synthesis promoted by HS outpaces the synthesis of the 11BHS2 enzyme by the placenta thereby decreasing the effectiveness of the placenta's protection in HS goats. Consequently, the greater accumulation of cortisol in the amniotic fluid of HS goats can be a consequence of downregulation of the 11BHS2 gene in the placenta.

Furthermore, greater cortisol levels in the amniotic fluid might also be caused by increased cortisol synthesis in the placenta. Other authors have reported that the placenta can synthesize CRH, ACTH and cortisol (CLAPP et al. 1982; FLORIO et al., 2002; MASTORAKOS; ILIAS, 2003); and these are key players in the classic hypothalamic-hypophysis-adrenal (HHA) axis. In our study, HS goats also showed significantly greater expression of the ACTHR and GR genes in placental samples than CT goats. In contrast, HS kids presented significantly lesser plasma cortisol release versus CT kids; for this reason, cortisol synthesis by the fetal adrenal gland was not associated with greater cortisol concentrations in the amniotic fluid at parturition. In fact, HS goats showed upregulated expression of GR and ACTHR genes in the placenta suggesting that the greater expression of these receptors can promote cortisol synthesis. Moreover, placental cortisol synthesis is an important link to the local action because cortisol is the most potent regulator of GR expression in the target tissue (BAMBERGER et al. 1996; COTTRELL; SECKL, 2009). For these reasons, the upregulation of ACTHR and GR gene expression in the placenta of HS goats is associated with increased cortisol synthesis by the placenta and greater cortisol concentrations in the amniotic fluid during pregnancy. Considering the functional relationship between cortisol, ACTHR, and GR reported by other authors in different tissues (BAMBERGER et al. 1996; HE et al. 2016), our results confirm that HS changes cortisol signaling in the placenta suggesting that there was an increase in cortisol synthesis by the placenta and cortisol accumulation in the amniotic fluid.

It is possible to use different paths to study the effect of HS on gestation and lactation. Although, the gene expression in a delivered placenta is partially different from a pre-delivery placenta (GHEORGHE et al. 2010). In the present study, we decided to not perform a surgical procedure to take serial placenta samples during the gestation, because the anesthesia used in surgical procedures and medicines used in the pre- and post-surgery care (MORRISON et al. 2007) could affect several hormones and genes related to

placenta development, especially those related to cortisol action in placenta. Similarly, placenta samples obtained from preterm birth or caesarian did not represent a normal placental development and could negatively influence the expression of target genes. These facts explain our option to study the gene expression in a delivered placenta. As the placenta sampling was done immediately after parturition during the imposition of heat stress or control treatment to goats, we argue that our experimental design is adequate to study the chronic effect of heat stress during the last 60 days of pregnancy (including parturition day) on placenta at parturition and their impact on the subsequent first weeks of the kid's life.

Our results show that HS goats presented with a significantly greater HSPA1A gene expression in the placenta than CT goats suggesting that HS also induced a protective response in the placenta. This agrees with other authors who studied various tissues and reported that HSPA1A increases the synthesis of anti-apoptotic factors by local cells (Bahr et al. 2014; CHONG et al. 1998; DANGI et al. 2014; LEI et al. 2009). Furthermore, HSPA1A synthesis is a cell response to heat stress and is involved in the adaptation and acclimatization process (DANGI et al. 2014; OZAYDIN et al. 2016; SHOCHET et al. 2016). In fact, other authors have argued that HSPA1A reduces the synthesis of de novo GR and the affinity of cortisol for GR (GRAD; PICARD, 2007; KIRSCHKE et al. 2014). These changes can facilitate cell survival. In this context, the overexpression of the HSPA1A gene measured in this study suggests a protective response of placental cells to the negative impact of cortisol induced by HS.

In the present study, we found no HS effect on placental weight, kid's survival, or birth weight. However, other authors have demonstrated that HS during the fetal period increases the risk of death after birth and reduces birth weight (DWYER et al. 2005; GHAEMMAGHAMI et al. 2014; CHERAK et al. 2018). Our HS goats spent more time delivering the placenta, had lighter and smaller cotyledons, and worse placenta efficiency than the control goats indicating that the stressor imposed on HS goats had a negative effect on placental morphology and efficiency. In fact, several studies have also shown that HS negatively influences placental cells (WARD et al. 2002), cotyledon number, placental weight and area, and placental efficiency (DWYER et al. 2005; GALAN et al. 1999; KONYALI et al. 2007; OCAK et al. 2015).

Indeed, HS kids had lesser weights than CT kids at birth and on day 15 (5 to 7% lighter); however, CT and HS kids had similar weights on days 30 to 60. In contrast, other studies have reported that HS during pregnancy significantly decreased the weights of

calves at day 60 (DADO-SENN et al. 2020; MONTEIRO et al. 2014). Newborns from the HS and CT groups presented adequate body weight and survival rate. It was not possible to associate the HS imposed during goat pregnancy to negative kid responses at birth. Indeed, it was not possible to associate HS with adrenal failure at birth because kids from the HS and CT groups presented greater cortisol release than their mothers at parturition despite HS kids presenting significantly lesser cortisol release compared to CT kids. This suggests that their adrenal gland was responsive to birth challenges. Similarly, other authors have suggested that exposure of the fetus to excessive cortisol during gestation changes the response of the HHA axis without causing adrenal exhaustion (NG et al. 1997).

Furthermore, in the present study, homogenous environmental conditions, diet, and management techniques were similar for all experimental kids. For these reasons, we argue that late-gestation heat stress affected the subsequent kid's mortality rate at weaning from HS goats compared to kids from CT goats (10% versus 0% of mortality rate). Thus, our results show that late-gestation heat stress affected cortisol concentration in goat and kid as well as, cortisol concentration in amniotic liquid and target gene expression in placenta at parturition. These findings suggest that these changes might be associated and explain the subsequent kid's performance at least in part. Moreover, multiple studies have demonstrated that HS during the fetal period can increase the risk of death after birth and reduce kid weight at birth (CHERAK et al. 2018; DWYER et al. 2005; GHAEMMAGHAMI et al. 2014). Other authors have demonstrated that HS at gestation impacts the animals' lives long-term and reduces their productivity (COTTRELL; SECKL, 2009; LAPORTA et al. 2017; MONTEIRO et al. 2016; TAO et al. 2012). Finally, our results suggest that the negative effect of prenatal heat stress persists and can alter the ability of an animal to respond to other environmental stressful challenges, e.g., weaning. However, further studies are needed to understand how HS during pregnancy can change the placenta and impact the response of the animal to different challenges over the lifespan.

## REFERENCES

AL-TAMIMI, H. J. Thermoregulatory response of goat kids subjected to heat stress. **Small Ruminant Research**, v. 71, p. 280–285, 2007.

BAHR, B.; GALAN, H. L.; ARROYO, J. A. Decreased expression of phosphorylated

placental heat shock protein 27 in human and ovine intrauterine growth restriction (IUGR). **Placenta**, v. 35, p. 404–410, 2014.

BAMBERGER, C. M.; SCHULTE, H. M.; CHROUSOS, G. P. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. **Endocrine Reviews**, v. 17, p. 245–261, 1996.

BENEDIKTSSON, R. et al. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. **Clinical Endocrinology**, v.46, p. 161–166, 1997.

BRAUN, T. et al. Maternal betamethasone administration reduces binucleate cell number and placental lactogen in sheep. **Journal of Endocrinology**, v. 194, p. 337–347, 2007.

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta : a multifaceted, transient organ. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 370, p. 1–8, 2015.

CHERAK, S. J. et al. The effect of gestational period on the association between maternal prenatal salivary cortisol and birth weight: A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 94, p. 49–62, 2018.

CHONG, K. Y. et al. Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 30, p. 599–608, 1998.

CLAPP, J. F. et al. Ovine placental cortisol production. **Endocrinology**, v. 111, p. 1728–1730, 1982.

CLARKE, K. A. et al. Regulation of 11 -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in ovine placenta by fetal cortisol. **Journal of Endocrinology**, v. 172, p. 527–534, 2002.

COTTRELL, E. C.; SECKL, J. R. Prenatal stress, glucocorticoids, and the programming of adult disease. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, p. 1–9, 2009.

Dado-Senn, B. et al. Pre- and postnatal heat stress abatement affects dairy calf thermoregulation and performance. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 4822–4837, 2020.

DANGI, S. S. et al. Modulatory effect of betaine on expression dynamics of HSPs during heat stress acclimation in goat (*Capra hircus*). **Gene**, v. 575, p. 543–550, 2016.

DANGI, S. S. et al. Impact of short-term heat stress on physiological responses and expression profile of HSPs in Barbari goats. **International Journal of Biometeorology**, v. 58, p. 2085–2093, 2014.

DWYER, C. M. et al. Breed, litter and parity effects on placental weight and placentome number, and consequences for the neonatal behaviour of the lamb. **Theriogenology**, v. 63, p. 1092–1110, 2005.

FABRIS, T. F. et al. Effect of heat stress during early, late, and entire dry period on dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 5647-5656, 2019.

FLORIO, P. et al. Placental stress factors and maternal-fetal adaptive response: The corticotropin-releasing factor family. **Endocrine**, v. 19, p. 91–102, 2002.

GALAN, H. L. et al. Relationship of fetal growth to duration of heat stress in an ovine model of placental insufficiency. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.180, p. 1278–1282, 1999.

GHAEMMAGHAMI, P. et al. The association between the acute psychobiological stress response in second trimester pregnant women, amniotic fluid glucocorticoids, and neonatal birth outcome. **Developmental Psychobiology**, v. 56, p. 734–747, 2014.

GHEORGHE, C.P. et al. Gene expression in the placenta: maternal stress and epigenetic responses. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, p. 507-523, 2010.

GRAD, I.; PICARD, D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 275, p. 2–12, 2007.

HE, B. et al. Glucocorticoid receptor-mediated insulin-like growth factor-I transcriptional regulation in BeWo trophoblast cells before and after syncytialisation. **Steroids**, v. 115, p. 26–33, 2016.

KIRSCHKE, E. et al. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. **Cell**, v. 157, p. 1685–1697, 2014.

KONYALI, A. et al. Factors affecting placental traits and relationships of placental traits with neonatal behaviour in goat. **Animal Reproduction Science**, v. 97, p. 394–401, 2007.

LAPORTA, J. et al. In utero exposure to heat stress during late gestation has prolonged effects on the activity patterns and growth of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1–9, 2017.

LEI, L.; YU, J.; BAO, E. Expression of heat shock protein 90 (Hsp90) and transcription of its corresponding mRNA in broilers exposed to high temperature. **British Poultry Science**, v. 50, p. 504–511, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LÓPEZ, G. et al. Blood levels of cortisol and glucocorticoid receptors in liver and placenta of goats at different stages of gestation. **Veterinaria México**, v. 43, p. 213–223, 2012

MADER, T. L.; DAVIS, M. S.; BROWN-BRANDL, T. Environmental factors

influencing heat stress in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 712–719, 2006.

MARCA-GHAEMMAGHAMI, P. La. et al. The acute autonomic stress response and amniotic fluid glucocorticoids in second-trimester pregnant women. **Psychosomatic Medicine**, v. 77, p. 41–49, 2015.

MASTORAKOS, G.; ILIAS, I. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 997, p. 136–149, 2003.

MELLADO, M.; et al. Behaviour of crossbred does and their kids at parturition under extensive and intensive conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 389–394, 2012.

MOHANARAO, J. G. et al. HSP70 family genes and HSP27 expression in response to heat and cold stress in vitro in peripheral blood mononuclear cells of goat (*Capra hircus*). **Small Ruminant Research**, v. 116, p. 94–99, 2014.

MONTEIRO, A. P. A. et al. Effect of heat stress during late gestation on immune function and growth performance of calves: isolation of altered colostrum and calf factors. **Journal of Animal Science**, v. 97, p. 6426–6439, 2014.

MORRISON, J. L. et al. Restriction of placental function alters heart development in the sheep fetus. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, p. 306–313, 2007.

NRC. Nutrients Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. ed. **National Academies Press**, Washington, DC. 2007.

NEUER, A. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, p. 149–159, 2000.

NG, P. C. et al. Pituitary-adrenal response in preterm very low birth weight infants after treatment with antenatal corticosteroids. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, p. 3548–3552, 1997.

OCAK, S. et al. Goat placental efficiency determination by comparing litter weight to the surface area of the cotyledons. **Animal Reproduction Science**, v. 12, p. 920–926, 2015.

OZAYDIN, T. et al. Immunohistochemical Distribution of Heat Shock Protein 70 and Proliferating Cell Nuclear Antigen in Mouse Placenta at Different Gestational Stages. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, p. 251–257, 2016.

PEREIRA, G.M. et al. Avaliação do comportamento fisiológico de caprinos da raça Saanen no semiárido paraibano. **Revista Verde**, v. 6, p. 83–88, 2011.

RIZZO, G.; ARDUINI, D. Intrauterine growth restriction: Diagnosis and management. A review. **Minerva Obstetrics and Gynecology**, v. 61, p. 411–420, 2009.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK., K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 101-1108, 2008.

SILANIKOVE, N.; KOLUMAN, D. N. Impact of climate change on the dairy industry in temperate zones: Predications on the overall negative impact and on the positive role of dairy goats in adaptation to earth warming. **Small Ruminant. Research**, v. 123, p. 27–34, 2015.

SILVA, R. G. Introdução à Bioclimatologia Animal. ed. **Nobel**, São Paulo, BR. 2000.

SHOCHET, G. E. et al. Heat shock protein-27 (HSP27) regulates STAT3 and eIF4G levels in first trimester human placenta. **Journal of Molecular Histology**, v. 47, p. 555–563, 2016.

TAO, S. et al. Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 7128–36, 2012.

TOGHER, K. L. et al. Epigenetic regulation of the placental HSD11B2 barrier and its role as a critical regulator of fetal development. **Epigenetics**, v. 9, p. 816–822, 2014.

VAUGHAN, O. R. et al. A physiological increase in maternal cortisol alters uteroplacental metabolism in the pregnant ewe. **Journal of Physiology**, v. 21, p. 6407–6418, 2016.

WARD, J. W.; WOODING, F. B. P; FOWDEN, A. L. The effects of cortisol on the binucleate cell population in the ovine placenta during late gestation. **Placenta**, v. 23, p. 451–458, 2002.

### **3 Os impactos do estresse por calor no pré-parto sobre a função placentária, comportamento materno-filial e desenvolvimento dos cabritos até o desmame**

#### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os impactos do estresse por calor no pré-parto sobre a função placentária, avaliação da atividade endócrina, a relação ROS/enzimas antioxidantes tanto no cotilédone como na região intercotiledonária e os efeitos no comportamento materno-filial, respostas fisiológicas e desempenho dos cabritos até os 60 dias de vida. O período experimental correspondeu a 120 dias, sendo dividido em duas fases: na primeira fase, as cabras gestantes foram submetidas aos tratamentos: termoneutro (TN: mantidas em ambiente de termoneutralidade, n = 23) e estresse térmico (HS, mantidas na câmara climática, n = 23) por 60 dias pré-parto. A segunda fase compreendeu do nascimento até os 60 dias de vida dos cabritos. Foram colhidas amostras sangue das cabras e cabritos, líquido amniótico, amostras de cotilédone e região intercotiledonária das placentas liberadas. Foi também avaliado o comportamento materno-filial, os parâmetros fisiológicos e realizada a pesagem dos cabritos. As cabras HS apresentaram elevada concentração de cortisol plasmático materno nos 15 dias pré-parto e no líquido amniótico, maior taxa de apoptose celular, menor expressão gênica e proteica de PL e PRL e PRLR, assim como, menor a expressão gênica da enzima antioxidante SOD1 e glutathione no tecido placentário em comparação ao tratamento TN. A região intercotiledonária apresentou maior expressão gênica dos hormônios placentários e enzimas antioxidantes analisados que os cotilédones. As cabras HS apresentaram maior frequência de comportamento positivo em relação aos cabritos quando comparado as cabras TN e os cabritos HS apresentaram maior resposta ao estímulo materno que os cabritos TN. Os cabritos HS apresentam menor concentração de cortisol no nascimento e peso, na primeira semana de vida, e maior mobilização das respostas termorregulatórias aos 60 dias que os cabritos TN. Conclui-se, portanto, que o estresse térmico por calor no pré-parto impacta negativamente a função placentária, intensifica o comportamento materno-filial positivo e compromete a resposta do neonato com modificações na concentração do cortisol, diferente padrão na eficiência nas respostas termorregulatórias e menor peso até o desmame.

Palavras-chave: Apoptose. Hormônios placentários. Região intercotiledonária. Resposta termorregulatórias

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the impacts of prepartum heat stress on placental function, endocrine activity evaluation, the ROS/antioxidant enzyme ratio both in the cotyledon and in intercotyledonary region and the effects on maternal-offspring behavior, physiological responses and performance of goat kids up to 60 days of age. The experimental period corresponded to 120 days, being divided into two phases: in the first phase, the pregnant goats were submitted to the following treatments: thermoneutral (TN: kept in a thermoneutrality environment, n = 23) and heat stress (HS, kept in the climatic chamber, n = 23) for 60 days prepartum. The second phase were from the birthday to 60 days of age. Blood samples from the mothers and their offspring, amniotic fluid, samples of cotyledon and intercotyledonary region of released placentas were sampled. Maternal-offspring behavior and physiological parameters were also evaluated and the kids were weighed. The HS goats showed high concentration of maternal plasma cortisol in the 15 days prepartum and in the amniotic fluid, higher rate of cellular apoptosis, lower gene and protein expression of PL and PRL and PRLR, as well as lower gene expression of the antioxidant enzyme SOD1 and glutathione in placental tissue compared to TN treatment. The intercotyledonary region showed higher gene expression of placental hormones and antioxidant enzymes analyzed than the cotyledons. The HS goats presented a higher frequency of positive behavior in relation to the goats when compared to the TN goats and the HS goats showed a greater response to the maternal stimulus than the TN goats. HS kids had lower cortisol concentration at birth and weight, in the first week of life, and greater mobilization of thermoregulatory responses at 60 days than TN kids. In conclusion, prepartum heat stress negatively impacts placental function, intensifies positive maternal-offspring behavior and compromises the neonate's response with changes in cortisol concentration, a different pattern in the efficiency of thermoregulatory responses and lower weight until weaning.

Keywords: Apoptosis. Intercotyledonary region. Placental hormones. Thermoregulatory response.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão primordial para o estabelecimento da comunicação materno-fetal e garantia da saúde gestacional (FTHENAKIS et al. 2012), pois além de funcionar como barreira protetora contra elevadas concentrações do cortisol materno (SILVA et al. 2021), atua também como órgão endócrino sintetizando hormônios como PRL e LP e modulando também sua receptividade controlando a presença de diferentes receptores hormonais que, dentre suas diversas funções (CARTER, 2018; IGWEBUIKE, 2006), estão envolvidos nos processos de adaptação aos estressores fisiológicos durante a gestação (BINART; BACHELOT; BOUILLY, 2010), sendo essenciais para a manutenção da homeostasia no ambiente intrauterino.

O estresse térmico por calor, por sua vez, desencadeia a ativação de mecanismos de defesa placentário afim de reduzir o impacto nocivo que este fator pode causar nas células placentárias (SILVA et al. 2021). No entanto, quando o estresse por calor ocorre no final da gestação, esse desafio ambiental ocorre quando a placenta encontra-se na fase final de desenvolvimento, e em estresse oxidativo devido ao desbalanço entre a relação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e enzimas antioxidantes, causando implicações na manutenção da homeostasia (MYATT; CUI, 2004; WU; TIAN; LIN, 2015).

Uma vez que a placenta torna-se ineficiente, ocorre o comprometimento gestacional que pode ter impactos negativos não apenas durante a vida intrauterina, mas também na vida extrauterina do indivíduo (ROUSSEL et al. 2004), pois, o desenvolvimento e funcionamento dos órgãos fetais podem ser influenciados pela relação da tríade materno-placenta-fetal (FAURIE; MITCHELL; LABURN, 2001; LABURN et al. 2002). Dessa maneira, o conjunto de modificações que ocorrem no organismo materno podem interferir na atividade placentária e conseqüentemente no crescimento fetal e neonatal.

Assim sendo, o estresse térmico por calor durante o parto pode ter impactos negativos sobre o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central e endócrino, que podem ser expressos quando os neonatos são submetidos aos desafios ambientais na vida extrauterina (ASAKURA, 2004; REES; HARDING, 2004; TZSCHENTKE; NICHELMANN, 1997).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os impactos do estresse por calor no pré-parto sobre a função placentária, avaliando a atividade endócrina e a relação ROS/enzimas antioxidantes tanto no cotilédone como na região intercotiledonária e os

efeitos no comportamento materno-filial e sobre as respostas fisiológicas e desempenho dos cabritos até o desmame.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o estudo conduzido foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (CEUA, protocolo 5473220719) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) em concordância com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea).

Este estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), localizado em Pirassununga (21°58' S e 47°26" W), Brasil. O clima desta região é caracterizado como subtropical, com temperatura média anual de 23 °C, umidade relativa do ar média anual de 73%, a estação chuvosa ocorre entre os meses de Novembro a Março e o índice pluviométrico varia de 1300 a 2000 mm ao ano. Os dados foram coletados entre Junho e Setembro.

Neste estudo foram utilizadas 46 cabras Saanen (*Capra hircus*) gestantes, com 55 ± 12 Kg de peso vivo, entre 2 e 4 anos de idade, sendo 14 cabras primíparas e 32 multíparas, pertencentes ao rebanho experimental do Laboratório de Fisiologia Animal. A estação de monta ocorreu de forma controlada utilizando três bodes da mesma raça. Após 40 dias do término da estação de monta, foi realizado o primeiro diagnóstico de gestação em todos os animais para confirmar a idade gestacional e número de conceptos.

As cabras experimentais foram mantidas em baias sombreadas, com acesso a água e sal mineral *ad libitum*. A dieta total foi fornecida duas vezes ao dia (às 8:00h e 16:00h) na proporção 50:50% volumoso (silagem de milho e feno de coast-cross) e concentrado (milho e farelo de soja). A quantidade e proporção de alimentos da dieta total foram calculadas em função do peso e fases gestacional de acordo com as recomendações do NRC (National Research Council, 2007), e ajustes quinzenais para garantir 10% de sobras.

No terço final da gestação (60 dias pré-parto), as cabras foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos homogêneos (grupo controle e grupo estresse térmico) levando em consideração o escore de condição corporal (RUSSEL; DONEY; GUNN, 1969), a data prevista de parto, número de lactações, a produção de leite na lactação anterior e o número de fetos.

### 3.2.1 Organização Experimental:

O período experimental correspondeu a 120 dias, sendo dividido em duas fases: Na primeira fase, a gestação das cabras experimentais foi monitorada diariamente, compreendendo desde o terço final de gestação (60 dias pré parto) até a primeira mamada do colostro dos cabritos. Neste período as cabras foram submetidas aos tratamentos: controle (CT: mantidas em ambiente de termoneutralidade,  $n = 23$ ) e estresse térmico (ET, mantidas na câmara climática,  $n = 23$ ). A segunda fase compreendeu do nascimento até o desmame dos cabritos com 60 dias de vida. Nesse período não houve tratamento térmico e os cabritos foram mantidos em ambiente de termoneutralidade.

No tratamento controle (CT), as cabras permaneceram em baias (espaço de  $2\text{m}^2$  por cabra) cobertas e sombreadas, com temperatura ambiental variando entre 12 e  $25^\circ\text{C}$ , umidade relativa entre 45 e 73% e índice de temperatura-umidade (THI) entre 57 e 72, proporcionando um ambiente de conforto térmico de acordo com a classificação de THI proposta por Silanikove; Koluman, (2015) para caprinos.

No tratamento ET, as cabras foram mantidas na câmara climática (espaço de  $2\text{m}^2$  por cabra). Nos primeiros 15 dias (entre o  $60^\circ$  e  $45^\circ$  dia pré-parto) a temperatura interna da câmara climática foi elevada  $1^\circ\text{C}$  diariamente para que houvesse adaptação dos animais ao ambiente e à temperatura, e do  $45^\circ$  dia pré-parto até o momento do parto, a temperatura da câmara climática foi mantida a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar entre 60 e 70% e THI de  $80 \pm 1$  por 6 horas diárias (10:00h às 16:00h). Durante o período experimental, o fotoperíodo natural não foi alterado e os dados ambientais foram monitorados e registrados por *dataloggers* (Onset HOBO®, MA, USA) nos ambientes CT e ET.

Após a primeira mamada do colostro, os 77 cabritos (37 cabritos do tratamento CT e 40 cabritos do tratamento ET) foram distribuídos aleatoriamente em baias coletivas e sombreadas ( $2,5 \text{ m}^2/\text{cabrito}$ ) com temperatura variando entre 17 e  $22^\circ\text{C}$  e umidade relativa entre 39 e 43%, proporcionando um ambiente de termoneutralidade (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição da média das condições ambientais dos cabritos aos 15, 30, 45 e 60 dias de vida às 15 horas.

Dias	Umidade relativa (%)	Temperatura (°C)	ITU
15 dias de vida	49	24,63	63,48
30 dias de vida	47	26,27	64,93
45 dias de vida	46	27,03	65,62
60 dias de vida	41	30,05	68,48

Índice de Temperatura-Umidade (ITU) foi calculado como proposto por Mader et al., (2006)

Os cabritos receberam o mesmo manejo nutricional (Tabela 2) e sanitário por todo período experimental.

Tabela 2 - Composição dos ingredientes da dieta das cabras e cabritos

Ingredientes	% de MS da dieta de cada categoria	
	Cabras	Cabritos
Feno de <i>coast-cross</i>	21	99,46
Silagem de milho	39	44,51
Farelo de milho	27,2	88,52
Farelo de soja	8	89,39
Óleo de soja	0,4	-
Mistura de minerais e vitaminas <sup>1</sup>	4,4	-

<sup>1</sup>A mistura de minerais e vitaminas contém: Ca (máximo), 146 g; Ca mínimo), 48 g; Cu (mínimo), 500 mg; Cr (mínimo), 10 mg; S (mínimo), 15 g; Fe, 2,000 mg; F (máximo), 850 mg; P (mínimo), 85 mg; I (mínimo), 75 mg; Mg (mínimo), 15 mg; Mn (mínimo), 1,400 mg; Se (mínimo), 140 g; Zn (mínimo), 4,400 mg.

Durante o período experimental foram realizadas coletas de dados maternos através do acompanhamento diário das cabras durante o terço final da gestação, colheitas sanguíneas aos 15 dias pré-parto, no parto e 15 dias pós-parto, colheita do líquido amniótico e da placenta após a sua liberação e avaliação do comportamento materno-filial. Nos cabritos foram feitas colheitas de sangue via punção da veia jugular aos 15 dias, 30, 45 e 60 de vida, avaliação dos parâmetros fisiológicos e pesagem do nascimento ao desmame. O plasma sanguíneo de mãe e filhotes foi aliquoteado e conservado a -20 °C, para posterior dosagens hormonais.

### 3.2.2 Colheitas e Análises das fêmeas experimentais e filhotes

#### 3.2.2.1 ACTH e Cortisol plasmático e no líquido amniótico

O ACTH e cortisol foram pela técnica de imunoenensaio utilizando o kit (Monobind, Lake Forest, CA, USA) conforme as instruções do fabricante. Os coeficientes de variação do intra- e inter-ensaio foram de 2.5% e 6.1%, respectivamente.

#### 3.2.2.2 Comportamento materno-filial

O comportamento materno-filial (Tabela 3), foi observado a cada 5 minutos, do nascimento até os 60 minutos de vida ou até a primeira mamada espontânea, adaptado de Dwyer; Gilbert e Lawrence, (2004). Em seguida, foi realizada a separação entre mãe e cabrito.

Tabela 3 - Etograma do comportamento materno-filial durante os primeiros 60 minutos de vida

<b>Comportamento</b>	<b>Descrição</b>
<b>MATERNO</b>	
Limpeza do filhote	Ato de lambar e ingerir líquido amniótico e anexos fetais aderidos ao corpo do filhote e secá-lo
Estimulando o filhote a levantar	Empurrá-lo levemente utilizando a cabeça ou membros anteriores
Afastando-se do filhote	Manter distância, evitando contato
Agredindo o filhote	Empurrar bruscamente o filhote utilizando a cabeça ou membros anteriores
Outro comportamento	Ingerir água, alimento, anexos fetais; interagir com outras cabras
<b>FILIAL</b>	
Deitado	Manter-se em decúbito esternal ou lateral
Tentando levanta	Esforço com os membros anteriores e/ou posteriores para levantar
Em pé	Manter-se em estação
Continua	

Continuação

Tabela 3 - Etograma do comportamento materno-filial durante os primeiros 60 minutos de vida

<b>Comportamento</b>	<b>Descrição</b>
Procurando o úbere	Ação de procura pelo úbere
Tentando mamar	Apresentação do reflexo de sucção
Mamada sem auxílio	Realizar a mamada sem auxílio humano
Mamada com auxílio	Localização do teto, mas úbere ou tetos dificultem a mamada sem auxílio (ex: ligamentos relaxados, úbere pendular e abaixo do jarrete, teto pendular)
Outro comportamento	Vocalização, dormir

Fonte: Adaptado de DWYER; GILBERT; LAWRENCE, (2004)

### 3.2.2.3 Pesagem e Parâmetros Fisiológicos dos cabritos

Todos os cabritos foram pesados ao nascimento e semanalmente até desmame. Quinzenalmente, às 7:00h e 15:00h, foram realizadas avaliações dos parâmetros termorregulatórios que consistiam na frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR) e temperatura superficial de 4 pontos do corpo, com termômetro infravermelho Infrared®: duas regiões previamente tricotomizada (uma região no membro posterior direito (TMT) e uma região no dorso (TDT)) e nas áreas adjacentes à tricotomia (TM e TD, respectivamente),.

### 3.2.3 Colheitas e Análises dos anexos placentários

Com a liberação espontânea dos anexos placentários, amostras de cotilédone e região intercotiledonária foram imediatamente colhidos. Uma parte dessas amostras foi armazenada a -20 °C para análises de Tunel e imuno-histoquímica e outra parte do tecido foi armazenado a -80 °C para análises de expressão gênica.

#### 3.2.3.1. Tunel

As amostras foram fixadas em formaldeído tamponado a 4% e incluídas em parafina. Cortes de parafina de 4-6 µm foram aderidos a lâminas pré-tratadas com Solução

aquosa a 0,01% de poli-L-lisina (ferramenta 300.000 em peso; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). A desparafinização foi feita com duas passagens no xilol por 5 min em cada, duas passagens no álcool 96% por 3 min cada, uma passagem no álcool 90% e 80% por 3 minutos cada, seguido por lavagem em água bidestilada e secagem cuidadosa. Em seguida, as amostras foram incubadas com proteinase K (10mm TRIS/HCl), 20µg/mL por 20 minutos a 37 °C em câmara úmida. Em sequência, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS, secas, adicionado 50µL do reagente de Tunel e incubadas por 1h a 37°C no escuro em câmara úmida, seguido por lavagem 3 vezes com PBS. Em seguida, à coloração de Tunel, as lâminas foram submetidas a coloração de Hoechst, adicionando 50 µL do reagente de Hoechst por 10 min e lavado 3 vezes com PBS.

Foram realizadas imagens de 06 campos/amostra utilizando microscópio de luz AXIO ZEISS. De cada campo foram feitas duas imagens, sendo uma imagem de Tunel (filtro 3: FITC) e uma imagem Hoechst (filtro 2: DAPI), objetiva de 20x e tempo de exposição de 500. Na leitura foram consideradas células apoptóticas, aquelas que apresentavam núcleo fluorescente na coloração do Tunel e na coloração de Hoechst foram contadas todas as células do campo (Apêndice A). Posteriormente, foi realizada a média da contagem de todos os campos/amostra, conforme preconizado por Portera-Cailliau et al., (1994). A taxa de apoptose foi calculada como o número de células positivas no Tunel dividida pelo total de células presentes no campo X 100, como proposto por Bahr; Galan; Arroyo, (2014) e Detmar et al., (2019).

### 3.2.3.2. Imuno-histoquímica.

As amostras da região cotiledonária e intercotiledonária de todas as cabras experimentais foram analisadas. Os cortes foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA), que foram desparafinadas em xilol, reidratadas em gradiente de etanol e água destilada e deixadas em tampão tris-fosfato pH 7.4 (TBS).

A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada por alta temperatura em Tris-EDTA pH 9 com exceção do marcador PLR-r. Para esse marcador foi utilizada a recuperação em alta temperatura com citrato pH 6. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 10v (3%). Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e deixadas em tampão tris-fosfato pH 7.4 (TBS). Os anticorpos anti-lactogênio placentário (Rabbit policlonal, ab15554, ABCAM/Analítica,

Ribeirão Preto, SP, Brasil), anti-receptor de glicocorticoide (Rabbit policlonal, ab227524, ABCAM...), anti-prolactina (Rabbit policlonal, ab188229, ABCAM/Analítica, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e anti-receptor de prolactina (Rabbit policlonal, ab170935, ABCAM/Analítica, Ribeirão Preto, SP, Brasil), foram diluídos nas concentrações de 1:20, 1:250, 1:100 e 1:100, respectivamente. As lâminas foram incubadas overnight à 4°C em câmara úmida e posteriormente foi feita a incubação com o anticorpo secundário HRP (caprino anti-IgG de coelho, ab6721, ABCAM/Analítica, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 30 minutos em estufa 37 °C. Foi utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Em seguida ocorreu a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) e foram montadas com lamínula em Permount, Fischer.cód. SP15-500.

Foi realizada a imagem de 01 campo/amostra utilizando microscópio de luz AXIO ZEISS, filtro 1 – BF, objetiva de 40x e tempo de exposição de 26. Para a leitura foram contados todos núcleos positivos e negativos (Apêndice B) e realizada o cálculo de porcentagem de núcleos positivos de acordo com a eq. (1) descrita por Verheecke et al. (2018):

$$\text{Porcentagem de núcleo}^+ = \frac{n^{\circ} \text{ de núcleo}^+}{n^{\circ} \text{ de núcleo}^+ + n^{\circ} \text{ de núcleo}^-} \times 100 \quad (1)$$

A média da porcentagem total foi calculada por amostra.

### 3.2.3.3. Expressão gênica

Para análise de expressão gênica, foram obtidas 46 amostras de anexos placentários (23 amostras de cabras CT e 23 amostras de cabras ET), dos quais 150 mg de cotilédone e de região intercotiledonária, submetido a técnica de reação de cadeia em polimerase em tempo real (PCR-RT) como descrito por Silva et al. (2021), em equipamento de PCR-RT Invitrogen (Burlington, ON, Canada)

Para expressão dos genes alvo foram utilizados primers de Lactogênio placentário ovino (oPL), Prolactina (PRL), Receptor de prolactina (PRL-r), Receptor de glicocorticoide (GR), Receptor mineralocorticoide (MR), Superóxido dismutase isoforma 1 (SOD1), Enzima Glutaciona peroxidase 1 (GPx-1) e Enzima Glutaciona peroxidase 3 (GPx-3), Óxido nítrico sintetase (eNOS), Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidase isoforma 1 (NOX1) e foram utilizados os genes constitutivos Gliceraldeído 3-fosfato

desidrogenase (GAPDH) e Ubiquitina (UBC). A UBC foi identificada como o gene expresso mais estável e selecionado como gene referência. A expressão dos genes alvo foram calculados pelo método de Livak (Livak and Schmittgen, 2001). Os oligonucleotídeos iniciadores estão descritos na tabela 4. A eficiência do PCR-RT foi confirmada em todos os pares de primers utilizados e os produtos específicos foram verificados através da análise da curva de dissociação e da eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Tabela 4 - Sequência de primers dos genes analisados utilizando o RT-PCR.

Genes	Sequência de primers	Código no GenBank
oPL	3'AGCAACAACGGTGGCTAACT5'	M31660
	5'GCCATACTGTTCATCAAATCTGT3'	
PRL	3'GTTGCTGCGCTCCTGGAATG5'	JF938531
	5'TTTGCAGGGACGGGAGTCCT3'	
PRL-R	3'GCCCCAACTCCTGCTACTTT5'	NM_001285669
	5'GAGGCTCTGGTTCAACTATGT3'	
GR	3'CCATTTCTGTTACGGTGTG5'	XM_005683087
	5'CTGAACCGACAGGAATTGGT3'	
MR	3'GGGTCTATCTGTAGCCCTGGAA5'	XM_005691196
	5'TGTCTGGACTGGGAACCACAT3'	
SOD1	3'TGTTGCCATCGTGGATATTGTAG5'	NM_001285550
	5'CCCAAGTCATCTGGTTTTTCATG3'	
GPx1	3'GCAAGGTGCTGCTCATTGAG5'	XM_005695962
	5'CGCTGCAGGTCATTCATCTG3'	
GPx3	3'CTAGCCACCCTCAAGTATGTTG5'	XM_005683183
	5'TCACATCGCCTTTCTCAAACAGT3'	
eNOS	3'GGAAATCGGGGTCTGGAGT5'	XM_018046724
	5'TTGCGAGCTGAAAGCTGTG3'	
NOX1	3'GGAGCAGGAATTGGGGTTA5'	XM_018044365
	5'GGGTGAGCGGTAGCTATTGTA3'	
GAPDH	3'GGTGATGCTGGTGCTGAG5'	AJ431207
	5'TGACAATCTTGAGGGTGTG3'	
UBC	3'ATGCAGATCTTTGTGAAGAC5'	NM_001206307
	5'CTTCTGGATGTTGTAGTC3'	

Lactogênio placentário ovino(oLP); Prolactina (PRL); Receptor de prolactina (PRL-R); Receptor de glicocorticoide (GR); Receptor mineralocorticóide (MR); Superóxido dismutase isoforma 1 (SOD1);

Enzima glutatona peroxidase 1 (GPx1); Enzima glutatona peroxidase 3 (GPx3); Óxido nítrico sintetase (eNOS); Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidase isoforma 1 (NOX1); Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH); Ubiquitina (UBC).

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

### 3.2.4 Análise Estatística

O experimento adotou um delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram analisados através do software Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC, USA) e verificada a normalidade dos resíduos de acordo com o Shapiro-Wilk. As análises de Tunel, Imuno-histoquímica e a expressão gênica foram avaliadas utilizando a análise de variância pelo modelo linear generalizado (GLM), o qual separou os tratamentos (TN e ET), o número de partos e de fetos, sexo dos cabritos e suas interações como causas de variação. Os tratamentos, partições e número de fetos foram considerados como efeito fixo e o sexo dos cabritos foi considerado como efeito aleatório.

Não houve efeito do dia do parto e nem interação entre tratamento-parto para a expressão gênica. Para os efeitos significativos, as médias foram comparadas usando o teste de Fisher com significância de  $p \leq 0,05$ .

A concentração de cortisol e peso dos cabritos foram submetidos a análise de variância usando o procedimento do software SAS, o qual separou os tratamentos (Termoneutro e Estresse térmico) dia, e animais como causas de variação. No modelo, o efeito do tratamento foi considerado ser fixo e o efeito de dia foi considerado como covariável e animais como efeito aleatório. Quando houve efeito significativo, as médias foram comparadas usando o teste de Fisher com significância definida com o  $p \leq 0,05$ . Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro-padrão médio.

O cortisol plasmático materno aos 15 dias pré-parto, parto e pós-parto, líquido amniótico e cortisol plasmático dos cabritos, peso e respostas termorregulatórias no nascimento, aos 30 dias e 60 dias de vida foram submetidas a análise de correlação utilizando o PROC CORR. Os dados de cortisol plasmático materno *versus* cortisol plasmático dos neonatos, THI *versus* cortisol plasmático dos cabritos, frequência respiratória *versus* temperatura retal, temperatura dorsal superficial *versus* cortisol do líquido amniótico e peso dos cabritos *versus* cortisol do líquido amniótico foram submetidos a análise de regressão utilizando o PROC REG e ajustado ao modelo.

Os dados do comportamento materno-filial foram analisados utilizando o software SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) e submetidos ao teste não paramétrico por não

apresentarem distribuição normal. O PROC FREQ foi utilizado para analisar cada comportamento materno e filial durante os primeiros 60 minutos de vida. Para os efeitos significativos, as médias foram comparadas utilizando o teste de Fisher com significância de  $p \leq 0,05$ .

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1. Concentração do ACTH e cortisol materno no plasma e líquido amniótico e cortisol plasmático dos cabritos

Não houve diferença significativa entre os tratamentos TN e ET para a concentração de ACTH no líquido amniótico e no plasma do dia do parto (Tabela 5). Mas foi observado efeito significativo do estresse térmico sobre a concentração plasmática do cortisol no ET em comparação ao TN nos 15 dias pré-parto, porém sem influenciar a concentração plasmática do cortisol no parto e aos 15 dias após o parto (Tabela 5).

Em relação aos cabritos, os animais do tratamento TN apresentaram maior concentração plasmática de cortisol que os animais do tratamento ET no nascimento, aos 15 dias e 45 dias de vida, e aos 60 dias de vida essa resposta foi inversa (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração de ACTH plasmático materno no parto e no líquido amniótico, concentração do cortisol plasmático 15 dias pré-parto, no parto, 15 dias pós-parto e no líquido amniótico das cabras submetidas a condições termoneutras (TN) e de estresse térmico (ET) e dos cabritos do nascimento até 60 dias de vida. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão médio.

Item	TN	ET	EPM	Valor de P
<b>CABRAS – ACTH (pg/mL)</b>				
Parto	140,72	129,04	10,82	0,45
Líquido amniótico	2106,87	1975,84	327,68	0,77
<b>CABRAS – Cortisol (ng/mL)</b>				
15 dias pré-parto	21,87 <sup>b</sup>	25,01 <sup>a</sup>	0,72	0,002
Parto	40,03	41,23	2,94	2,56
Líquido amniótico	31,87 <sup>b</sup>	39,42 <sup>a</sup>	1,67	0,04
15 dias pós-parto	24,2	25,17	0,67	0,31

Continua

Continuação

Tabela 5 - Concentração de ACTH plasmático materno no parto e no líquido amniótico, concentração do cortisol plasmático 15 dias pré-parto, no parto, 15 dias pós-parto e no líquido amniótico das cabras submetidas a condições termoneutras (TN) e de estresse térmico (ET) e dos cabritos do nascimento até 60 dias de vida. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão médio.

Item	TN	ET	EPM	Valor de P
Cabritos – Cortisol (ng/mL)				
Nascimento	94,83 <sup>a</sup>	70,2 <sup>b</sup>	5,45	0,002
15 dias de vida	32,81 <sup>a</sup>	26,37 <sup>b</sup>	2,15	0,03
30 dias de vida	22,00	23,76	1,18	0,29
45 dias de vida	18,90 <sup>a</sup>	16,02 <sup>b</sup>	0,89	0,02
60 dias de vida	6,51 <sup>b</sup>	10,39 <sup>a</sup>	0,75	0,0005

Termoneutro (TN); Estresse térmico (ET); Erro-padrão médio (EPM).

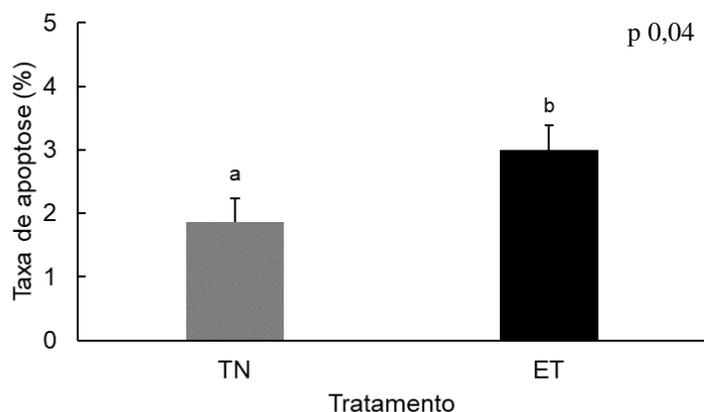
Médias marcadas com letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).

Fonte: Própria autoria

### 3.3.2. Avaliação da taxa de apoptose no tecido placentário

A taxa de apoptose foi significativamente maior nas células do tecido placentário do tratamento ET ( $2,99 \pm 0,39$ ) do que no tratamento TN ( $1,86 \pm 0,38$ ). Também foi possível observar que em ambos os tratamentos a região intercotiledonária apresentou uma taxa de apoptose ( $4,06 \pm 0,69$  e  $2,5 \pm 0,39$ , respectivamente) significativamente maior que o cotilédone ( $1,91 \pm 0,69$  e  $1,22 \pm 0,39$ , respectivamente) ( $p 0,01$ ;  $p 0,03$ , respectivamente) (Figura 1).

Figura 1 - Análise da taxa de apoptose no tecido placentário das cabras dos tratamentos Termoneutro (TN) e Estresse térmico (ET).



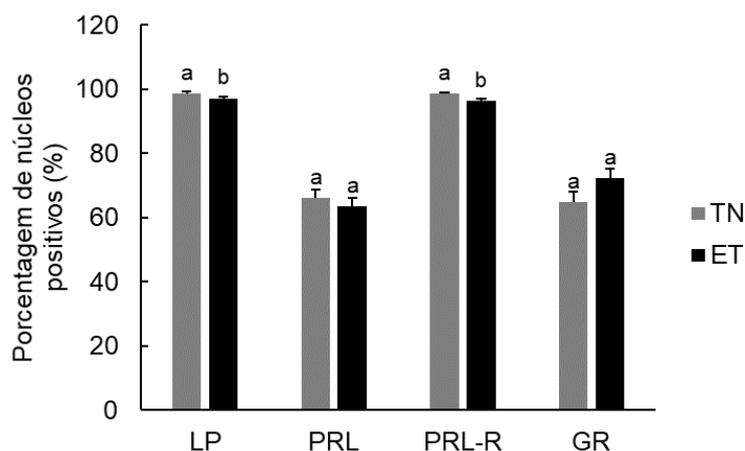
Termoneutro (TN); Estresse térmico (ET); Médias marcadas com letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).

Fonte: Própria autoria

### 3.3.3. Porcentagem de células positivas ao LP, PRL, PRL-R e GR na imunohistoquímica

Foi observada diferença estatística com menor percentagem do LP ( $95 \pm 0,48\%$ ) e PRL-r ( $96 \pm 0,58\%$ ) no tecido placentário das cabras do tratamento ET do que do tratamento TN ( $98 \pm 0,54\%$ ;  $98 \pm 0,64\%$ , respectivamente), ( $p \leq 0,05$ ). No entanto não houve diferença estatística em relação a percentagem da PRL ( $p 0,48$ ) e GR ( $p 0,1$ ) entre os tratamentos e nem entre cotilédone e região intercotiledonária (Figura 2).

Figura 2 - Porcentagem de células do tecido placentário das cabras TN e ET marcadas em áreas positivas para LP, PRL, PRL-R e GR.



Termoneutro (TN); Estresse térmico (ET); Lactogênio placentário (LP); Prolactina (PRL); Receptor de Prolactina (PRL-R); Receptor de Glicocorticoide (GR).

Médias marcadas com letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).

Fonte: Própria autoria

### 3.3.4. Expressão dos genes relacionados a função placentária e estresse oxidativo no tecido placentário

Foi observado que o estresse térmico por calor reduziu significativamente a expressão do oLP ( $3,68 \pm 0,85$ ;  $p < 0,0001$ ), PRL ( $2,73 \pm 0,4$ ;  $p 0,0001$ ) e do antioxidante SOD1 ( $4,49 \pm 0,48$ ;  $p 0,04$ ) nos animais do tratamento ET em comparação ao TN ( $33,19 \pm 0,85$ ;  $19,93 \pm 0,4$ ;  $5,89 \pm 0,48$ , respectivamente). Quando foram analisadas as áreas do tecido placentário observou-se uma expressão significativamente maior de praticamente todos os genes analisados (oPL, PRL, PRL-r, SOD1 e GPx-1) e menor expressão do eNOS

na região intercotiledonária em comparação ao cotilédone, no entanto não houve diferença do GR e GPx-3 entre as amostras (Tabela 6).

Tabela 6 - Expressão gênica das áreas que compõem o tecido placentário

Genes	Tecido		EPM	Valor de P
	COT	RI		
GR	8,17	6,34	1,11	0,28
PRLR	5,74 <sup>b</sup>	35,09 <sup>a</sup>	5,39	0,0006
PRL	1,59 <sup>b</sup>	20,07 <sup>a</sup>	0,38	<,0001
oLP	3,78 <sup>b</sup>	33,09 <sup>a</sup>	0,76	<,0001
SOD1	4,21 <sup>b</sup>	6,17 <sup>a</sup>	0,48	0,0006
GPX1	3,3 <sup>b</sup>	5,5 <sup>a</sup>	0,38	0,0002
GPX3	1,99	2,34	0,19	0,24
eNOS	2,72 <sup>a</sup>	0,7 <sup>b</sup>	0,55	0,02

Cotilédone (COT); Região intercotiledonária (RI); Lactogênio placentário ovino(oLP); Prolactina (PRL); Receptor de prolactina (PRL-R); Receptor de glicocorticoide (GR); Receptor mineralocorticóide (MR); Superóxido dismutase isoforma 1 (SOD1); Enzima glutatona peroxidase 1 (GPx1); Enzima glutatona peroxidase 3 (GPx3); Óxido nítrico sintetase (eNOS); Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidase isoforma 1 (NOX1). Erro padrão médio (EPM);

Médias marcadas com letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).

Fonte: Própria autoria

### 3.3.5. Comportamento materno-filial.

Em relação ao comportamento materno, a limpeza dos cabritos foi a atividade realizada com maior frequência, e o afastamento e agressão à cria os menos observados em ambos tratamentos, sem diferenças significativas ( $p$  0,63;  $p$  0,29 e  $p$  0,11, respectivamente) entre os tratamentos (Tabela 7). No entanto, as cabras do tratamento ET estimularam os cabritos a levantar com frequência significativamente maior que as cabras do tratamento TN. Em contrapartida, apresentaram menor frequência na execução de atividades que não estavam relacionadas aos cabritos, como beber água, ingerir alimento e anexos fetais e interagir com outras cabras quando comparada as cabras do tratamento TN (Tabela 7).

Em relação ao comportamento dos cabritos, observou-se que não houve diferença significativa entre os cabritos TN e ET quanto à postura em pé e deitado. No entanto, os cabritos do tratamento ET tentaram levantar com frequência significativamente maior que os cabritos do tratamento TN (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequência das atividades do comportamento materno-filial nos primeiros 60 minutos pós-parto.

Comportamento	TN	ET	Valor de P
	Média (observado/total)	Média (observado/total)	
<b>MATERNO</b>			
Limpeza do filhote	54,99 (215/391)	53,38 (253/474)	0,63
Estimulando o filhote a levantar	2,81 (11/391) <sup>b</sup>	16,24 (77/474) <sup>a</sup>	<,0001
Afastando-se do filhote	1,02 (4/391)	0,42 (2/474)	0,28
Agredindo o filhote	0,51 (2/391)	0 (0/474)	0,11
Outro comportamento	40,66 (159/391) <sup>a</sup>	29,9 (142/474) <sup>b</sup>	0,001
<b>FILIAL</b>			
Tentando levantar	20,97 <sup>b</sup> (82/391)	31,86 <sup>a</sup> (151/474)	0,0003
Procurando o úbere	3,07 (12/391)	2,74 (13/474)	0,77
Tentando mamar	8,44 (33/,391)	10,55 (50/474)	0,29
Mamada sem auxílio	1,02 (4/391)	0,63 (3/474)	0,52
Mamada com auxílio	0,51 (2/391)	1,48 (7/474)	0,16
Outro comportamento	2,81 (11/391)	5,06 (24/474)	0,09
<i>Postura</i>			
Em pé	22,51 (88/391)	18,99 (90/474)	0,2
Deitado	77,49 (303/391)	81,01 (384/474)	0,2

Termoneutro (TN); Estresse térmico (ET); Erro-padrão médio (EPM).

Médias marcadas com letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).

Fonte: Própria autoria

### 3.3.6. Pesagem dos cabritos do nascimento ao desmame com 60 dias de vida

Na primeira semana de vida os cabritos TN estavam significativamente mais pesados que os cabritos ET. Não houve diferença significativa entre o peso aos 15 dias de vida dos cabritos TN e ET, mas nesse período, os animais nascidos em ambiente de estresse térmico tenderam a serem mais leves do que os animais nascidos em ambiente termoneutro. A partir dos 21 dias de vida os animais tiveram ganho de peso semelhante até a desmama (aos 60 dias) (Tabela 8). No entanto, a relação de diferença apresentada entre os animais de ambos os tratamentos foi reduzindo gradativamente até os 30 dias de vida, e após esse período, a diferença começa a aumentar novamente.

Tabela 8 - Pesagem dos cabritos TN e ET do nascimento aos 60 dias de vida.

Dias de vida	Tratamento		EPM	Valor de P
	TN (Kg)	ET (Kg)		
Nascimento	3,72	3,46	0,11	0,09
8	3,97 <sup>a</sup>	3,71 <sup>b</sup>	0,07	0,02
15	4,04	3,84	0,07	0,08
21	4,26	4,35	0,15	0,69
30	5,04	5,01	0,12	0,88
37	5,63	5,57	0,14	0,75
45	6,47	6,63	0,16	0,5
54	6,99	7,17	0,17	0,45
60	7,78	7,9	0,19	0,68

Termoneutro (TN); Estresse térmico (ET); Erro-padrão médio (EPM); Médias marcadas com letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.3.7. Avaliação das respostas termorregulatórias.

O estresse térmico influenciou significativamente os mecanismos termorregulatórios dos cabritos. Quando foi avaliado o esforço fisiológico dos animais para manutenção da homeotermia, observou-se que a regressão de relação entre a FR e a TR foi significativamente positiva para os cabritos de ambos os tratamentos TN e ET aos 60 dias de vida (Apêndice C). No entanto, observou-se que tanto no nascimento quanto aos 60 dias de vida os cabritos do tratamento TN estavam mais sensíveis à manutenção da homeotermia, iniciando mais precocemente a regulação térmica que os cabritos ET.

### 3.3.8. Comparações entre as variáveis.

Os gráficos de dispersão e as linhas de regressão ajustadas entre as medidas de cortisol plasmático materno no parto e o cortisol dos cabritos no nascimento, aos 30 dias e 60 dias de vida (Apêndice D), demonstram que no tratamento TN a regressão de relação do cortisol plasmático materno no parto não influenciou o cortisol dos cabritos no nascimento. Porém, aos 30 dias e 60 dias de vida, no entanto, no tratamento ET houve uma relação negativa significativa entre essas medidas aos 30 dias de vida e uma tendência aos 60 dias (Apêndice D).

Ao ser analisada a relação entre as medidas de ITU e o cortisol dos cabritos (Apêndice E), os gráficos de dispersão e as linhas de regressão ajustadas entre estas medidas demonstraram que no tratamento TN o ITU apresentou uma relação positiva significativa sobre o cortisol dos cabritos aos 30 dias de vida, no entanto, a mesma relação só foi observada nos cabritos ET aos 60 dias de vida.

Já as medidas entre o cortisol no líquido amniótico e o peso dos cabritos no nascimento, aos 30 dias e 60 dias de vida (Apêndice F), demonstram que a regressão de relação do cortisol do líquido amniótico sobre o peso foi significativamente positiva aos 30 dias de vida dos cabritos HS, apresentando uma tendência desde o nascimento.

Os gráficos de dispersão e as linhas de regressão ajustadas entre as medidas de cortisol no líquido amniótico e a temperatura dorsal superficial (TD) dos cabritos os 30 dias e 60 dias de vida (Apêndice G), demonstram que o cortisol do líquido amniótico apresentou uma relação inversa entre os tratamentos, onde observou-se uma relação positiva com a TD do cabrito TN a partir dos 30 dias de vida, mas nos cabritos ET essa relação além de ser negativa, só foi observada aos 60 dias de vida.

### 3.4 DISCUSSÃO

O estresse térmico por calor não influenciou a concentração de ACTH, este resultado pode ter sido causado pelo feedback negativo provocado pela elevada concentração de cortisol no momento do parto, hormônio este, que regula a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e conseqüentemente a liberação do ACTH (CAIN; CIDLOWSKI, 2015; HUBER et al. 2020). No entanto, o aumento da concentração do cortisol plasmático no pré-parto, comprovou que os animais do tratamento ET estavam em estresse durante este período. Além de fundamentar essa condição estressante apresentada pelos animais, esse hormônio também tem influência sobre algumas características placentárias, que associado com o aumento da temperatura ambiental potencializa as alterações. (TAYSI et al. 2018; WARD; WOODING; FOWDEN, 2002).

Neste estudo, os dados obtidos demonstraram que as placentas dos animais submetidos ao estresse térmico por calor apresentaram aumento da taxa de apoptose, menor expressão gênica do oLP, PRL e da enzima antioxidante SOD1 e da quantificação tanto do LP quanto do PRL-r, indicando portanto, que a placenta desses animais tiveram o seu desempenho comprometido.

A elevada taxa de apoptose apresentada pelas células placentárias submetidas a condição estressante devido elevada temperatura ambiental pode ter sido causada pela desestabilização da relação ROS/antioxidantes que ocorre com o aumento da atividade mitocondrial celular (REYNOLDS et al. 2006; TAYSI et al. 2018; WALKER et al., 2020), assim como pela elevação da concentração de cortisol que tem como uma de suas funções controlar a população celular (TAYSI et al. 2018; WARD; WOODING; FOWDEN, 2002), provocando, portanto, alterações na atividade e conseqüentemente, redução da expressão gênica e proteica dos hormônios lactogênio placentário, prolactina, como observado nesse estudo. A placenta apresentava-se menos responsiva na captação da sinalização desencadeada por eles, devido a menor quantidade PRLR. Por ser um dos receptores envolvidos no desencadeamento das respostas induzidas pelo LP, o comprometimento dessa via tem impactos negativos sobre o desenvolvimento fetal que, conseqüentemente é refletido na vida extrauterina (BUDGE et al. 2000; GOOTWINE, 2004), sendo este, um dos pontos que podem ter corroborado para as alterações apresentadas pelos cabritos do presente estudo.

Foi observado também que a região intercotiledonária apresentou expressão gênica significativamente maior dos hormônios placentários e agentes antioxidantes analisados, que os cotilédones. O estudo realizado por Wilsher; Stansfield e Allen (2019) também demonstrou a capacidade de síntese hormonal da região intercotiledonária, e participação de região no desempenho da função placentária e manutenção da gestação. De certa forma, a diferente participação na síntese hormonal entre essas áreas pode estar relacionada com as células binucleadas que, apesar de serem anatomicamente similares, apresentam diferentes capacidade de síntese seletiva e especialização funcional (IGWEBUIKE, 2006). Além disto, a região intercotiledonária também apresentou significativa participação na expressão gênica do PRL-R, que por apresentar alta afinidade com os hormônios PRL e PL torna essa área altamente responsiva as suas ações (GOOTWINE, 2004; NOEL et al. 2003). Desta maneira, ao correlacionar a essencialidade desses hormônios e seu receptor com a acentuada participação da região intercotiledonária no desempenho placentário evidencia-se a necessidade de mais estudos sobre essa área, pois como observado nesse estudo, a atividade hormonal não está restrita apenas aos cotilédones e o comprometimento dessas áreas conseqüentemente, pode refletir na função placentária como um todo.

Outro ponto a ser considerado é a relação do estresse térmico por calor como intensificador do estresse oxidativo no tecido placentário. Fisiologicamente, a placenta

sofre modificações que contribuem com a ocorrência do estresse oxidativo (MYATT, 2010). No entanto, a manutenção do balanço entre as ROS e a ação das enzimas antioxidantes é que determina a homeostasia celular (STARK et al. 2011). No presente estudo, apesar de não ter sido observada diferença na expressão gênica do NOX1 nas placentas de ambos os tratamentos, houve menor expressão gênica da SOD1 nas placentas HS, demonstrando o desequilíbrio dessa relação. Esse desbalanço observado pode ter sido intensificado pelo estresse térmico por calor (DANGI et al. 2015) pois, apesar do sistema de enzimas antioxidantes presentes na placenta ser vasto e efetivo (MYATT; CUI, 2004), a sobrecarga ao qual as células foram submetidas pode ter sido um dos fatores que comprometeu a expressão dessas enzimas. Ao analisar as áreas do tecido placentário, observou-se também que a região intercotiledonária apresentou maior expressão gênica de SOD1 e GPx1 que o cotilédone, evidenciando mais uma vez a importância dessa área na manutenção da funcionalidade placentária, como discutido anteriormente. Em contrapartida, os cotilédones apresentaram maior expressão gênica do NOX1, esse fato pode estar associado com a maior vascularização encontrada nessa área, pois alguns estudos já demonstraram que há relação entre a maior presença de ROS e o comprometimento vascular (MYATT; CUI, 2004; STARK et al. 2011), assim como já foi comprovado também que o estresse térmico e a exposição a elevada concentração de glicocorticóides são fatores que afetam negativamente a vascularização placentária (FOWDEN et al. 2015; REYNOLDS et al. 2006). Com os dados apresentados em nosso estudo, é possível afirmar que apesar da diferença de comprometimento e participação que ocorreu entre as regiões cotiledonar e intercotiledonária, o estresse térmico por calor afetou negativamente a execução de algumas funções placentárias. Como consequências desse processo, os dados analisados nos cabritos desse tratamento também se apresentaram alterados em comparação aos animais do tratamento controle.

O estresse térmico por calor durante o período pré-natal influenciou negativamente a liberação e concentração do cortisol plasmático dos cabritos desse tratamento, este resultado pode ter sido reflexo a elevada exposição do feto ao cortisol materno que apresentou uma relação negativa com a concentração do cortisol filial, que pode ter sido reflexo da deficiência placentária provocado pelo estresse térmico por calor na conversão do cortisol em cortisona pela enzima  $11\beta$ -HSD2, como demonstrado por Silva et al. (2021). Em nosso estudo, a menor concentração de cortisol plasmático dos cabritos ET foi observada até os 45 dias de vida, indicando que mesmo sob as mesmas condições ambientais e de manejo, estes animais apresentaram menor capacidade de resposta diante

os desafios do ambiente extrauterino durante o período de pré-desmame. No entanto, foi observado também que a diferença entre a concentração do cortisol dos animais TN e ET diminuiu ao longo do tempo, demonstrando uma tendência a normalidade na resposta dos cabritos ET. Resultados semelhantes foram observados por Monteiro et al. (2014) em bezerros submetidos ao estresse térmico por calor pré-natal que também apresentaram menor concentração de cortisol nas primeiras duas semanas de vida. Outro estudo também demonstrou que essa condição ambiental durante o período gestacional compromete não só os níveis circulantes de cortisol, mas também o crescimento e a resposta imunológica da prole do nascimento até o desmame dos bezerros (TAO et al. 2012).

A resposta comportamental materna também foi distinta entre os tratamentos. As cabras do tratamento HS passaram aproximadamente 10 vezes mais tempo estimulando o cabrito a levantar que as cabras do tratamento TN. Ou seja, as cabras que sofreram estresse crônico dedicaram mais tempo realizando comportamentos positivos em relação aos seus cabritos que as cabras que permaneceram em ambiente termoneutro durante o terço final da gestação. Em resposta ao comportamento materno, foi observado que os cabritos ET também passaram mais tempo tentando levantar que os cabritos do tratamento TN, podendo ser sugerido, portanto, que há algum grau de percepção das fêmeas de que seus cabritos necessitam de maior período de estímulo para levantar e sobreviver. Em concordância com os dados apresentados nesse trabalho, estudos realizados com ovinos (Coulon et al. 2014; Hild et al. 2011) e suínos (Jarvis et al. 2006), demonstram que fêmeas gestantes que passam por situações de estresse tendem a estimular mais seus filhotes e em contrapartida esses filhotes também são resilientes ao responder aos estímulos estressantes quando passam por adversidades para sobreviver. Alguns autores (NGUYEN et al. 2008) afirmam que o nível de glicocorticoide presente no período gestacional é um dos fatores que interfere no tipo de comportamento materno-filial que os animais irão adotar, de forma que, a exposição pré-natal ao estresse pode estimular respostas tanto positivas quanto negativas na relação materno-filial (Coulon et al. 2014; Klaus et al. 2013; Meek et al. 2001; Patin et al. 2002), como observado em nosso estudo, as fêmeas em situação de estresse apresentaram respostas positivas na relação materno-filial. Além disso, o estresse térmico também influenciou na redução do comportamento das fêmeas na execução de outras atividades não relacionadas aos cabritos, como beber água, ingerir alimento, anexos fetais e interagir com outros animais, quando comparando as cabras TN, indicando que parte do comportamento que deveria ser executado é comprometido.

Mesmo sendo mantidos em um ambiente de termoneutralidade após o nascimento é possível sugerir que o estresse térmico por calor pré-natal ao qual foram submetidos tenha influenciado a resposta termorregulatória dos cabritos ET ao longo dos dias. Os cabritos TN estavam sensíveis a influência do ITU aos 30 dias, onde foi observada uma relação positiva significativa com o cortisol plasmático, no entanto, os cabritos ET só apresentaram um padrão de resposta semelhante e mais intenso aos 60 dias de vida, mesmo o ITU aos 30 dias e 60 dias estar em uma faixa considerada de conforto térmico para os caprinos (SILANIKOVE, 2000). Apesar dessa resposta de estresse a nível hormonal frente ao ITU apresentada pelos animais TN aos 30 dias, não houve esforço fisiológico para manter a homeotermia corporal. Diferente do que ocorreu aos 60 dias com os cabritos ET, que além do ITU apresentar uma relação positiva com o cortisol, estes animais também necessitaram mobilizar mecanismos termorregulatórios através frequência respiratória quando houve o aumento da temperatura retal, apresentando um esforço fisiológico significativo para manter a homeotermia, podendo ser sugerido, portanto, que neste período, os cabritos HS estavam responsivos as variações climáticas devido ao amadurecimento fisiológico do sistema termorregulatórios (ASAKURA, 2004). Tanto no nascimento quanto aos 60 dias de vida, os cabritos TN apresentavam-se mais sensíveis para mobilizar os mecanismos termorregulatórios, como observado na análise do esforço fisiológico, iniciando essa mobilização previamente aos cabritos ET. Esses dados nos levam a sugerir que o estresse térmico durante o período pré-natal pode ter influenciado a capacidade de aclimação dos cabritos HS.

A exposição a elevada concentração de cortisol presente no líquido amniótico no período pré-parto apresentou uma relação negativa com a TD superficial dos cabritos ET aos 60 dias, comprovando o impacto do estresse térmico por calor no pré-parto na vida da prole a longo prazo, assim como, a modificação da resposta a variação climática ambiental quando comparado aos cabritos TN. Em concordância com esses dados, Tzschentke e Nichelmann (1997), propõem que a temperatura a qual os animais são submetidos durante o período pré-natal afeta o comportamento termorregulatório após o nascimento por modificar o limiar de aclimação dos animais para perda e ganho de calor no ambiente. Outros estudos demonstraram também que a permanência de fêmeas gestantes em ambientes estressantes pode ter influência relevante sobre o desenvolvimento fetal nos diversos aspectos (Laporta et al. 2017; Miller et al. 2009; Tao et al. 2012), corroborando com os dados observados nesse estudo.

Os cabritos ET também se apresentaram mais leves que os cabritos TN na primeira semana de vida. O baixo crescimento fetal de animais provenientes de ambiente de estresse térmico está associado com a insuficiência placentária causado pelo calor e até possivelmente pelo cortisol que comprometeu a produção de hormônios essenciais para o crescimento fetal, como lactogênio placentário e progesterona (BELL et al. 1989), corroborando os dados obtidos em nosso estudo discutidos anteriormente. Em contrapartida, relação positiva entre a concentração do cortisol no líquido amniótico apresentou uma com o peso dos cabritos HS observada até os 30 dias de vida, nos leva a sugerir que na tentativa de compensar as restrições causadas pelo estresse por calor ao qual esse animais foram submetidos durante a sua formação, foram mobilizados mecanismos compensatórios para estimular o crescimento desses animais após o nascimento. De acordo com alguns autores (YATES; GREEN; LIMESAND, 2011), a restrição crônica de nutrientes durante a vida intrauterina estimula diversas adaptações metabólicas como alterações na atividade da insulina e estímulo da gliconeogênese hepática que tem como consequência o retardo no desenvolvimento fetal, o que explica o menor peso dos cabritos ET ao nascimento. Mas após o nascimento, esses mecanismos compensatórios estimulam o crescimento acelerado do neonato como resposta adaptativa (MUHLHAUSLER et al. 2009), o que explica em nosso estudo, que cabritos de ambos os tratamentos não apresentaram diferença entre os pesos, mantendo desenvolvimento semelhante até os 60 dias de vida. Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por Miller et al. (2009), em um estudo realizado com ovinos, onde os fetos que foram expostos a altas concentrações de cortisol tiveram menor peso ao nascer, mas não apresentaram diferença do peso ao desmame.

### 3.5 CONCLUSÃO

O estresse térmico por calor tem impacto negativo sobre a placenta, comprometendo a atividade das células placentárias, através do aumento da taxa de apoptose, redução da expressão dos hormônios placentários PRL, LP e seu receptor PRLR e provocando uma redução na expressão das enzimas antioxidantes SOD e glutatona. O estresse térmico também intensificou o comportamento materno-filial positivo, mas comprometeu a resposta dos cabritos com modificações na concentração do cortisol, respostas termorregulatórias e peso durante o período de avaliação.

## REFERÊNCIAS

- ASAKURA, H. Fetal and Neonatal Thermoregulation. **Journal of Nippon Medical School**, v. 71, p. 360–370, 2004.
- BAHR, B.; GALAN, H. L.; ARROYO, J. A. Decreased expression of phosphorylated placental heat shock protein 27 in human and ovine intrauterine growth restriction (IUGR). **Placenta**, v. 35, n. 6, p. 404–410, 2014.
- BELL, A. W. et al. Chronic heat stress and prenatal development in sheep: I. Conceptus growth and maternal plasma hormones and metabolites. **Journal of Animal Science**, v. 67, n. 12, p. 3289–3299, 1989.
- BINART, N.; BACHELOT, A.; BOUILLY, J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 6, p. 362–368, 2010.
- CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 545–556, 2015.
- CARTER, A. M. Evolution of placentation in cattle and antelopes. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 3–17, 2018.
- COULON, M. et al. Mild effects of gestational stress and social reactivity on the onset of mother–young interactions and bonding in sheep. **Stress**, v. 17, n. 6, p. 460–470, 2014.
- DANGI, S. S. et al. Expression of HSPs: an adaptive mechanism during long-term heat stress in goats (*Capra hircus*). **International Journal of Biometeorology**, v. 59, n. 8, p. 1095–1106, 2015.
- DETMAR, J. et al. Placental cell death patterns exhibit differences throughout gestation in two strains of laboratory mice. **Cell and Tissue Research**, v. 378, n. 2, p. 341–358, 2019.
- DWYER, C. M.; GILBERT, C. L.; LAWRENCE, A. B. Prepartum plasma estradiol and postpartum cortisol, but not oxytocin, are associated with interindividual and breed differences in the expression of maternal behaviour in sheep. **Hormones and Behavior**, v. 46, n. 5, p. 529–543, 2004.
- FAURIE, A. S.; MITCHELL, D.; LABURN, H. P. Feto-maternal relationships in goats during heat and cold exposure. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 2, p. 199–204, 2001.
- FOWDEN, A. L. et al. Review : Endocrine regulation of placental phenotype. **Placenta**, v. 36, p. S50–S59, 2015.
- FTHENAKIS, G. C. et al. Health management of ewes during pregnancy. **Animal**

**Reproduction Science**, v. 130, n. 3–4, p. 198–212, fev. 2012.

GOOTWINE, E. Placental hormones and fetal – placental development. **Animal Reproduction Science**, v. 83, p. 551–566, 2004.

HILD, S. et al. Gentle vs. aversive handling of pregnant ewes: I. Maternal cortisol and behavior. **Physiology and Behavior**, v. 104, n. 3, p. 384–391, 2011.

HUBER, E. et al. Fetal programming in dairy cows: Effect of heat stress on progeny fertility and associations with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions. **Animal Reproduction Science**, v. 216, p. 106348, 2020.

IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placentas — A minireview. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 185–198, 2006.

JARVIS, S. et al. Programming the offspring of the pig by prenatal social stress: Neuroendocrine activity and behaviour. **Hormones and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 68–80, 2006.

KLAUS, T.; SCHÖPPER, H.; HUBER, S. Effects of chronic stress during pregnancy on maternal performance in the guinea pig (*Cavia aperea f. porcellus*). **Behavioural Processes**, v. 94, p. 83–88, 2013.

LABURN, H. P. et al. Effects on fetal and maternal body temperatures of exposure of pregnant ewes to heat, cold, and exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 802–808, 2002.

LAPORTA, J. et al. In utero exposure to heat stress during late gestation has prolonged effects on the activity patterns and growth of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1–9, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MADER, T. L.; DAVIS, M. S.; BROWN-BRANDL, T. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 712–719, 2006.

MEEK, L. R. et al. Effects of stress during pregnancy on maternal behavior in mice. **Physiology & Behavior**, v. 72, n. 4, p. 473–9., 2001.

MILLER, D. R. et al. Metabolic maturity at birth and neonate lamb survival and growth: The effects of maternal low-dose dexamethasone treatment. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3167–3178, 2009.

MONTEIRO, A. P. A. et al. Effect of heat stress during late gestation on immune function and growth performance of calves: isolation of altered colostral and calf factors. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 10, p. 6426–39, 2014.

- MUHLHAUSLER, B. S. et al. The transition from fetal growth restriction to accelerated postnatal growth: a potential role for insulin signalling in skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 17, p. 4199–4211, 2009.
- MYATT, L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. **Placenta**, v. 31, p. S66–S69, 2010.
- MYATT, L.; CUI, X. Oxidative stress in the placenta. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, p. 369–382, 2004.
- NGUYEN, N. et al. Late pregnancy glucocorticoid levels predict responsiveness in wild baboon mothers (*Papio cynocephalus*). **Animal Behaviour**, v. 75, n. 5, p. 1747–1756, 2008.
- NRC. Nutrients Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. ed. **National Academies Press**, Washington, DC. 2007.
- NOEL, S. et al. Ovine Placental Lactogen Specifically Binds to Endometrial Glands of the Ovine Uterus 1. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 772–780, 2003.
- NRC. Nutrients Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. ed. **Natl. Acad. Press**, Washington, DC. 2007.
- PATIN, V. et al. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. **Developmental Brain Research**, v. 139, n. 1, p. 1–8, 2002.
- PORTERA-CAILLIAU, C. et al. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 3, p. 974–978, 1994.
- REYNOLDS, L. P. et al. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. **The Journal of Physiology**, v. 572, n. Pt 1, p. 51–8, 2006.
- ROUSSEL, S. et al. Effects of repeated stress during pregnancy in ewes on the behavioural and physiological responses to stressful events and birth weight of their offspring. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 85, n. 3–4, p. 259–276, 2004.
- RUSSEL, A. J. F; DONEY, J. M; GUNN, R. G. Subjective assessment of body fat in live sheep. **The Journal of Agricultural Science**, v. 72, p. 451–454, 1969.
- SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**, v. 67, n. 1–2, p. 1–18, 2000.
- SILANIKOVE, N.; KOLUMAN, D. N. Impact of climate change on the dairy industry in temperate zones: Predications on the overall negative impact and on the positive role of dairy goats in adaptation to earth warming. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 27–34, 2015.
- SILVA, P. S. et al. Heat stress affects the expression of key genes in the placenta, placental characteristics, and efficiency of Saanen goats and the survival and growth of

their kids. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4970–4979, 2021.

STARK, M. J. et al. Influence of sex and glucocorticoid exposure on preterm placental pro-oxidant-antioxidant balance. **Placenta**, v. 32, n. 11, p. 865–870, 2011.

TAO, S. et al. Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7128–36, 2012.

TAYSI, S. et al. Radicals, Oxidative/Nitrosative Stress and Preeclampsia. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 178–193, 2018.

TZSCHENTKE, B.; NICHELMANN, M. Influence of prenatal and postnatal acclimation on nervous and peripheral thermoregulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 813, p. 87–94, 1997.

VERHEECKE, M. et al. Genetic and microscopic assessment of the human chemotherapy-exposed placenta reveals possible pathways contributive to fetal growth restriction. **Placenta**, v. 64, p. 61–70, 2018.

WALKER, O. S. et al. Reactive oxygen species from mitochondria impacts trophoblast fusion and the production of endocrine hormones by syncytiotrophoblasts. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, p. 1–18, 2020.

WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. The Effects of Cortisol on the Binucleate Cell Population in the Ovine Placenta During Late Gestation. **Placenta**, v. 23, p. 451–458, 2002.

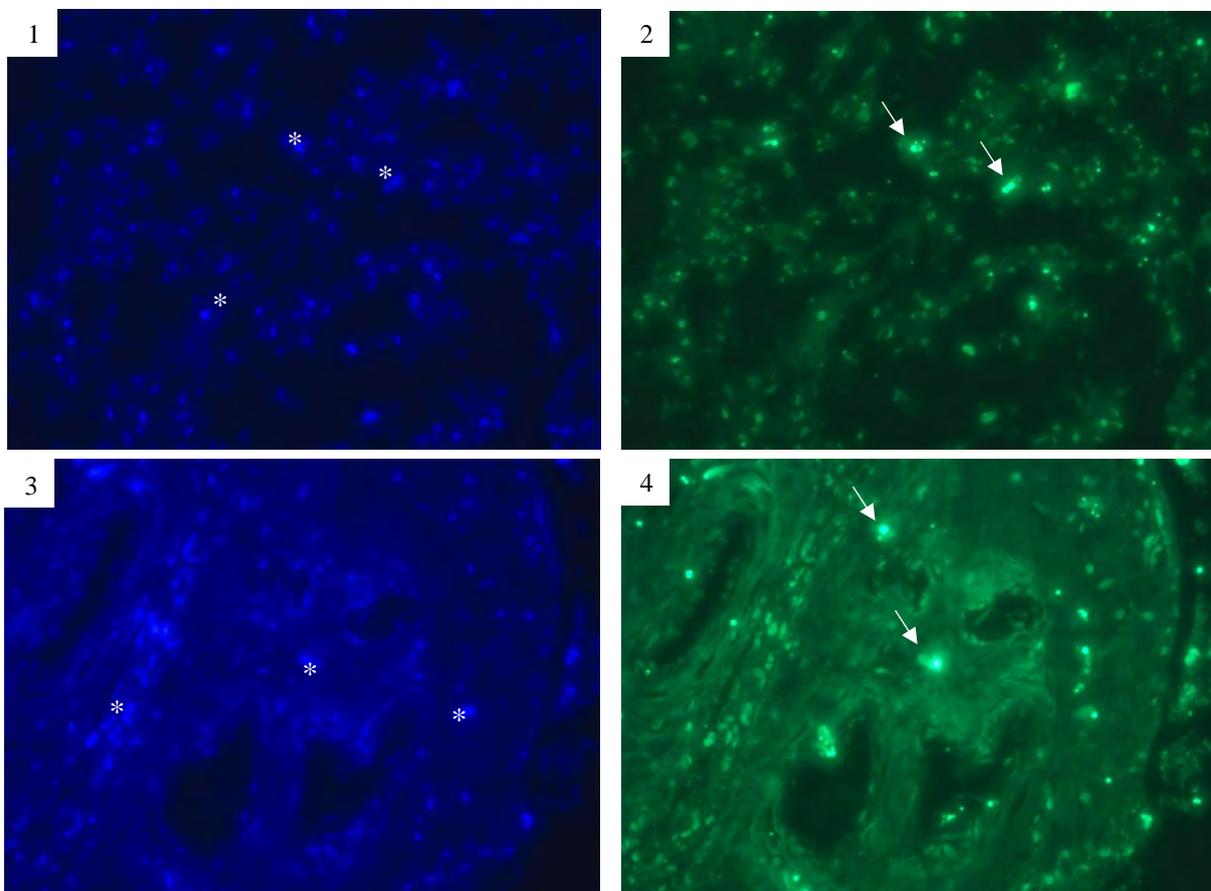
WILSHER, S.; STANSFIELD, F.; ALLEN, W. R. T. Placentation in the Blue Wildebeest (*Connochaetes taurinus*). **Placenta**, v. 82, n. May, p. 46–56, 2019.

WU, F.; TIAN, F. J.; LIN, Y. Oxidative stress in placenta: Health and diseases. **BioMed Research International**, n. 1–15, 2015.

YATES, D. T.; GREEN, A. S.; LIMESAND, S. W. Catecholamines Mediate Multiple Fetal Adaptations during Placental Insufficiency That Contribute to Intrauterine Growth Restriction: Lessons from Hyperthermic Sheep. **Journal of Pregnancy**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

## APÊNDICE

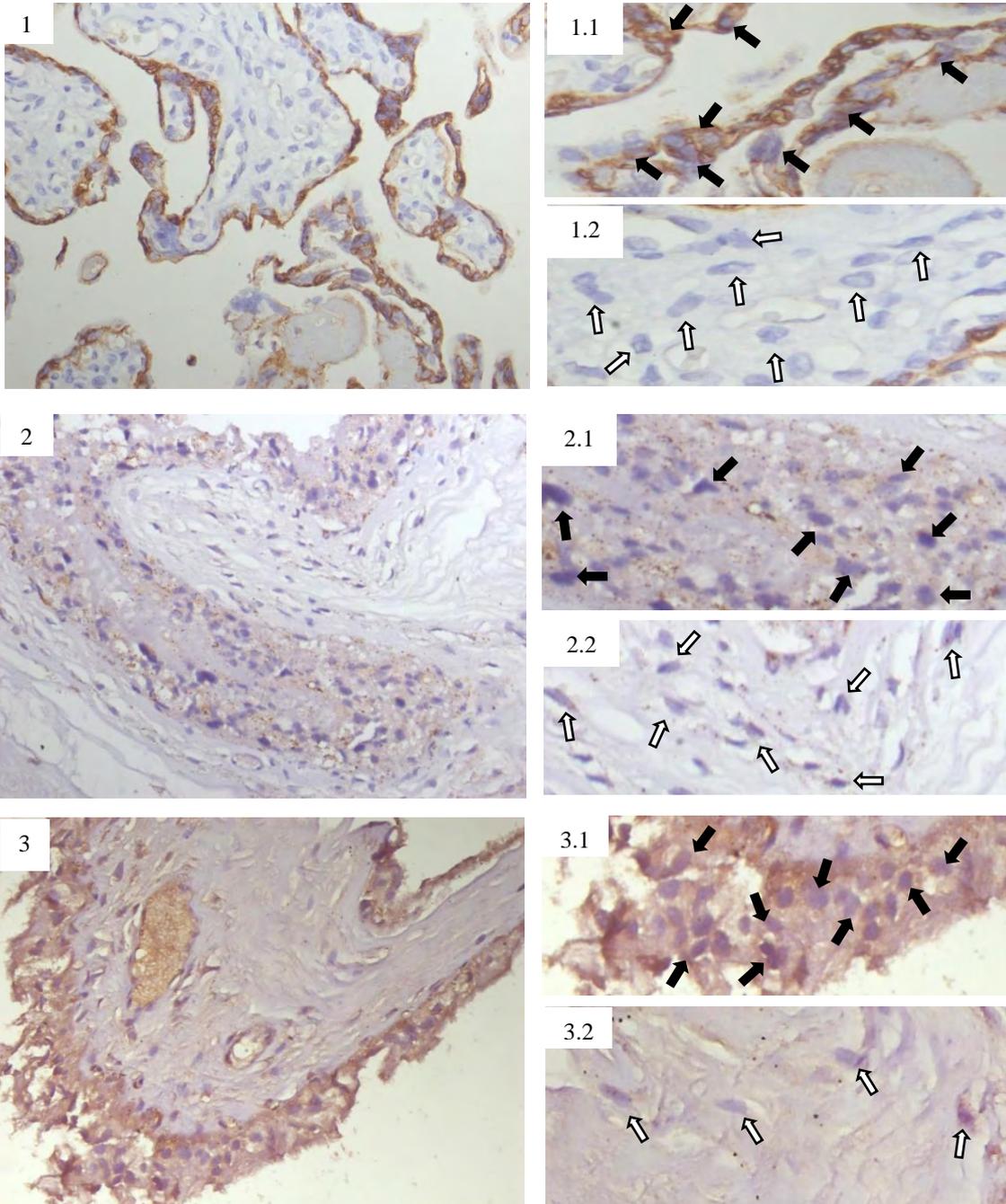
APÊNDICE A - Identificação das células pela coloração de Hoechst e das células reativas na técnica de TUNEL.



Imagens do mesmo campo do cotilédone (1: coloração de Hoechst; 2: TUNEL) e região intercotiledonária (3: coloração de Hoechst; 4: TUNEL) das amostras do tratamento CT. As setas brancas (→) nas imagens de TUNEL indicam os núcleos celulares reagentes na técnica. Os asteriscos brancos (\*) nas imagens de Hoechst indicam os núcleos celulares presentes no campo.

Fonte: Própria autoria

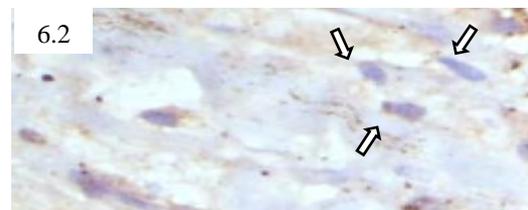
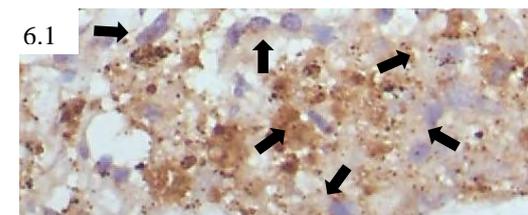
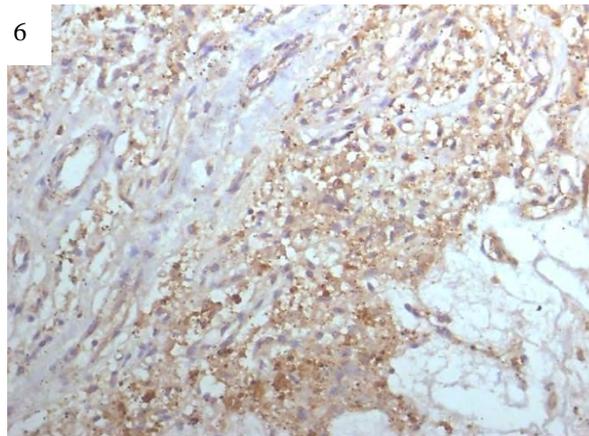
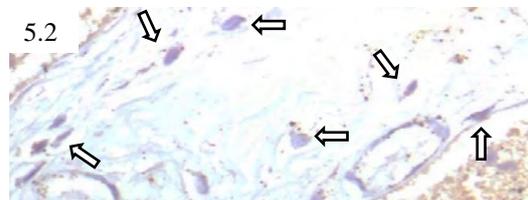
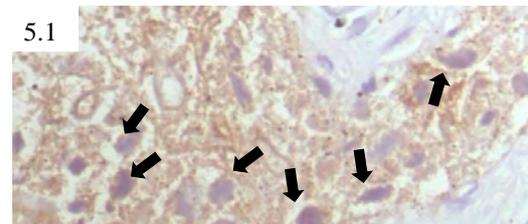
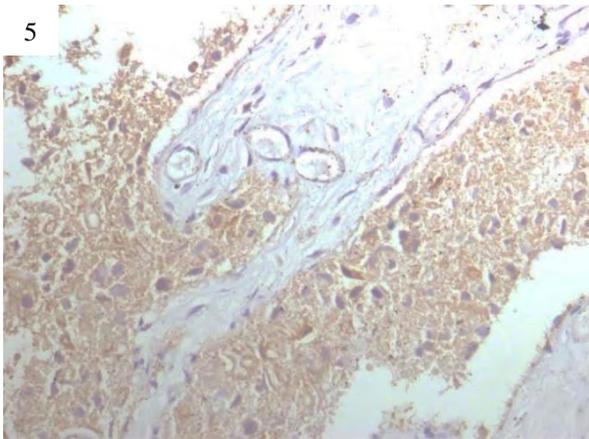
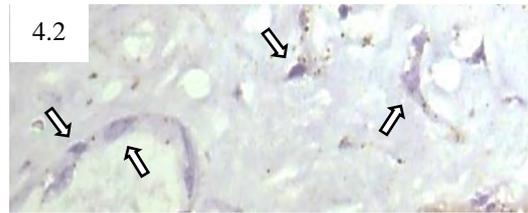
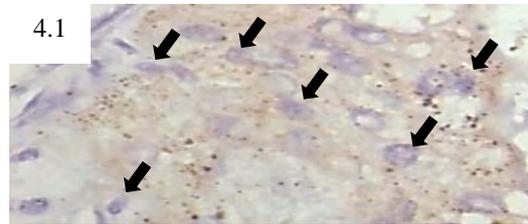
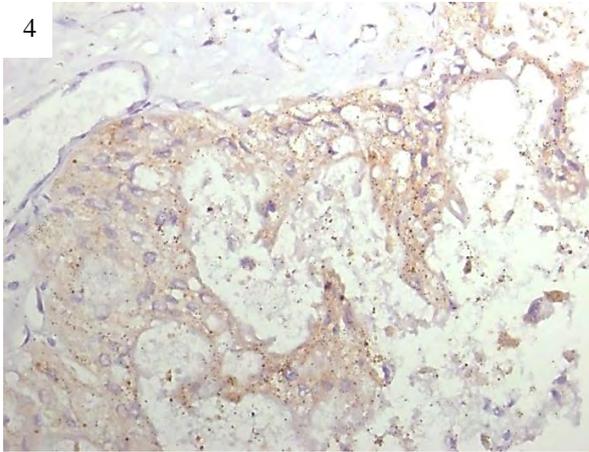
APÊNDICE B - Imuno-histoquímica das marcações do lactogênio placentário, prolactina, receptor de prolactina e receptor de glicocorticoide no cotilédone e região intercotiledonária (imagem à esquerda) e ampliações (à direita) das regiões evidenciando os núcleos das células (roxo) nas áreas positivas (➔) e negativas (⇨).



Continua

Continuação

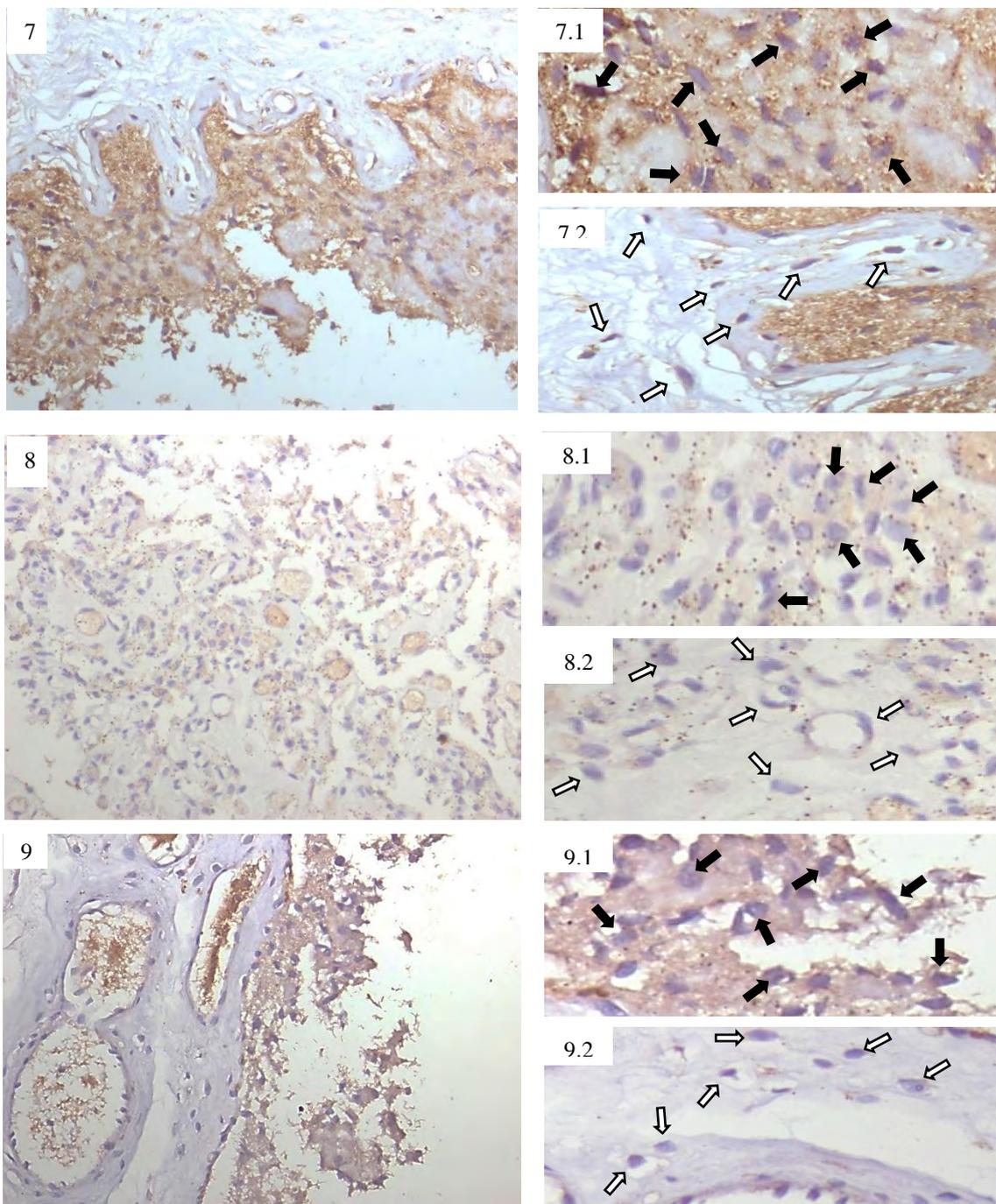
APÊNDICE B - Imuno-histoquímica das marcações do lactogênio placentário, prolactina, receptor de prolactina e receptor de glicocorticoide no cotilédone e região intercotiledonária (imagem à esquerda) e ampliações (à direita) das regiões evidenciando os núcleos das células (roxo) nas áreas positivas (➡) e negativas (⇨).



Continua

## Conclusão

APÊNDICE B - Imuno-histoquímica das marcações do lactogênio placentário, prolactina, receptor de prolactina e receptor de glicocorticoide no cotilédone e região intercotiledonária (imagem à esquerda) e ampliações (à direita) das regiões evidenciando os núcleos das células (roxo) nas áreas positivas (➡) e negativas (⇨).



Lactogênio placentário (1: placenta humana – controle; 1.1 núcleo de células (➡) nas áreas positivas; 1.3: núcleo de células (⇨) em áreas negativas).

Lactogênio placentário (2: cotilédone; 2.1: núcleo de células (➡) nas áreas positivas; 2.2: núcleo de células (⇨) em áreas negativas (3: região intercotiledonária; 3.1: núcleo de células (➡) nas áreas positivas; 3.2: núcleo de células (⇨) em áreas negativas).

Prolactina (4: cotilédone; 4.1: núcleo de células (➡) nas áreas positivas; 4.2: núcleo de células (⇔) em áreas negativas; (5: região intercotiledonária; 5.1: núcleo de células (➡) nas áreas positivas; 5.2: núcleo de células (⇔) em áreas negativas).

Receptor de Prolactina (6: cotilédone; 6.1: núcleo de células (➡) nas áreas positivas; 6.2: núcleo de células (⇔) em áreas negativas; (7: região intercotiledonária; 7.1: núcleo de células (➡) nas áreas positivas; 7.2: núcleo de células (⇔) em áreas negativas).

Receptor de glicocorticoide (8: cotilédone; 8.1: núcleo de células (➡) nas áreas positivas; 8.2: núcleo de células (⇔) em áreas negativas; (9: região intercotiledonária; 9.1: núcleo de células (➡) nas áreas positivas; 9.2: núcleo de células (⇔) em áreas negativas).

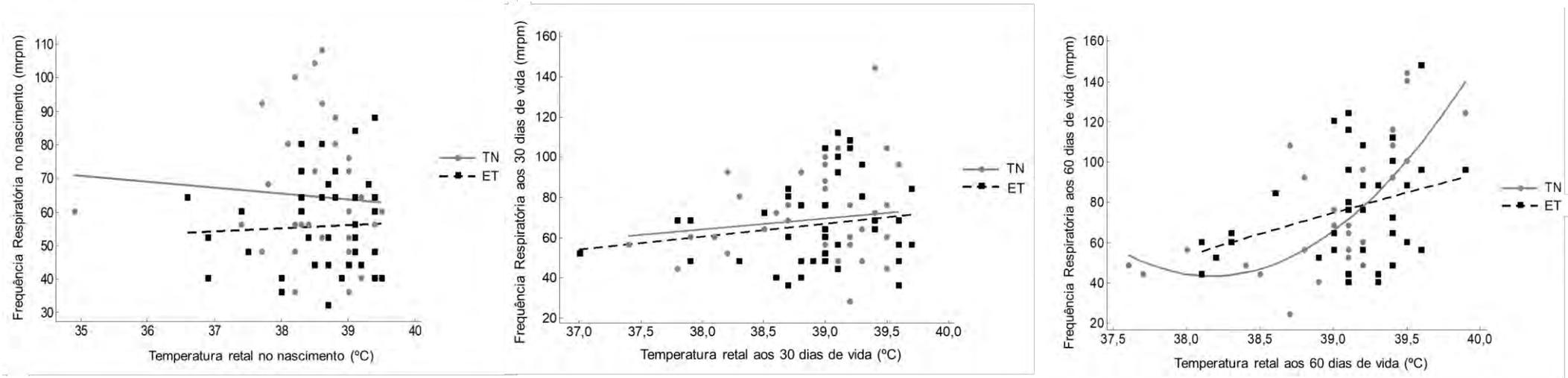
Fonte: Própria autoria

APÊNDICE C - Avaliação do esforço fisiológico dos cabritos no nascimento, aos 30 dias e 60 dias de vida.

TN:  $FR = 132,95 - 1,77_{TR}$ ;  $R^2: 0,006$ ;  $p = 0,64$   
 ET:  $FR = 18,42 + 0,96_{TR}$ ;  $R^2: 0,002$ ;  $p = 0,76$

TN:  $FR = -142,92 + 5,45_{TR30}$ ;  $R^2: 0,01$ ;  $p = 0,46$   
 ET:  $FR = -186,14 + 6,48_{TR30}$ ;  $R^2: 0,03$ ;  $p = 0,28$

TN:  $FR = -47087 - 2465,09_{TR60} + 32,29_{RT60}$ ;  $R^2: 0,48$ ;  $p = 0,005$   
 ET:  $FR = -733,52 + 20,71_{TR60}$ ;  $R^2: 0,11$ ;  $p = 0,04$



Termoneuro (TN); Estresse térmico (HS); Frequência Respiratória (FR); Temperatura Retal (TR); Movimentos respiratórios por minuto (mrpm); Graus Célsius (°C). Coeficiente de determinação ( $R^2$ ); Equação de regressão pelo modelo mixed apropriado.

Fonte: Própria autora

### APÊNDICE D - Influência do cortisol plasmático materno no parto sobre a concentração de cortisol plasmático dos cabritos

TN:  $\text{Cortnasc} = 94,89 - 0,05 \text{CortPart}$ ;  $R^2: 0,0004$ ;  $p = 0,90$

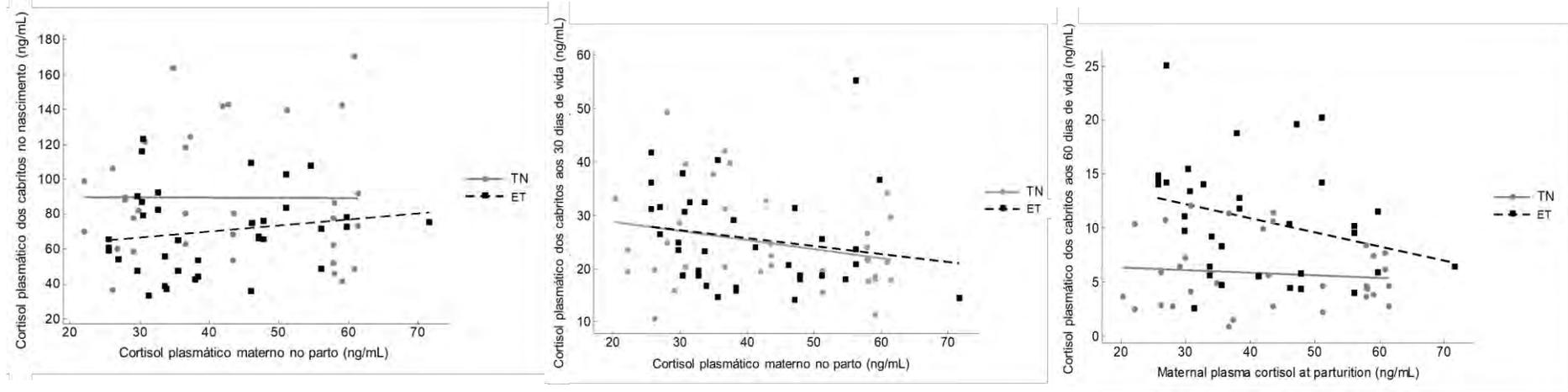
ET:  $\text{Cortnasc} = 55,99 + 0,34 \text{CortPart}$ ;  $R^2: 0,02$ ;  $p = 0,31$

TN:  $\text{Cort30} = 32,10 - 0,17 \text{CortPart}$ ;  $R^2: 0,06$ ;  $p = 0,12$

ET:  $\text{Cort30} = 35,32 - 0,26 \text{CortPart}$ ;  $R^2: 0,14$ ;  $p = 0,02$

TN:  $\text{Cort60} = 6,82 - 0,02 \text{CortPart}$ ;  $R^2: 0,01$ ;  $p = 0,55$

ET:  $\text{Cort60} = 16,12 - 0,13 \text{CortPart}$ ;  $R^2: 0,08$ ;  $p = 0,09$



Termoneutro (TN); Estresse Térmico (ET); Cortisol plasmático materno no parto (CortPart); Cortisol plasmático dos cabritos no nascimento (Cortnasc), aos 30 dias de vida (Cort30), aos 60 dias de vida (Cort60); Coeficiente de determinação ( $R^2$ ); Equação de regressão pelo modelo mixed apropriado.

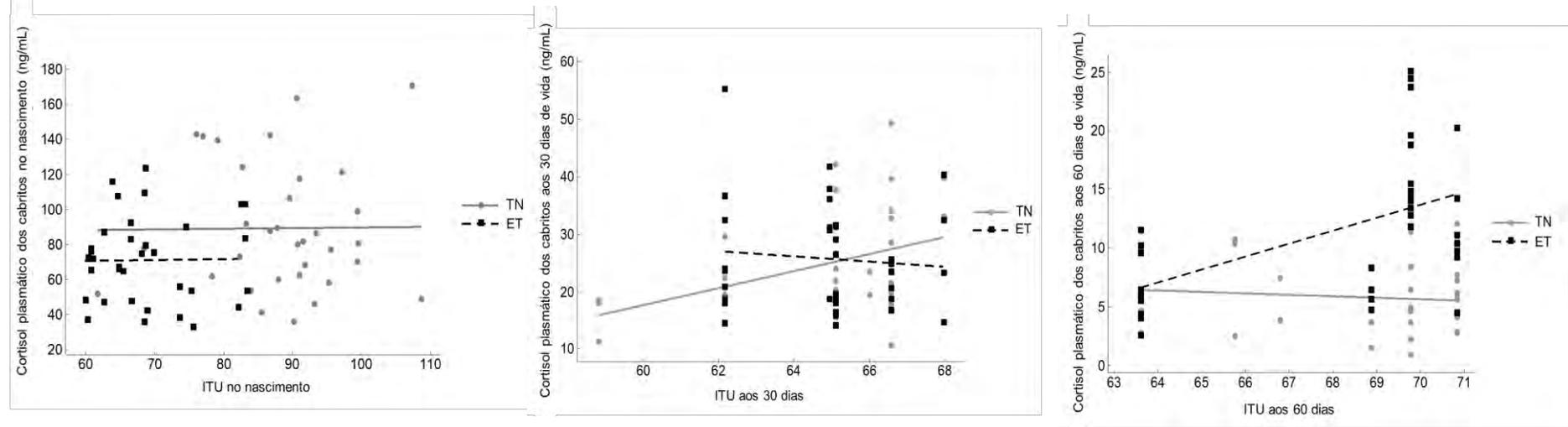
Fonte: Própria autoria

APÊNDICE E - Avaliação da influência do ITU sobre a concentração do cortisol dos cabritos no nascimento, aos 30 dias e 60 dias de vida.

TN:  $\text{Cortnasc} = 55,11 + 0,38\text{ITU}_{\text{nasc}}$ ;  $R^2: 0,02$ ;  $p = 0,35$   
 ET:  $\text{Cortnasc} = 67,39 + 0,05\text{ITU}_{\text{nasc}}$ ;  $R^2: 0,0002$ ;  $p = 0,92$

TN:  $\text{Cort30} = -71,04 + 1,47\text{ITU}_{30}$ ;  $R^2: 0,16$ ;  $p = 0,01$   
 ET:  $\text{Cort30} = 10,03 + 0,22\text{ITU}_{30}$ ;  $R^2: 0,002$ ;  $p = 0,76$

TN:  $\text{Cort60} = 14,16 - 0,12\text{ITU}_{60}$ ;  $R^2: 0,01$ ;  $p = 0,57$   
 ET:  $\text{Cort60} = -56,00 + 0,98\text{ITU}_{60}$ ;  $R^2: 0,30$ ;  $p = 0,0009$



Termoneutral (TN); Estresse Térmico (ET); Cortisol plasmático dos cabritos no nascimento (Cortnasc), aos 30 dias de vida (Cort30), aos 60 dias de vida (Cort60); Índice de Temperatura-Umididade (ITU) no nascimento (ITUnasc), aos 30 dias de vida (ITU30), aos 60 dias de vida (ITU60). Coeficiente de determinação ( $R^2$ ); Equação de regressão pelo modelo mixed apropriado.

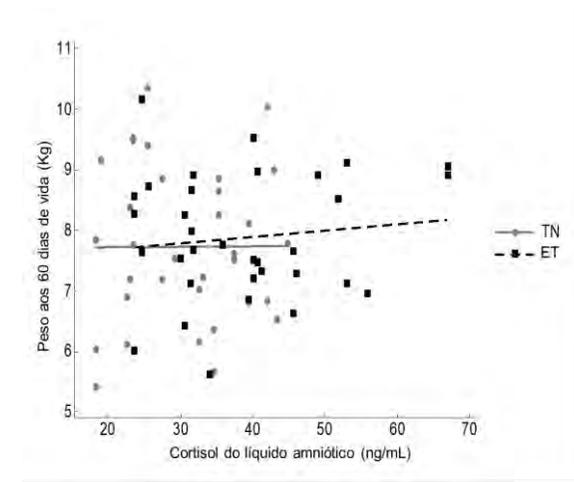
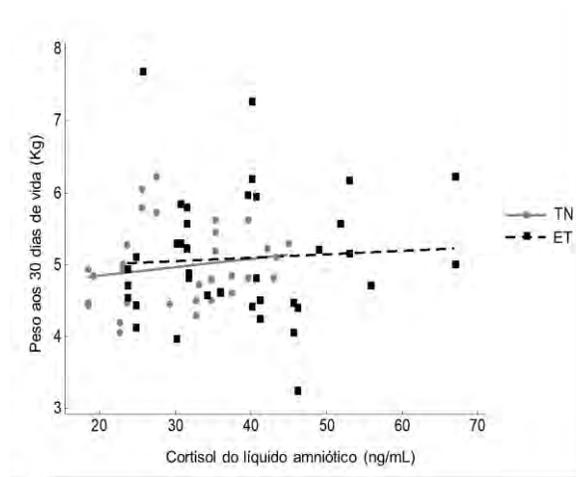
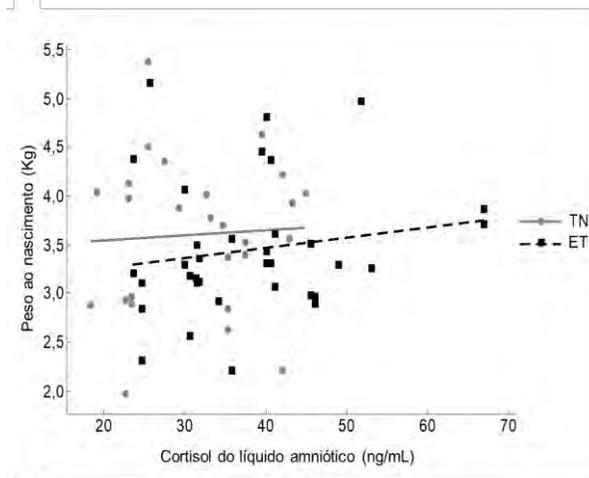
Fonte: Própria autoria

APÊNDICE F - Influência do cortisol do líquido amniótico sobre o peso dos cabritos no nascimento, aos 30 dias e 60 dias de vida.

TN:  $\text{Pesonasc} = 5,50 - 0,006_{\text{LA}}$ ;  $R^2: 0,001$ ;  $p = 0,85$   
 ET:  $\text{Pesonasc} = 16,12 - 0,13_{\text{LA}}$ ;  $R^2: 0,08$ ;  $p = 0,09$

TN:  $\text{Peso30} = 4,50 - 0,005_{\text{LA}}$ ;  $R^2: 0,01$ ;  $p = 0,69$   
 ET:  $\text{Peso30} = 3,44 - 0,02_{\text{LA}}$ ;  $R^2: 0,32$ ;  $p = 0,007$

TN:  $\text{Peso60} = 6,09 - 0,02_{\text{LA}}$ ;  $R^2: 0,06$ ;  $p = 0,13$   
 ET:  $\text{Peso60} = 6,70 - 0,01_{\text{LA}}$ ;  $R^2: 0,02$ ;  $p = 0,36$

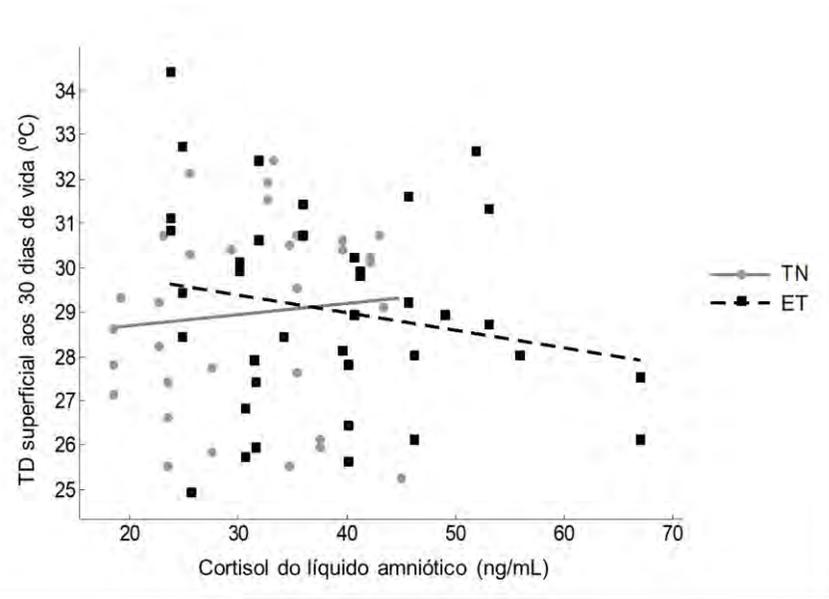


Termoneutral (TN); Estresse térmico (ET); Cortisol do líquido amniótico (LA); Peso ao nascimento (Pesonasc), aos 30 dias de vida (Peso30), aos 60 dias de vida (Peso60).  
 Coeficiente de determinação ( $R^2$ ); Equação de regressão pelo modelo mixed apropriado.

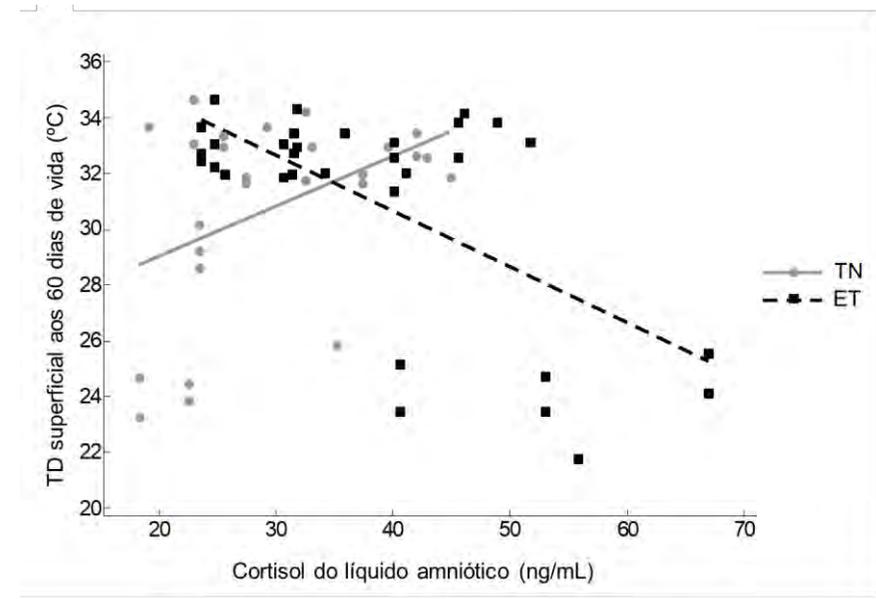
Fonte: Própria autoria

APÊNDICE G - Influência do cortisol do líquido amniótico sobre a temperatura dorsal superficial dos cabritos aos 30 dias e 60 dias de vida

TN:  $TD30 = 26,57 + 0,09_{LA}$ ;  $R^2: 0,16$ ;  $p = 0,03$   
 ET:  $TD30 = 30,55 - 0,03_{LA}$ ;  $R^2: 0,03$ ;  $p = 0,23$



TN:  $TD60 = 24,42 + 0,18_{LA}$ ;  $R^2: 0,18$ ;  $p = 0,02$   
 ET:  $TD60 = 38,63 - 0,19_{LA}$ ;  $R^2: 0,39$ ;  $p = 0,0001$



Termoneutral (TN); Estresse térmico (ET); Temperatura dorsal superficial aos 30 dias de vida (TD30); Temperatura dorsal superficial aos 60 dias de vida (DT60); Cortisol do líquido amniótico (LA); Graus Célsius (°C). Coeficiente de determinação ( $R^2$ ); Equação de regressão pelo modelo mixed apropriado.

Fonte: Própria autoria

#### **4 Efeitos do estresse por calor sobre os componentes envolvidos no estresse oxidativos e expressão de genes relacionados a apoptose e função das células cotiledonárias e intercotiledonária da placenta de caprinos**

##### RESUMO

O estresse por calor causa estresse oxidativo podendo aumentar a taxa de apoptose e modificar o desempenho das células placentárias. O objetivo desse estudo foi analisar o perfil gênico e oxidativo das células placentárias presentes na região cotiledonar e intercotiledonária, avaliando a contribuição de cada uma dessas áreas quando submetidas ao estresse térmico por calor. O experimento foi conduzido nas células da região cotiledonária e da região intercotiledonária proveniente de 5 placentas de cabras, cultivadas separadamente. Assim, as células cotiledonárias e intercotiledonárias placentárias foram submetidas ao efeito de quatro temperaturas de cultura: controle: 37 °C (CT, tempo 0 h), tratamento térmico - 38,3 °C (ET38), 39,3 °C (ET39) e 40,3 °C (ET40) durante 6, 12, 24 e 48 horas após o início destes tratamentos térmicos. Os componentes relacionados ao estresse oxidativo do meio de cultura (GSH, SOD, TAC e MAD) e as expressão gênica nas células cotiledonárias e intercotiledonárias (Bcl-2, Bax, CASP3, LP, HSP90, GR e 11 $\beta$ -HSD2) foram analisadas em todas as culturas realizadas. No presente estudo, o estresse térmico causou redução da dosagem de MDA e aumento de TAC na cultura das células cotiledonárias e intercotiledonárias em comparação ao CT. O estresse térmico também causou aumento da atividade da SOD na cultura das células cotiledonárias e intercotiledonárias em comparação ao CT. Apenas nas células intercotiledonárias, o estresse térmico causou aumento da dosagem de GSH. As células intercotiledonárias apresentaram aumento da expressão gênica apenas da caspase 3 em relação ao aumento da temperatura em comparação ao CT. O estresse térmico também causou aumento da expressão gênica de Bax e da razão Bax/Bcl-2 nas células cotiledonárias em comparação ao CT. O estresse térmico estimulou o aumento da expressão gênica do LP nas células cotiledonárias e do GR nas células intercotiledonárias. Finalmente, o estresse por aumento de temperatura de cultivo causou aumento da expressão gênica da HSP90 pelas células cotiledonárias e intercotiledonárias. Deste modo, essas células placentárias apresentaram diferentes perfis de resposta ao estresse térmico. Neste contexto, conclui-se que o estresse por calor causa estresse oxidativo, aumenta a expressão de genes relacionados a apoptose e modifica a expressão de lactogênio placentário e GR.

Palavras-chave: Antioxidantes. Bax. HSP90. Lactogênio Placentário. Peroxidação lipídica.

## ABSTRACT

Heat stress causes oxidative stress and it can increase the rate of apoptosis and modify the performance of placental cells. The aim of this study was to analyze the components involved in oxidative stress and the expression of genes related to apoptosis and cell function in the cotyledonary and intercotyledonary regions when subjected to heat stress. The experiment was carried out in cells from the cotyledonary region and the intercotyledonary region separately cultured from 5 goat placentas. Thus, placental cotyledonary and intercotyledonary cells were subjected to the effect of four culture temperatures: control - 37 °C (CT, time 0 h), heat treatments - 38.3 °C (HT38), 39.3 °C (HT39) and 40.3 °C (HT40) for 6, 12, 24 and 48 hours after starting these heat treatments. The components related to the oxidative stress of the culture medium (GSH, SOD, TAC and MAD) and the gene expression in cotyledonary and intercotyledonary cells (Bcl-2, Bax, CASP3, LP, HSP90, GR and 11 $\beta$ -HSD2) were analyzed in all cultures performed. In the present study, heat stress caused a reduction in MDA dosage and an increase in TAC in cotyledonary and intercotyledonary cell cultures compared to CT. Heat stress also caused increased SOD activity in cotyledonary and intercotyledonary cell cultures compared to CT. Only in intercotyledonary cells, heat stress caused an increase in GSH dosage. The intercotyledonary cells showed an increase in gene expression only of caspase 3 in relation to the increase in temperature compared to CT. Heat stress also caused increased the gene expression Bax and Bax/Bcl-2 ratio in cotyledonary cells compared to CT. Heat stress stimulated an increase in LP gene expression in cotyledonary cells and GR in intercotyledonary cells. Finally, the stress caused by the increase in culture temperature increased the HSP90 gene expression in cotyledonary and intercotyledonary cells. Thus, those placental cells showed different response profiles to heat stress. In this context, it is concluded that heat stress causes oxidative stress, increases the expression of apoptosis-related genes and modifies the expression of placental lactogen and GR

Keywords: Antioxidants, BAX, HSP90, Lipid peroxidation. Placental lactogen

## 4.1 INTRODUÇÃO

O estresse térmico causa estresse oxidativo provocando desarranjo estrutural celular devido ao aumento da produção de radicais livres que reagem com as cadeias de ácidos graxos da membrana celular provocando a peroxidação lipídica (WAWRZYKOWSKI et al. 2021). Esta reação desencadeia a formação de metabólitos tóxicos como o malondialdeído, que por sua vez é mensurado para avaliar a intensidade da peroxidação lipídica e conseqüentemente, o comprometimento celular (KANKOFER, 2002). Sendo que, a intensificação do estresse celular pode culminar com a apoptose (LESLIE et al., 2015) devido o desequilíbrio entre genes pró-apoptóticos, como caspase 3, Bax e antiapoptóticos, como o Bcl-2 (LUO et al. 2016).

Para minimizar os danos provocados pelo estresse térmico, são desencadeadas respostas de proteção celular por meio da ação dos agentes antioxidantes enzimáticos, como a glutatona e superóxido dismutase (SOD) que estão presentes no citosol e núcleo das células de diversos tecidos inclusive da placenta (KANKOFER; WAWRZYKOWSKI; HOEDEMAKER, 2013), dos agentes antioxidantes não-enzimáticos, como tocoferóis, carotenos, ubiquinóis e vitaminas A, C e E, e das proteínas de choque térmico (HSP), que em conjunto são capazes de eliminar os radicais livres, assim como atribuir a capacidade de adaptação celular, com posterior aclimatação (DANGI; GUPTA; DANGI, 2015); (SINGH et al. 2016; MOHANARAO et al. 2014). Além disso, algumas HSPs, como a HSP 90, além de estar envolvida na proteção celular (RÖHL; ROHRBERG; BUCHNER, 2013), forma também um complexo com outras proteínas para promover a ativação do receptor de glicocorticoide (GR), facilitando a interação com o cortisol, o que aumenta a exposição a ação deste hormônio, aja visto que a própria placenta é capaz de sintetizar cortisol (CLAPP et al. 1982; LORENZ et al. 2014).

O estresse térmico por calor também altera as características e compromete algumas funções placentárias (LACROIX et al. 2002; HASHIZUME et al. 2007; SILVA et al. 2021). Devido a multifuncionalidade da placenta, muitas vias metabólicas estão interligadas direta ou indiretamente para suprir a necessidade fetal, a exemplo do LP que por ser um hormônio somatogênico e lactogênico tem proximidade gênica e funções similares com a prolactina (PRL) e o hormônio do crescimento (GH), estando então, envolvido no metabolismo energético materno-fetal (BYATT et al. 1992; CEDARD, 1997; COSTA, 2016; HANDWEGER; FREEMARK, 2000; SCHOKNECHT et al. 1996). O cortisol, por sua vez, através da ligação com o GR também está envolvido na otimização da disponibilidade energética para o feto e controle da população de CBN que são responsáveis por sintetizar o LP (JENSEN et al. 2010; LÓPEZ et al. 2012; WARD; WOODING; FOWDEN, 2002). De forma que, o cortisol tem ação

regulada pela enzima  $11\beta$ - hidroxidesidrogenase tipo 2 ( $11\beta$ -HSD2) que atua como barreira enzimática na conversão do cortisol em sua forma inativa, controlando assim a exposição do feto ao cortisol materno (SUN et al., 1999). Desta forma, ao ter a função placentária comprometida seja pelo aumento na disponibilidade de cortisol, redução na síntese de LP e expressão gênica da enzima  $11\beta$ -HSD2, o estresse por calor pode comprometer também o desenvolvimento fetal (HASHIZUME et al. 2007; LACROIX et al. 2002; SILVA et al. 2021).

Entretanto, apesar dessas alterações serem observadas na placenta de forma generalizada (HASHIZUME et al. 2007; LACROIX et al. 2002; SILVA et al. 2021), a porção fetal placentária é composta por duas áreas distintas, a região cotiledonária e a região intercotiledonárias (LAWN; CHIQUOINE; AMOROSO, 1969; NGUYEN et al. 2012), que apesar de serem compostas por tipos celulares morfologicamente similares, apresentam funções especializadas (IGWEBUIKE, 2006). Desta forma, o objetivo desse estudo foi analisar os componentes envolvidos no estresse oxidativo e a expressão de genes relacionados a apoptose e função das células da região cotiledonar e intercotiledonária quando submetidas ao estresse térmico por calor

#### 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o estudo conduzido foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (CEUA, protocolo 5473220719) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) em concordância com a Lei Federal Brasileira.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), localizado em Pirassununga (21°58' S e 47°26" W), Brasil, entre os meses de Abril e Junho de 2019, com  $20,32\pm 0,09$  °C de temperatura ambiental,  $71,34\pm 0,34$  % de umidade relativa e índice de temperatura-umidade (ITU)  $67,01\pm 0,10$ , proporcionando um ambiente de conforto térmico de acordo com a classificação de ITU proposta por Silanikove e Koluman, (2015) para caprinos.

No presente estudo foram utilizadas 09 cabras da raça Saanen (*Capra hircus*) gestantes múltiparas, com  $55 \pm 12$  Kg de peso vivo, entre 2 e 4 anos de idade. A estação de monta ocorreu de forma controlada utilizando bodes Saanen. Após 40 dias do término da estação de monta, foi realizado o primeiro diagnóstico de gestação em todos os animais para confirmar a idade e número de conceptos.

As cabras experimentais foram alojadas em baias sombreadas, com acesso a água e sal mineral ad libitum e piquete com pastagem de tifton. A dieta total das cabras foi fornecida duas vezes ao dia (às 8:00h e 16:00h) na proporção 40:60% volumoso (silagem de milho e feno de *coast-cross*) e concentrado (milho e farelo de soja) de matéria seca. A quantidade e proporção de alimentos da dieta total foram calculadas em função do peso e fases gestacional de acordo com as recomendações do NRC (National Research Council, 2007), e ajustes para garantir 10% de sobras.

#### 4.2.1 Cultivo Celular

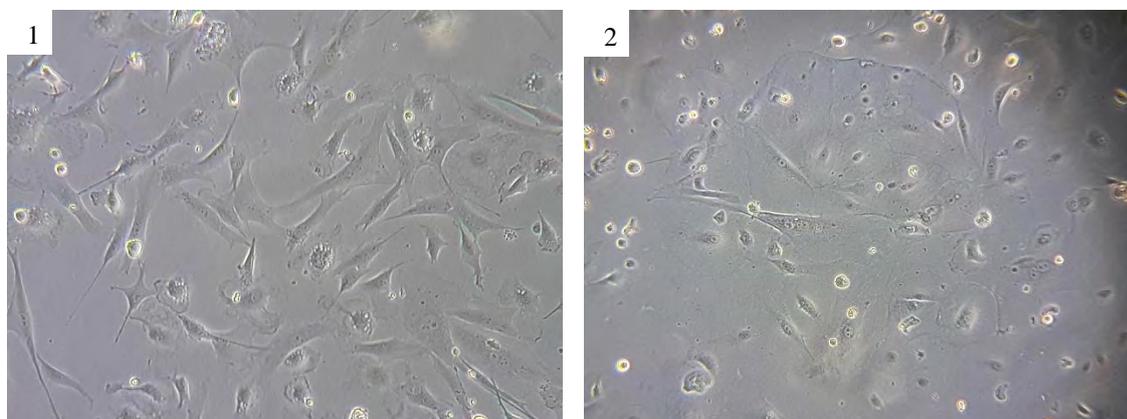
O experimento foi realizado a partir da colheita de 09 placentas de cabras que apresentaram parto simples. A colheita das placentas ocorreu imediatamente após liberação, da qual foram extraídos cotilédones e amostras da região intercotiledonária para realizar o cultivo celular para obtenção das células primárias das duas regiões de forma independente. Destas, apenas as células cotiledonárias e intercotiledonárias de 05 cabras cresceram adequadamente para gerar células primárias suficientes para realização do experimento.

Para o cultivo celular, 100mg do cotilédone e da região intercotiledonária foram dissecados individualmente com o auxílio de uma lâmina e bisturi cirúrgico em fragmentos de aproximadamente 0,1mm<sup>3</sup> e lavados com PBS a temperatura ambiente. Em seguida, 4 fragmentos de cada amostra foram pressionados em placas de 35mm (Corning® 35 mm TC-treated Culture Dish - 430165, Corning, NY, Estados Unidos) tratadas para cultivo celular. Posteriormente, foi acrescentado 1 mL de meio de cultivo celular DMEM/F12 enriquecido composto por soro fetal bovino a 20% e antimicrobianos (2,5µg/mL de Anforericina B, 100U/mL de Penicilina e 100mg/mL de Estreptomicina). Em seguida, a placa foi incubada a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e após 48h de incubação, o meio de cultivo foi descartado e acrescentado mais meio de cultura fresco.

Após o crescimento das primeiras células, as células cultivadas foram avaliadas quanto a sua morfologia (Figura 1), na qual as células provenientes do tecido cotiledonário apresentaram característica poligonais, alongadas semelhantes a fibroblastos e algumas estruturas arredondadas; já as células provenientes do tecido intercotiledonário foram observadas mais células alongadas semelhantes a fibroblastos e algumas estruturas arredondadas. O número de células também foi avaliado e apenas as amostras de 5 cabras alcançaram o número suficiente (1,0 x 10<sup>5</sup> céls/mL). A contagem foi realizada por meio do equipamento Coutess™ Automated

Cell Counter (Invotrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, as células foram criopreservadas em nitrogênio líquido até o uso.

Figura 1. Morfologia das células do cotilédone e região intercotiledonária.



1: Morfologia das células cotiledonária; 2: Morfologia das células da região intercotiledonária.

Para o início dos tratamentos térmicos foi realizado o plaqueamento das células em placas de 12 poços (Costar® 12-well Clear TC-treated Multiple Well Plates, Individually Wrapped, Sterile – 3513, Corning, NY, Estados Unidos) previamente identificadas, com utilização de 10 poços por placa, onde foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar para o restabelecimento celular.

As células provenientes dos cotilédones ou da região intercotiledonária foram independentemente submetidas aos tratamentos térmicos. Para definição das temperaturas dos tratamentos foi considerada a temperatura intrauterina que pode variar até 0,5°C acima da temperatura corporal materna (LABURN et al. 2002), sendo que em condições de estresse térmico essa diferença diminui de 0,4°C para 0,2°C (FAURIE; MITCHELL; LABURN, 2001). O controle refere-se a cultura no tempo 0 das células mantidas em temperatura de 37°C antes de iniciar o aumento de temperatura dos tratamentos (CT, n = 30 culturas celulares). No tratamento estresse térmico 38 (ET38, n = 40 culturas celulares), as células foram mantidas a 38,3°C; no tratamento estresse térmico 39 (ET39, n = 40 culturas celulares), as células foram mantidas a 39,3°C e no tratamento estresse térmico 40 (ET40, n = 40 culturas celulares), as células foram mantidas a 40,3°C, totalizando 150 culturas celulares. As células permaneceram sob as respectivas temperaturas e foram colhidas após 6, 12, 24 e 48 horas, afim de avaliar o efeito do estresse térmico ao longo do tempo.

Antes do início do tratamento térmico foram realizadas a colheita do tempo 0 (CT). Em seguida, a temperatura foi alterada dando início do tratamento. Outras amostras experimentais

foram colhidas às 6, 12, 24 e 48 horas após os diferentes tratamentos térmicos, perfazendo um total de 150 culturas realizadas. Dessas culturas foram colhidas amostras do meio de cultivo e as respectivas células cotiledonárias ou intercotiledonárias. As células foram armazenadas a -80°C e as amostras do meio de cultura foram armazenadas em freezer -20°C para análises da expressão gênica e dosagem dos componentes relacionados ao estresse oxidativo, respectivamente.

#### 4.2.2 Análises Laboratoriais

##### 4.2.2.1 Análise dos kits do perfil oxidativo

Para análise do perfil oxidativo, foram utilizadas 150 amostras de meios de cultura obtidos no cultivo celular durante todos tempos dos tratamentos térmicos. As amostras foram analisadas pela técnica de ensaio enzimático e colorimétrico utilizando os kits: Glutathione Assay Kit (código: C50260 – Sigma Aldrich), SOD Determination Kit (código: 19760 – Sigma Aldrich), Total Antioxidant Capacity Assay Kit (código: MAK 187 – Sigma Aldrich) e Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (código: MAK 085 – Sigma Aldrich), conforme as instruções do fabricante. Os coeficientes de variação do intra- e inter-ensaio foram de 5% e 8%, respectivamente

##### 4.2.2.2 Expressão gênica

Para análise de expressão gênica, foram utilizados 150 amostras provenientes dos cultivos da região cotiledonária e da região intercotiledonária e após a extração do RNA e síntese do cDNA, foram submetidas à técnica de reação de cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT) como descrito por (SILVA et al., 2021).

Para extração do RNA total das células, foi empregado o kit de extração de RNA total PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para tanto, foi realizada a lise das células na presença de isotiocianato de guanidina, um sal caotrópico capaz de proteger o RNA de RNases endógenas. Após homogeneização, foi adicionado etanol e então a amostra foi processada por meio de uma coluna contendo membrana de sílica na qual o RNA se liga.

O RNA total da amostra foi reverso-transcrito em um volume final de 20 µL empregando-se a enzima GoScript Reverse Transcriptase (Promega). Foi realizada a incubação do RNA com 0,5 µg de oligonucleotídeo oligo-dT (Promega) por 5 minutos a 70°C. Em seguida, foi

adicionado ao tubo de reação tampão 1X, 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de dNTP, 40 unidades de inibidor de RNases e 1,0 µL da enzima transcriptase reversa.

Foram executadas análises por qPCR para obtenção dos dados de expressão gênica relativa, utilizando-se o equipamento StepOnePlus® Applied Biosystem (Life Technologies, Carlsbad, CA) utilizando como marcador fluorescente o SYBR® Green (Power SYBR® Green PCR Master Mix) do cDNA sintetizado das células. Cada reação teve o volume total de 20µL. Foram utilizadas placas de 96 poços (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate) e fitas adesivas ópticas transparentes para selá-las.

A expressão dos genes constitutivos e alvos foram determinadas pelo equipamento de PCR em tempo real (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) utilizando primers da proteína de linfoma de células B-2 (Bcl-2), proteína X associada a Bcl-2 (BAX), caspase 3 (Casp3), lactogênio placentário ovino (oLP), heat shock protein 90 (HSP90), receptor de glicocorticoide (GR), enzima 11β - hidroxidesidrogenase tipo 2 (11β-HSD2) e como referência endógena, foram utilizados os genes constitutivos Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Ubiquitina (UBC). Os oligonucleotídeos iniciadores estão descritos nas tabelas 1. A eficiência do RT-PCR foi confirmada em todos os pares de primers utilizados e os produtos específicos foram verificados através da análise da curva de dissociação e da eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Tabela 1 - Sequência de primers dos genes analisados utilizando o RT-PCR.

Genes	Sequência de primers	Código no GenBank
Bax	3'ATGGGCTGGACATTGGACTT5' 5'ACTGTCTGCCATGTGGGTGT3'	NM_173894
Bcl-2	3'GATGACCGAGTATCTGAACCG5' 5'GACAGCCAGGAGAAATCAAACA3'	NM_001166486
Casp3	3'GACCATAGCAAAAAGGAGCA5' 5'CACTGTCTGTCTCAATACCAC3'	NM_001286089
oLP	3'AGCAACAACGGTGGCTAACT5' 5'GCCATACTGTTCATCAAATCTGT3'	M31660
HSP90	3'GCATTCTCAGTTCATTGGCTATCC5' 5'GTCCTTCTTCTCTTCCTCCTCTTC3'	NM_001012670.2
GR	3'CCATTCTGTTCACGGTGTG5' 5'CTGAACCGACAGGAATTGGT3'	XM_005683087

Continua

Continuação

Tabela 1 - Sequência de primers dos genes analisados utilizando o RT-PCR.

Genes	Sequência de primers	Código no GenBank
11 $\beta$ -HSD2	3'CGAGCACTTGAATGGGCAGTT5' 5'CCTGGGTAATAGCGGCGGAGT3'	AF074706.2
GAPDH	3'GGTGATGCTGGTGCTGAG5 5'TGACAATCTTGAGGGTGTG3'	AJ431207
UBC	3'ATGCAGATCTTTGTGAAGAC5' 5'CTTCTGGATGTTGTAGTC3'	NM_001206307

Bcl 2: proteína de linfoma de células B 2; BAX: proteína X associada a Bcl 2; Casp3: caspase 3; oLP: lactogênio placentário ovino; HSP 90: proteína de choque térmico 90; GR: receptor de glicocorticoide; 11 $\beta$ -HSD2: enzima 11 $\beta$  - hidroxidesidrogenase tipo 2; Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH); UBC: ubiquitina.

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

#### 4.2.3 Análise estatística

O presente estudo adotou o delineamento inteiramente casualizado. Foi realizado o teste de ANOVA pelo pacote estatístico do Statistical Analysis System (SAS, 2008). Os dados foram previamente tratados respeitando as premissas de normalidades dos resíduos pelo procedimento Shapiro-Wilk univariate do SAS e homogeneidade das variâncias.

Para análise do efeito dos tratamentos CT, ET38, ET39 e ET40, do tempo de exposição (6, 12, 24 e 48 horas) e a interação entre eles sobre a expressão gênica e os componentes envolvidos no estresse oxidativo do cultivo celular, as células obtidas dos cotilédones e região intercotiledonária foram analisadas separadamente, onde foram realizadas análises de variância usando o Proc Mixed do SAS, considerando no modelo como efeito fixo os tratamentos, o tempo de exposição (horas) e suas interações, e os animais como efeito aleatório. E para análise de comparação dos tratamentos térmicos dentro de cada hora, foi utilizado o Proc Sort. No entanto, em nenhuma das análises realizadas foi observado efeito do tempo de exposição e interação entre tratamento e tempo de exposição. Portanto, foi realizado uma análise de variância com modelo linear generalizado (GLM) para avaliação do efeito simples de tratamento. A razão Bax/Bcl-2 foi calculada para todas as amostras.

Para os efeitos que apresentaram resultados significativos nas análises de variância ( $P < 0,05$ ), foram realizadas comparações entre as médias pelo teste de Fisher quando os dados apresentaram distribuição normal. Os resultados das análises estatísticas foram apresentados neste trabalho, como média e erro padrão médio.

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Resultados das temperaturas sobre os genes relacionados a apoptose e a peroxidação lipídica.

O estresse térmico estimulou o aumento da expressão dos genes relacionados a apoptose das células cotiledonárias e intercotiledonárias e foi observada redução da peroxidação lipídica. Não houve interação tratamento e tempo de exposição.

Não houve diferença significativa para expressão gênica de caspase 3 entre os tratamentos térmicos nas culturas celulares da região cotiledonária. No entanto, houve aumento significativo da expressão gênica da caspase 3 nos tratamentos ET38 e ET40 em comparação ao CT no cultivo celular da região intercotiledonária (tabela 2).

Houve diferença significativa na expressão gênica de BAX das células cotiledonária no ET39 em comparação ao CT. No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos térmicos nas culturas celulares da região intercotiledonária (tabela 2). Não foi observada diferença significativas na expressão gênica de Bcl-2 entre os tratamentos térmicos nos cultivos celulares das regiões cotiledonares e intercotiledonares (tabela 2). Ao analisar a razão Bax/Bcl, observou-se aumento significativo da razão Bax/Bcl-2 nos tratamentos ET38 e ET40 em comparação ao CT nas amostras cotiledonária, mas não foi observada diferença entre os tratamentos térmicos nas amostras intercotiledonária (tabela 2).

Na análise de peroxidação lipídica, representado pela dosagem do malondialdeído (MDA), observou-se que nos cotilédones a maior dosagem ocorreu no ET38 com redução gradativa significativa nos tratamentos ET39 e ET40. Já nos meios de cultura da região intercotiledonária, observou-se redução significativa da dosagem de MDA apenas no ET40 (tabela 2). Quando foi feita a comparação entre os tratamentos dentro de cada hora de exposição da temperatura, observou-se o mesmo padrão na região cotiledonária e intercotiledonária, com o ET40 apresentando dosagem significativamente menor de MDA quando comparado ao ET38 independentemente do tempo de exposição (Figura 2.1).

Tabela 2 - Avaliação dos tratamentos na expressão dos genes relacionados a apoptose e dosagem de MDA no cultivo das células cotiledonária e intercotiledonárias

Item	Tratamentos				EPM	Valor de P		
	CT (n=30)	ET38 (n=40)	ET39 (n=40)	ET40 (n=40)		Trat	Hora	T*H
<i>Cotilédone</i>								
BAX	0,92 <sup>b</sup>	1,13 <sup>ab</sup>	1,34 <sup>a</sup>	1,17 <sup>ab</sup>	0,09	0,03	0,42	0,32
BCL	0,97	0,91	0,83	0,87	0,11	0,87	0,15	0,29
CASP3	1,21	0,57	0,85	1,12	0,18	0,09	0,70	0,99
Razão Bax/Bcl-2	0,79 <sup>b</sup>	1,35 <sup>a</sup>	1,25 <sup>ab</sup>	1,43 <sup>a</sup>	0,13	0,01	0,10	0,87
MDA (mmol/mL)	35,83 <sup>ab</sup>	38,53 <sup>a</sup>	34,78 <sup>b</sup>	28,20 <sup>c</sup>	0,95	<,0001	0,35	0,68
<i>Região intercotiledonária</i>								
BAX	0,99	1,32	1,16	1,04	0,11	0,2	0,33	0,90
BCL	0,49	0,52	0,42	0,41	0,04	0,28	0,002	0,40
CASP3	0,16 <sup>b</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,27 <sup>ab</sup>	0,4 <sup>a</sup>	0,04	0,001	0,56	0,96
Razão Bax/Bcl-2	2,53	2,72	2,64	2,84	0,21	0,75	0,15	0,88
MDA (mmol/mL)	33,98 <sup>a</sup>	35,21 <sup>a</sup>	31,71 <sup>a</sup>	27,52 <sup>b</sup>	1,08	<.0001	0,37	0,81

Bcl-2: proteína de linfoma de células B 2; BAX: proteína X associada a Bcl-2; Casp3: caspase 3; MDA: Malondialdeído, peroxidação lipídica.

T: efeito tratamento; H: efeito tempo de exposição (hora); T\*H: (interação tratamento e tempo de exposição (hora)) Médias marcadas com letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).

Fonte: Própria autoria

#### 4.3.2 Resultados das temperaturas sobre a expressão gênica da HSP90 e dosagem dos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos

O estresse térmico provocou o aumento da dosagem dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e aumento da expressão gênica da HSP90. Com exceção da HSP90, não houve interação tratamento e tempo de exposição.

Houve aumento gradativo significativo na expressão gênica da HSP90 dos tratamentos térmicos ET39 e ET40 em comparação ao CT tanto na região cotiledonária quanto a região intercotiledonária (tabela 3).

Não houve diferença significativa na dosagem de glutatona da cultura celular da região cotiledonária entre os tratamentos térmicos. Já nas amostras da região intercotiledonária foi observado um aumento significativo da dosagem de glutatona no tratamento ET40 em comparação ao CT (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação dos tratamentos na expressão gênica da HSP 90 e dosagem dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos das células cotiledonárias e intercotiledonárias.

Item	Tratamento				EPM	Valor de P		
	CT (n=30)	ET38 (n=40)	ET39 (n=40)	ET40 (n=40)		T	H	T*H
<i>Cotilédone</i>								
HSP 90	0,95 <sup>c</sup>	1,12 <sup>bc</sup>	1,29 <sup>b</sup>	1,91 <sup>a</sup>	0,08	<,0001	0,65	0,66
Glutaciona (µM)	6,16	6,13	6,23	6,24	0,10	0,84	0,72	0,97
SOD (%)	35,64 <sup>ab</sup>	38,89 <sup>ab</sup>	39,21 <sup>a</sup>	35,50 <sup>b</sup>	1,05	0,01	0,96	0,88
TAC (mM)	4,62 <sup>b</sup>	4,22 <sup>c</sup>	4,53 <sup>b</sup>	4,86 <sup>a</sup>	0,08	<,0001	0,63	0,88
<i>Região intercotiledonária</i>								
HSP 90	0,63 <sup>c</sup>	0,80 <sup>bc</sup>	0,86 <sup>b</sup>	1,17 <sup>a</sup>	0,05	<,0001	0,005	0,03
Glutaciona (µM)	5,82 <sup>b</sup>	6,01 <sup>ab</sup>	5,88 <sup>b</sup>	6,16 <sup>a</sup>	0,06	0,001	0,75	0,96
SOD (%)	41,45 <sup>b</sup>	41,61 <sup>b</sup>	45,51 <sup>a</sup>	43,70 <sup>ab</sup>	1,13	0,04	0,06	0,08
TAC (mM)	4,49 <sup>b</sup>	4,39 <sup>b</sup>	4,45 <sup>b</sup>	4,71 <sup>a</sup>	0,05	0,001	0,69	0,99

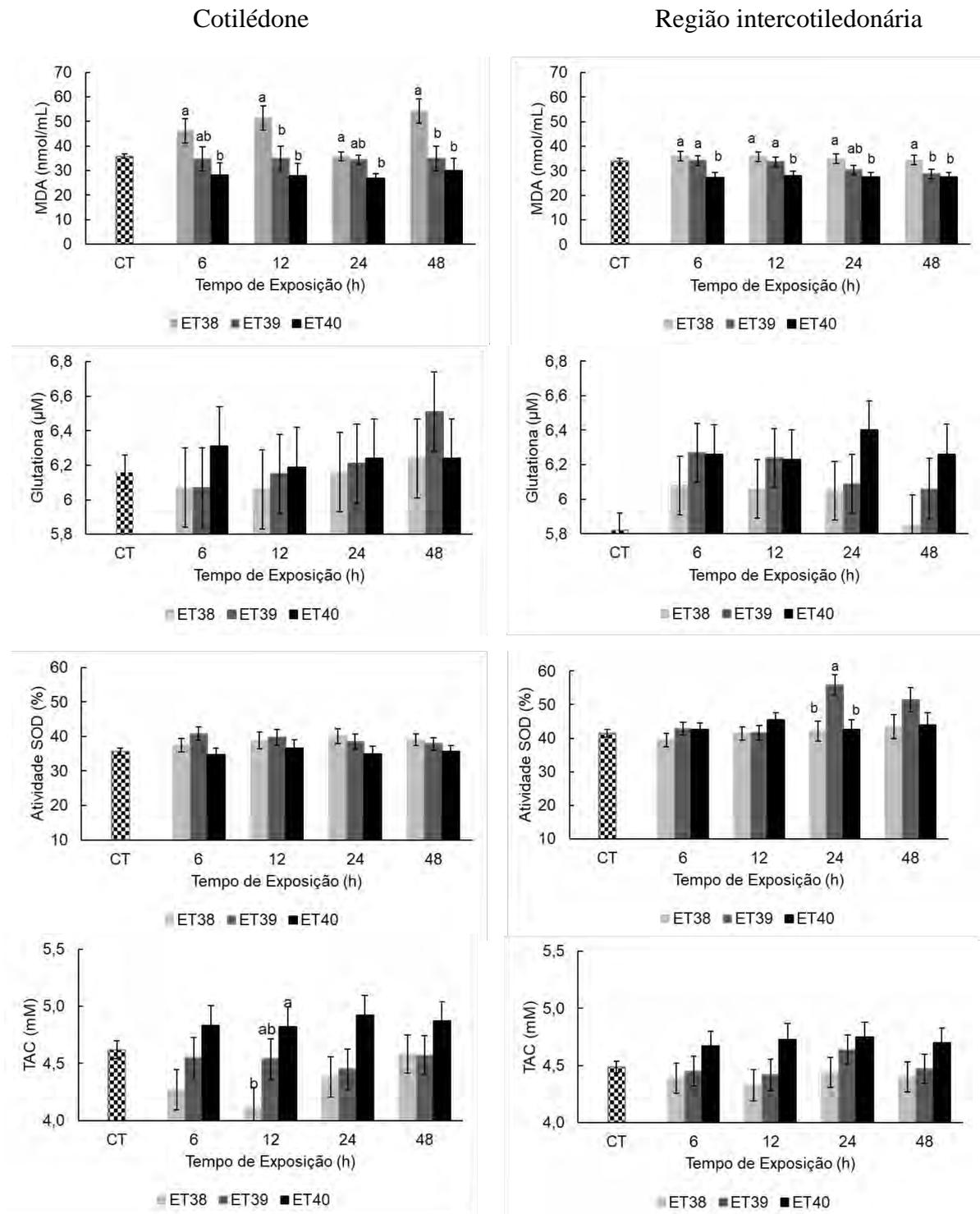
CT: controle, tempo 0 dos tratamentos térmicos; ET38: tratamento térmico a 38,3°C; ET39: tratamento térmico a 39,3°C; ET40: tratamento térmico a 40,3°C; HSP 90: proteína de choque térmico 90; SOD: Superóxido dismutase; TAC: capacidade total de antioxidantes. T: efeito tratamento; H: efeito tempo de exposição (hora); T\*H: (interação tratamento e tempo de exposição (hora)). Médias marcadas com letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Fonte: Própria autoria

Quando foi realizada a comparação entre os tratamentos térmicos dentro de cada hora de exposição, não foi observada diferença significativa entre eles nem nas amostras cotiledonária e nem intercotiledonária (Figura 2.2).

No cotilédone, a atividade da enzima antioxidante SOD nos tratamentos CT e ET38 foi estatisticamente semelhante aos tratamentos ET39 e ET40, mas foi significativamente maior no tratamento ET39 em comparação ao tratamento ET40. Já no meio de cultura das células da região intercotiledonária, a avaliação da atividade de SOD apresentou aumento significativo no tratamento ET39 em comparação ao CT e ET38 (Tabela 3). Quando foi realizada a comparação entre os tratamentos térmicos dentro de cada hora de exposição, não foi observada diferença significativa entre eles nem nas amostras cotiledonária e nem intercotiledonária (Figura 2.3).

Na análise da capacidade total antioxidante não-enzimático (TAC) (Figura 2.4), observou-se que no cultivo celular da região cotiledonária o tratamento ET38 foi significativamente menor que o CT, mas houve um aumento gradativo significativo com o elevar das temperaturas dos tratamentos ET38, ET39 e ET40 (Tabela 3). Já no cultivo celular da região cotiledonária, observou-se um aumento significativo da TAC apenas no ET40 em comparação aos demais tratamentos (CT, ET38 e ET39). Quando foi realizada a comparação entre os tratamentos térmicos dentro de cada hora de exposição, apenas nas amostras cotiledonária observou-se diferença significativa entre os tratamentos térmicos, onde às 12h de exposição o ET40 foi significativamente maior que o ET38 (Figura 2.4).

Figura 2. Comparação do perfil antioxidante e peroxidação lipídica no meio de cultura das células submetida aos tratamentos térmicos a 38,3°C, 39,3°C e 40,3°C às 6h, 12h, 24h e 48.



CT: controle, tempo 0 dos tratamentos térmicos; ET38: tratamento térmico a 38,3°C; ET39: tratamento térmico a 39,3°C; ET40: tratamento térmico a 40,3°C; SOD: Superóxido dismutase; TAC: capacidade total de antioxidantes; MDA: Malondialdeído, peroxidação lipídica.

Letras minúsculas demonstram diferença estatística significativa entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ).

Fonte: Própria autoria

### 4.3.3 Resultados das temperaturas sobre a expressão gênica do GR, 11 $\beta$ -HSD2 e LP envolvidos na função placentária

O estresse térmico modificou a expressão gênica do GR e LP, mas não alterou a expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD2, influenciando, portanto, na expressão de alguns genes envolvidos na função placentária. Não houve interação tratamento e tempo de exposição.

Não houve efeito significativo dos tratamentos térmicos sobre a expressão gênica do GR das células cotiledonárias. Na região intercotiledonária, o ET38 foi significativamente menor que os tratamentos CT, ET39 e ET40 (tabela 4).

Não houve efeito significativo dos tratamentos térmicos sobre a expressão gênica da enzima 11 $\beta$ -HSD2 nas amostras provenientes da região cotiledonária e intercotiledonária (tabela 4).

Nas amostras cotiledonárias, a expressão gênica do LP foi significativamente maior no ET38 que os tratamentos CT, ET39 e ET40. Já nas amostras da região intercotiledonária, não foi observado efeito significativo dos tratamentos térmicos sobre a expressão gênica do LP (tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação dos tratamentos na expressão dos genes envolvidos na função placentária

Genes	Tratamentos				EPM	Valor de P		
	CT (n=30)	ET38 (n=40)	ET39 (n=40)	ET40 (n=40)		T	H	T*H
<i>Cotilédone</i>								
GR	0,76	0,82	1,17	1,07	0,13	0,1	0,79	0,98
11BHSD	1,48	1,35	1,06	1,5	0,24	0,53	0,37	0,74
LP	0,05 <sup>b</sup>	1,53 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,07	<,0001	0,35	0,14
<i>Região intercotiledonária</i>								
GR	0,94 <sup>a</sup>	0,59 <sup>b</sup>	0,80 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,05	<,0001	0,82	0,77
11BHSD	1,47	1,34	1,6	1,42	0,29	0,93	0,48	0,76
LP	0,07	0,03	0,04	0,02	0,01	0,18	0,54	0,58

Bcl-2: proteína de linfoma de células B 2; BAX: proteína X associada a Bcl 2; Casp3: caspase 3; oLP: lactogênio placentário ovino; GR: receptor de glicocorticoide; 11 $\beta$ -HSD2: enzima 11 $\beta$  - hidroxidesidrogenase tipo 2.

T: efeito tratamento; H: efeito tempo de exposição (hora); T\*H: (interação tratamento e tempo de exposição (hora)) Médias marcadas com letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).

Fonte: Própria autoria

## 4.4 DISCUSSÃO

As células das regiões cotiledonar e intercotiledonária do presente estudo apresentaram variações nas expressões gênicas e na dosagem dos componentes envolvidos no oxidativo

quando cultivadas sob estresse térmico por calor. Segundo Wooding et al. (1996), as células trofoblásticas que compõem essas regiões, apesar de serem fenotipicamente semelhantes, distinguem-se entre si em sua atividade metabólica e expressão proteica.

Em nosso trabalho as células cotiledonárias e intercotiledonárias apresentaram aumento da expressão gênica da HSP90 correspondente com a intensidade da temperatura ao qual foram submetidas indicando a ocorrência da proteção celular. Desta forma, quando as células estão sob situação de estresse térmico ocorre o aumento da expressão gênica e ação destas proteínas afim de manter a estabilidade estrutural da célula diante a injúria (DANGI; GUPTA; DANGI, 2015; DANGI et al. 2016; SILVA et al. 2021). A HSP90 também tem sido associada como inibidor de apoptose (KUROP et al., 2021) por regular negativamente a atividade da caspase 3 (LIU et al. 2016), enzima envolvida na ativação de apoptose celular (CALAPRE; GRAY; ZIMAN, 2013). No entanto, em nosso experimento, apesar do aumento da expressão gênica da HSP90 no cultivo celular intercotiledonário, ocorreu também o aumento da expressão gênica da caspase 3, não sendo observado, portanto, supressão da expressão pela HSP90 (LIU et al. 2016). Enquanto no cultivo celular cotiledonário, os tratamentos térmicos induziram o aumento da expressão gênica de Bax, como observado em outros estudos (SAADELDIN et al. 2018).

Apesar dos cultivos celulares de ambas as regiões cotiledonárias e intercotiledonária terem apresentado o aumento da expressão de genes distintos, caspase 3 e Bax, respectivamente, ambos genes estão envolvidos no processo de apoptose celular (CALAPRE; GRAY; ZIMAN, 2013), indicando portanto, que o estresse térmico por calor causado pelo aumento temperatura foi o suficiente para desencadear a cascata de sinalização para o processo de apoptose destas células. Em especial no cultivo celular cotiledonário que apresentou desequilíbrio da relação Bax/Bcl-2 favorecendo a proteína pró-apoptótica Bax. Por ser uma proteína anti-apoptótica, o Bcl-2 atua na modulação da apoptose evitando que o Bax estimule o processo apoptótico aumentando a permeabilidade da membrana mitocondrial e o citocromo C seja liberado desencadeado a ativação das caspases, incluindo a caspase-3, mas para que este controle ocorra é necessário que a relação Bax/Bcl-2 esteja em equilíbrio (HEAZELL et al. 2011; LUO et al. 2016; MOLL et al. 2005; REED, 1994). No entanto, mesmo o estresse por calor estimulando o desencadeamento do processo apoptótico, em ambos os cultivos celulares a expressão gênica de Bcl-2 foi mantida, diferente do que ocorreu nas células leucocitárias (HOOPER et al. 2018) e testiculares (FAN et al. 2017), que apresentaram elevada expressão gênica de Bcl-2 quando submetidas ao estresse térmico por calor. Além disso, os danos causados na membrana mitocondrial podem alterar a concentração dos lipídios membranaís que, em associam com o

Bax formam poros protolipídicos que favorecem a liberação do citocromo C e ativação da via apoptótica (NIELSON; RUTTER, 2018).

No entanto, em nosso estudo, apesar de ser esperado aumento da peroxidação lipídica celular provocado pelo estresse térmico como observado em outros estudos (SAADELDIN et al. 2018; WAIZ et al., 2016), foi observado que tanto no cultivo celular da região cotiledonária quanto da região intercotiledonária houve menor dosagem de malondialdeído (MDA), produto resultante da peroxidação lipídica. Outros autores argumentam que o estresse térmico por calor é um fator intensificador do estresse oxidativo (WAIZ et al. 2016; LIN; DECUYPERE; BUYSE, 2006) que aumenta a síntese dos radicais livres, aumentando assim a peroxidação lipídica celular (WAWRZYKOWSKI et al. 2021) que resulta na formação de metabólitos tóxicos como o malondialdeído (KANKOFER, 2002).

Em nosso trabalho, no cultivo das células cotiledonárias, os antioxidantes não enzimáticos, representados pelos tocoferóis, carotenos, ubiquinóis e vitaminas A, C e E por exemplo, demonstram importante participação no combate as espécies reativas ao oxigênio, onde observou-se que afim de controlar o dano oxidativo causado pelo estresse térmico, houve aumento na dosagem da capacidade total de antioxidantes não enzimáticos que resultou em menor dosagem de MDA. Em contrapartida, o estresse térmico não influenciou a dosagem de glutathiona no cultivo das células cotiledonárias. No estudo realizado por Awobajo et al. (2019) a glutathiona também não apresentou diferença em embriões cultivados em estresse térmico quando comparado ao grupo controle. Esses dados nos levam a sugerir que nos cotilédones, a glutathiona é menos eficiente as injúrias causadas pelo estresse térmico, sendo os antioxidantes não enzimáticos mais eficientes na defesa dessa região. De fato, os antioxidantes não-enzimáticos compõem um grupo do sistema de defesa contra a injuria celular causada pelas espécies reativas ao oxigênio (KANKOFER, 2001) afim de manter a homeostasia e integridade celular (WAIZ et al. 2016). No entanto, poucos estudos retratam a participação dos agentes antioxidantes não enzimáticos no tecido placentário (HUNG et al. 2011; (KANKOFER, 2001; WAWRZYKOWSKI et al. 2021), sendo geralmente tratados de forma generalizada (SCHROOTS et al. 2018; TORRES-CUEVAS et al. 2017) ou evidenciando, principalmente, a ação dos antioxidantes enzimáticos como GSH-Px e SOD, por exemplo (GARREL; FOWLER; AL-GUBORY, 2010; KANKOFER; WAWRZYKOWSKI; HOEDEMAKER, 2013; ROLAND et al. 2010).

Já no cultivo das células intercotiledonárias, apenas sob intenso estresse térmico, houve elevação da dosagem da capacidade total de antioxidantes não enzimático e da glutathiona que resultou na redução da dosagem de MDA. NO entanto, no estudo realizado por Waiz et al.

(2016), foi observada elevação da GSH-Px em oócitos cultivados a temperaturas mais brandas e redução quando mantidos a 40,5°C e 41,5°C apresentando, portanto, um comportamento diferente ao encontrado em nosso estudo. Demonstrando, portanto, a variação na ação da glutatona para controle dos radicais livres quando as células estão sob estresse por calor.

Por outro lado, a enzima antioxidante SOD apresentou maior atividade no cultivo celular de ambas as regiões cotiledonária e intercotiledonária no tratamento ET39. No entanto, no cotilédone a maior atividade da SOD coincide com uma TAC moderada e redução da peroxidação lipídica, enquanto na região intercotiledonária, mesmo com elevada atividade da SOD a peroxidação lipídica continuou elevada. Apesar do antioxidante SOD estar envolvido na regulação da capacidade de tolerância ao calor (AHMED KHAN; MISHRA; JYOTIRANJAN, 2020), no tratamento ET40, que causou maior estresse térmico, no cultivo celular cotiledonário observamos uma menor atividade desta enzima, apresentando uma relação diferente entre a ocorrência da peroxidação lipídica e os agentes antioxidantes, o que nos leva a sugerir que o elevado estresse térmico induziu a maior capacidade total de antioxidantes, reduzindo a peroxidação lipídica que conseqüentemente exigiu menos da atividade da enzima SOD no combate as espécies reativas ao oxigênio. Entretanto, no cultivo celular intercotiledonário, o elevado estresse térmico exigiu ação conjunta dos antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, SOD e glutatona, para promover a redução da peroxidação lipídica celular. Estes dados nos permitem sugerir que em condições de estresse térmico, os antioxidantes não enzimáticos se tornam ferramentas essenciais no combate a ocorrência da peroxidação lipídica e proteção ao dano celular. Além disso, os agentes antioxidantes tem capacidade de atenuar a expressão das HSPs minimizando também o efeito do estresse oxidativo e melhorando a proteção celular (DANGI; GUPTA; DANGI, 2015).

O estresse térmico por calor também modificou a expressão genica do LP. Essa modificação pode ter ocorrido por causa do processo de apoptose induzido pelo estresse por calor das células cotiledonárias que culminou com a redução da expressão gênica do LP. Esses dados corroboram com um estudo *in vivo* realizado por nossa equipe que avaliou a placenta de cabras submetidas ao estresse térmico por calor e apresentou maior taxa de apoptose e redução da expressão gênica e proteica do LP (dados ainda não publicados). No entanto, apesar das células intercotiledonárias também serem capazes de sintetizar o LP (WATKINS; REDDY, 1980; WOODING et al. 1996), a temperatura não influenciou na expressão gênica desse hormônio nessas células. Por desempenhar funções somatogênicas e lactogênicas (LACROIX et al. 2002; HASHIZUME et al. 2007), a redução da concentração do lactogênio placentário pode comprometer o desenvolvimento da placenta. Por outro lado, o fato da expressão gênica

do LP nas células intercotiledonárias não ter sido influenciado pelo aumento da temperatura, evidência a importância dessa região no desempenho placentário sob condições de estresse térmico.

O receptor de glicocorticoide e a enzima 11 $\beta$ -HSD2 por sua vez, são componentes regulatórios chaves na avaliação do estresse placentário por estarem envolvidos na ligação do cortisol e na conversão desse hormônio na sua forma inativa, respectivamente (GROSS et al. 2018). Em nosso estudo, no entanto, o estresse térmico por calor não alterou a expressão gênica do GR e da enzima 11 $\beta$ -HSD2 das células cotiledonárias, mas promoveu uma redução da expressão do GR das células intercotiledonárias, apesar de ser esperado uma elevação dessa expressão, como observado no tecido placentário de cabras submetidas ao estresse térmico (SILVA et al. 2021). O que nos leva a sugerir que apesar das células placentária terem recebido estímulo para sintetizar cortisol, a menor ou manutenção da expressão gênica do GR causado pelo estresse térmico por calor reduziu ou manteve a ligação desse hormônio na membrana celular não sendo necessário aumentar a expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD2 para converter o cortisol em cortisona.

#### 4.5 CONCLUSÃO

O estresse por calor causou estresse oxidativo, aumentou a expressão de genes relacionados a apoptose e modificou a expressão lactogênio placentário. Embora, as células cotiledonárias e intercotiledonárias placentárias apresentaram diferentes perfis de resposta ao estresse térmico, o aumento da temperatura aumentou nestas células a atividade dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que controlam a peroxidação lipídica.

#### REFERÊNCIAS

AHMED KHAN, Z.; MISHRA, C.; JYOTIRANJAN, T. In silico analysis of caprine superoxide dismutase 1 (SOD1) gene. **Genomics**, v. 112, n. 1, p. 212–217, 2020.

AWOBAJO, F. O. et al. Dynamics of inflammatory reaction and oxidative stress across maternal serum, placenta and amniotic fluid in laboratory rats and the role played by genistein aglycone. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 37–45, 2019.

BYATT, J. C. et al. Ruminant placental lactogens: structure and biology. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 9, p. 2911–2923, 1992.

- CALAPRE, L.; GRAY, E. S.; ZIMAN, M. Heat stress: A risk factor for skin carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 337, n. 1, p. 35–40, 2013.
- CLAPP, J. F. et al. Ovine placental cortisol production. **Endocrinology**, v. 111, p. 1728–1730, 1982.
- COSTA, M. A. The endocrine function of human placenta : an overview. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 32, n. 1, p. 14–43, 2016.
- DANGI, S. S. et al. Modulatory effect of betaine on expression dynamics of HSPs during heat stress acclimation in goat (*Capra hircus*). **Gene**, v. 575, n. 2, p. 543–550, 2016.
- DANGI, S. S.; GUPTA, M.; DANGI, S. K. Expression of HSPs : an adaptive mechanism during long-term heat stress in goats (*Capra hircus*). **International Journal of Biometeorology**, v. 59, p. 1095–1106, 2015.
- FAN, X. et al. Germ cell apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in porcine testis under normal and heat stress conditions. **Acta Histochemica**, v. 119, n. 3, p. 198–204, 2017.
- FAURIE, a S.; MITCHELL, D.; LABURN, H. P. Feto-maternal relationships in goats during heat and cold exposure. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 2, p. 199–204, 2001.
- GARREL, C.; FOWLER, P. A.; AL-GUBORY, K. H. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. **Journal of Endocrinology**, v. 205, n. 1, p. 107–116, 2010.
- GROSS, M. et al. Placental glucocorticoid receptor and 11  $\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenase-2 recruitment indicates impact of prenatal adversity upon postnatal development in mice. **Stress**, v. 21, n. 6, p. 474–483, 2018.
- HASHIZUME, K. et al. Gene expression and maintenance of pregnancy in bovine: Roles of trophoblastic binucleate cell-specific molecules. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 79–90, 2007.
- HEAZELL, A. E. P. et al. Intra-uterine growth restriction is associated with increased apoptosis and altered expression of proteins in the p53 pathway in villous trophoblast. **Apoptosis**, v. 16, n. 2, p. 135–144, 2011.
- HOOPER, H. B. et al. Acute heat stress induces changes in physiological and cellular responses in Saanen goats. **International Journal of Biometeorology**, v. 62, n. 12, p. 2257–2265, 2018.
- HUNG, T. H. et al. The associations between labor and delivery mode and maternal and placental oxidative stress. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 144–150, 2011.
- IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placentas — A minireview. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 185–198, 2006.
- KANKOFER, M. Non-enzymatic antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine-retained and not-retained placenta: Vitamin C and glutathione.

**Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 3–4, p. 203–206, 2001.

KANKOFER, M. Placental Release / Retention in Cows and its Relation to Peroxidative Damage of Macromolecules Lipid peroxidation Protein peroxidation Proteins consisting of amino acids are susceptible to. **Reproduction in Domestic**, v. 37, p. 27–30, 2002.

KANKOFER, M.; WAWRZYKOWSKI, J.; HOEDEMAKER, M. The presence of SOD 1 and GSH-Px in bovine retained and properly released foetal membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 4, p. 699–704, 2013.

KUROP, M. K. et al. The heat shock response and small molecule regulators. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 226, p. 113846, 2021.

LABURN, H. P. et al. Effects on fetal and maternal body temperatures of exposure of pregnant ewes to heat , cold , and exercise Effects on fetal and maternal body temperatures of exposure of pregnant ewes to heat , cold , and exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 802–808, 2002.

LACROIX, M. C. et al. Placental growth hormone and lactogen production by perfused ovine placental explants: Regulation by growth hormone-releasing hormone and glucose. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 555–561, 2002.

LAWN, A. M.; CHIQUOINE, A. D.; AMOROSO, E. C. The development of the placenta in the sheep and goat : an electron microscope study. **Journal of Anatomy**, v. 3, p. 557–578, 1969.

LESLIE, K. et al. Increased Apoptosis, Altered Oxygen Signaling, and Antioxidant Defenses in First-Trimester Pregnancies with High-Resistance Uterine Artery Blood Flow. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 10, p. 2731–2741, 2015.

LIN, H.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 144, n. 1, p. 11–17, 2006.

LIU, X. et al. HSP90 inhibits apoptosis and promotes growth by regulating HIF-1 abundance in hepatocellular carcinoma. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 37, n. 3, p. 825–835, 2016.

LORENZ, O. R. et al. Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein. **Molecular Cell**, v. 53, n. 6, p. 941–953, 2014.

LUO, Z. et al. Weaning Induced Hepatic Oxidative Stress, Apoptosis, and Aminotransferases through MAPK Signaling Pathways in Piglets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

MOLL, U. M. et al. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 631–636, 2005.

NGUYEN, P. T. T. et al. Multilevel Regulation of Steroid Synthesis and Metabolism in the Bovine Placenta. **Molecular Reproduction & Development**, v. 79, p. 239–254, 2012.

- NIELSON, J. R.; RUTTER, J. P. Lipid-mediated signals that regulate mitochondrial biology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 20, p. 7517–7521, 2018.
- NRC. Nutrients Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. ed. **National Academies Press**, Washington, DC. 2007.
- REED, J. C. Bcl-2 and the Regulation of programmed cell death. **The Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 4, p. 511–516, 1994.
- RÖHL, A.; ROHRBERG, J.; BUCHNER, J. The chaperone Hsp90: Changing partners for demanding clients. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 5, p. 253–262, 2013.
- ROLAND, L. et al. Effects of Labor on Placental Expression of Superoxide Dismutases in Preeclampsia. **Placenta**, v. 31, n. 5, p. 392–400, 2010.
- SAAEELDIN, I. M. et al. Differences between the tolerance of camel oocytes and cumulus cells to acute and chronic hyperthermia. **Journal of Thermal Biology**, v. 74, n. March, p. 47–54, 2018.
- SCHOKNECHT, P. A. et al. Effect of chronic infusion of placental lactogen on ovine fetal growth in late gestation. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 13, n. 6, p. 519–528, 1996.
- SCHOOTS, M. H. et al. Oxidative stress in placental pathology. **Placenta**, v. 69, p. 153–161, 2018.
- SILANIKOVE, N.; KOLUMAN, D. N. Impact of climate change on the dairy industry in temperate zones: Predications on the overall negative impact and on the positive role of dairy goats in adaptation to earth warming. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 27–34, 2015.
- SILVA, P. S. et al. Heat stress affects the expression of key genes in the placenta, placental characteristics, and efficiency of Saanen goats and the survival and growth of their kids. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4970–4979, 2021.
- SUN, K. et al. Interconversion of Cortisol and Cortisone by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases Type 1 and 2 in the Perfused Human Placenta. **Placenta**, v. 20, n. 1, p. 13–19, 1999.
- TORRES-CUEVAS, I. et al. Redox Biology Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biology*, v. 12, n. February, p. 674–681, 2017.
- WAIZ, S. A. et al. Heat stress and antioxidant enzyme activity in bubaline (*Bubalus bubalis*) oocytes during in vitro maturation. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 9, p. 1357–1366, 2016.
- WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. The Effects of Cortisol on the Binucleate Cell Population in the Ovine Placenta During Late Gestation. **Placenta**, v. 23, p. 451–458, 2002.
- WATKINS, W. B.; REDDY, S. Ovine placental lactogen in the cotyledonary and intercotyledonary placenta of the ewe. **Reproduction**, v. 58, n. 2, p. 411–414, 1980.

WAWRZYKOWSKI, J. et al. The comparison of pro- and antioxidative parameters in plasma and placental tissues during early phase of placental development in cows. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 2, p. 1291–1297, 2021.

WOODING, F. B. P. et al. Functional specialization in the ruminant placenta: Evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. **Placenta**, v. 17, n. 1, p. 75–86, 1996.

## 5 CONCLUSÕES

Com o trabalho de pesquisa desenvolvido e apresentado foi possível comprovar a hipótese proposta de que o estresse térmico por calor causa estresse oxidativo e aumenta a taxa de apoptose na placenta, acentuando a expressão dos genes envolvidos no sistema de proteção celular e alterando o desempenho das células placentárias, que por fim, compromete o desempenho da prole.

O estresse térmico por calor tanto *in vivo* quanto *in vitro* demonstrou ser um potente indutor de apoptose celular o que influenciou na expressão gênica de proteica de importantes hormônios como o lactogênio placentário.

Com este trabalho foi possível perceber também, que a capacidade de proteção celular é surpreendente, pois mesmo sob estresse térmico e oxidativo, a mobilização dos mecanismos de proteção através do sistema de antioxidantes e HSPs ajudaram a controlar até determinado ponto, limitar a gravidade do dano celular.

Além disso, as células da região intercotiledonárias demonstraram ativa e intensa participação para manutenção do desempenho do órgão, evidenciando a essencialidade dessa área na função placentária, de forma que mais estudos precisam ser realizados para conhecer melhor a capacidade dessa região no desenvolvimento de outras funções.

Como vimos, pelo fato do estresse térmico por calor ter comprometido o desempenho placentário e isso foi refletido nos cabritos que apresentaram modificação do limiar termorregulatório, resposta ao estresse pós-natal e até o desenvolvimento, onde o cortisol materno ao qual foram expostos durante o período pré-natal influenciou na maioria das variáveis apresentadas até o desmame com 60 dias. Evidenciando que o estresse vivenciado na fase pré-natal tem impactos negativos duradouros na prole.

Por fim, devido a multifuncionalidade e complexidade da placenta, mais estudo são necessários para compreender a fisiologia desse órgão diante a diversidade dos possíveis estressores e assim podermos minimizar os impactos sobre o feto e as consequências sobre a prole na vida extrauterina.