



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MIRELA BROCHADO SOUZA CÁCERES

**ASPECTOS MOLECULARES DE OÓCITOS DE FÊMEAS
BOS INDICUS E BOS TAURUS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE TÉRMICO**

Londrina
2018

MIRELA BROCHADO SOUZA CÁCERES

**ASPECTOS MOLECULARES DE OÓCITOS DE FÊMEAS
BOS INDICUS E BOS TAURUS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE TÉRMICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Sanidade Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Melo Martins

Co-Orientadora: Prfa. Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Cáceres, Mirela Brochado Souza.

Aspectos moleculares de oócitos de fêmeas bos indicus e bos taurus submetidos ao estresse térmico / Mirela Brochado Souza Cáceres. - Londrina, 2018.
162 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Melo Martins.

Coorientador: Fabiana de Andrade Melo Sterza.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal - Tese. 2. Bovino - Reprodução - Tese. 3. Oócitos - Tese. I. Martins, Maria Isabel Melo. II. Sterza, Fabiana de Andrade Melo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . IV. Título.

MIRELA BROCHADO SOUZA CÁCERES

**ASPECTOS MOLECULARES DE OÓCITOS DE FÊMEAS BOS
INDICUS E BOS TAURUS SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Sanidade Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana de
Andrade Melo Sterza
Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul –
UEMS

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Kátia Cristina Silva Santos
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UENP

Prof. Dra. Margot Alves Nunes Dode
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– EMBRAPA

Londrina, 11 de maio de 2018.

Ao meu avô Osvaldo (*in memoriam*),
que se sentiu realizado com todos as
minha conquistas.

À Dra. Fabiana Sterza, que ofereceu
melhores oportunidades da minha vida,
exemplo de profissionalismo.

Ao meu marido, meu amor e melhor
amigo, Nícolas, meu grande
incentivador.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me dar força, fé, coragem e confiança para enfrentar todos os obstáculos encontrados pelo caminho. À Nossa Senhora por interceder sempre que foi preciso, e por ter me guiado até aqui.

À Universidade Estadual de Londrina, e a todos os funcionários e professores do curso de pós graduação em Ciência Animal, que tanto contribuíram na minha formação profissional. Principalmente, a querida Helenice que tanto me ajudou com papéis, créditos e dúvidas. Obrigada por toda sua atenção e dedicação ao seu trabalho.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – Unidade Universitária de Aquidauana e a todos os funcionários que contribuíram para que o experimento pudesse acontecer. Ao Dr. Elói Panachuki, gerente da unidade da UEMS de Aquidauana, às mulheres da limpeza, ao motorista da unidade e ao motorista do ônibus que estavam sempre dispostos quando precisávamos de ajuda, e por ter entendido minha participação junto a UEMS.

Ao Leibniz Institut, Alemanha, por ter me recebido para o doutorado sanduíche e por ter me dado todo o suporte para o aprendizado completo. Agradeço ainda as pessoas com quem trabalhei e aos amigos que fiz nesse período, Bianka, Catherina, Arpna, Shuai, Sergio, Zhara, Alex, entre outros.

À minha orientadora, querida Dra. Maria Isabel Martins, sem o seu SIM eu não poderia ter realizado todas as coisas que realizei durante o doutorado. Além disso, o seu SIM me deu a chance de fazer o doutorado em uma das melhores Universidades do país. Serei eternamente grata pela chance de conhecê-la e fazer parte da sua lista de orientados. Obrigada por ter confiado e acreditado em mim.

À minha inspiração de vida, Dra. Fabiana Sterza, obrigada por passar seus conhecimentos a mim de forma tão carinhosa e amável. Com a senhora aprendi tudo que sei até agora, e graças a senhora surgiram as melhores oportunidades da minha vida, auxiliando no meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por sempre me incentivar nas frustrações, fazendo com que eu não desanimasse. Sua dedicação ao trabalho e aquilo que ama, nos inspira a cada dia, e me faz querer, um dia, ser como a senhora. Obrigada por ser uma mãezona, e ótima orientadora.

Agradeço também a sua Família, Renato, Gabriela e Giovana, que me acolheram com todo carinho e cuidado. Dividindo o mesmo quintal, almoços e festas do pijamas. Obrigada pela amizade e compreensão de vocês todas as vezes que precisamos da sua mãe e esposa. Agradeço também aos pais do Renato, Dona Olga e seu Carlos, que me receberam em sua casa com muita alegria e carinho. Agradeço também a Dona Neuza, mãe da Dra Fabiana, que me recebeu sempre com muito carinho para os almoços e passou parte das suas tardes me fazendo companhia. A parceria da Família Melo Sterza comigo não é encontrado em qualquer lugar, e será guardado para sempre em meu coração.

À banca de qualificação, Dr. Marcelo Seneda, Dra. Kátia Silva Santos e Dr. Thales Rigo por dispor do seu tempo para engrandecer meu trabalho. Em especial ao doutores, Dr. André Luiz Julien (Splinter) que sempre estava pronto a atender, com muita paciência, ajudando nas dúvidas com protocolos e estatísticas. E a Dra. Margot Dode que desde do meu estágio final me abriu as portas e sempre está disposta a me ajudar. Obrigada doutores por serem inspiração.

Agradeço as suplentes de banca Dra. Elis Lorenzetti e Dra. Wanessa Blaschi que se dispuseram a estar presente, se necessário, na banca e engrandecer meu trabalho com suas sugestões e opiniões.

Ao Dr. Ralf Poehland por transmitir seus conhecimentos e não medir esforços em nos ajudar nos resultados. Além disso, agradeço ao Ralf e sua família, Ute e Mark, amigos que levarei para sempre no meu coração. Me acolheram tão bem na Alemanha, que nem nos melhores sonhos poderia ter imaginado. Obrigada pelos almoços de domingo, pelo almoço de Natal, e por todos as viagens e passeios que fizemos juntos. Com certeza fizeram a diferença no nosso período na Alemanha.

À Patricia Stranieri e Embryosul que nos ajudaram produzindo os meios do experimento. Além de transmitir toda a sua experiência profissional. Obrigada por todo sua atenção, conversas e paciência comigo.

Aos colegas e amigos de trabalho do GENTRA, Carol Ferreira, Jéssica, André, Christopher, Henrique, Mariane, Daniela, Giovanna, Carol Bini, Mariana Santos, Aldair, Silvio, Lucas, Willian (Bravo) e Elielton (Malícia) que me ajudaram nas aspirações, nos cálculos, com abrigo no período sem bolsa, com ajuda nos parágrafos confusos, nas comemorações e churrascos sem motivos. O meu tempo de GENTRA foi essencial para me tornar quem sou hoje, aprendi coisas boas,

além de aprender a respeitar e lidar com as diferentes personalidades. Obrigada pela parceira.

Aos colegas do Reproa que estavam sempre a disposição para ajudar e fazer com que fosse divertido estar ali. Camila Rosa, Camila Bizarro, Luiz Guilherme e Anne, obrigada pela ajuda.

À querida amiga Camila Rosa que abriu as portas da sua casa para me receber sempre que eu precisava ir pra Londrina, e se tornou especial para conversas científicas e altas risadas, sempre esteve disposta a me ajudar com documentações, nomes de bancas e várias outras coisas. E também Francine Giotto que junto com a Camila me recebeu com toda a alegria e carinho, parceria das gordices e cervejinhas. Sem vocês eu não sei até hoje como teria feito as disciplinas. Estarão guardadas sempre em meu coração.

Às meninas do apto 1004 que me recebiam sempre com um sorriso no rosto e uma boa conversa. Obrigada meninas queridas. Agradeço as novas amizades que fiz durante as disciplinas, em especial Nádia, Paula e Sintia vocês foram essenciais para a finalização do créditos. Obrigada pelas conversas e passeios no shopping.

Em especial a Janaina Menegazzo e Giovanna Ortiz, que transformaram meus dias solitários em Aquidauana, em dias mais felizes alegres e cheios de afazeres. Tantas marmitas, almoços, gordices, cervejas, desabafos, dinheiro e aparelhos da academia foram divididos. Nunca vou esquecer como essa amizade transformou meu 2017. Obrigada por tudo, por tudo mesmo.

Aos amigos Naiara Nogueira e família, Fabrício Fonseca (Taquara) e Família, e Pablo Lopes, que em 10 anos de amizade, tanto me apoiaram durante o doutorado, por comemorarem as vitórias e dividir o peso das derrotas. Amigos da faculdade pra vida. Obrigada por toda amizade e parceria.

À querida Nathalia Amarila e o mala do Cecílio Amarila, amigos, afilhados e parceiros, que mesmo de longe sempre estão presente na minha vida, vocês são irmãos que Deus me deu. Agradeço também ao nosso fofíssimo João Vicente que alegrou ainda mais nossos encontros com cada descoberta que faz da vida. E não posso deixar de dizer obrigada também, a Tia Rosane e o Tio Canever, Beatriz e João Gabriel que sempre nos recebem com carinho e alegria. Sou grata a Deus por ter a amizade dessa família linda.

À Bruna Schoroeder minha amiga de infância que acompanha meus passos e torce sempre por minha felicidade e sucesso. Obrigada amiga por fazer da parte minha vida e mesmo longe se fazer presente.

As queridas Allice Ferreira e Nayara Kussano, amigas que também fizeram e fazem pós graduação e me entendem como ninguém, essa sintonia é sensacional. Obrigada por todos os esforços em fazer essa amizade, de 1500km de distância, durar e nunca perder a empolgação. Além da amizade, me ajudam sempre que solicitadas, com assuntos tão específicos! Obrigada Meninas. À querida Ligiane Leme que com muita atenção, experiência e carinho respondeu aos meus chamados e tirou minhas dúvidas.

A minha querida amiga Fernanda Amarante que esteve presente em todas as etapas do meu caminho acadêmico. Sempre com sua ajuda e idéias incríveis me ajudou e me incentivou todas as vezes que eu queria desistir. Obrigada por sua amizade e carinho!

Ao casal Emily Palacio e Heber, amigos de longa data e compadres que estão sempre presentes nas alegrias e nas dificuldades. Só nós sabemos quantos litros de gasolina e quantos quilos de sal e carne dividimos. Além disso, nos deram o melhor presente que alguém poderia dar, nosso afilhado Luiz Henrique, ele nos trouxe alegria e muito orgulho. Obrigada pela confiança e amizade.

À Tia Augusta, Fabiana, Rosalino, Maria Sofia que nunca mediram esforços pra me ajudar. Durante a faculdade, mestrado e doutorado estiveram sempre ali, doando uma parte de vocês para eu terminar meus estudos. Obrigada por tudo que fazem por mim e por nossa família. À Tia Sandra, Tio Marco, Maria Fernanda que sempre estavam ali para me ouvir, tomar um tereré e aliviar o estresse. Obrigada pela parceria e disposição em ajudar.

Aos queridos Vó Maria, Vô Alcides (*in memorian*), Vó Carmelita e Vô Osvaldo (*in memorian*) que sempre estiveram do meu lado torcendo e rezando pela minha felicidade, e para terminar os estudos o mais rápido possível. E quando vocês pensavam que estava acabando, lá estava eu indo para mais uma etapa, mestrado e depois doutorado. Quantas passagens para Londrina e quanto dinheiro pra viagem para fazer as disciplinas vocês me deram ?! O maior sonho do seu Osvaldo era um neto fora do país e doutor (médico). Vô espero que ai do céu o senhor veja que seus sonhos estão realizados, não exatamente como o senhor sonhou (não virei médica),

mas com a mesma dedicação que o senhor tinha pelos netos. Te amarei para sempre.

À Tia Maria Ângela, Tio Vanderlei, Giulia, Guilherme pelas orações, apoio, confiança, incentivo e carinho durante toda a minha vida. Obrigada por toda a empolgação e empenho em me ajudar, nunca medindo esforços para tal. Obrigada. Amo vocês! Ao Tio Washington que tanto me ajudou financeiramente e com seu apoio. Obrigada Tio!

Aos queridos Tia Dade, Tio Antônio, Caroline Moreira (cunhada), Tio Ademar e Tia Alice que sempre estiveram por perto. Acompanharam todo o sofrido pra chegar até aqui, me dando forças e segurando minha mão. Me ajudando a cada mudança de cidade ou casa. Obrigada.

À minha querida sogra Dona Mariza, aos meus cunhados Douglas e Katlle, Mike e Greissiele, e ao João Miguel meu sobrinho, vocês foram essenciais na fase sem bolsa do doutorado. Obrigada por me acolherem na casa de vocês com todo carinho e amor, aturando minhas chatices e ainda assim me fazendo ser parte da família. Obrigada também a toda a família Cáceres que me acolheu com carinho e amor.

À Cristina Gomide que sempre esteve ali para dar força e para me ajudar a continuar e seguir em frente. Acompanhou todo o período de sofrimento e felicidade da faculdade, do mestrado e do doutorado, se tornou parte da família e uma grande parceira de tereré. Te Amo!

Aos meus pais, Aparecida Márcia e Pedro Lucio, por todo o amor, carinho e dedicação, pelo incentivo nos momentos bons e difíceis da vida. Por sempre me passarem a confiança de que tudo vai dar certo, me ensinando e participando da minha vida profissional. Muito obrigada, amo vocês incondicionalmente!

Ao meu irmão e médico veterinário João Pedro, pela amizade, parceria e apoio, pelas conversas todos os dias, o dia todo. Obrigada por me ajudar com sua opinião profissional. Você é tudo pra mim. Obrigada por estar sempre ao meu lado e fazer parte de todas as etapas da minha vida. Te amo!

Ao Níkolos Cáceres meu marido, namorado, melhor amigo e parceiro! Só nós dois sabemos tudo que passamos desde que eu resolvi começar esse doutorado. Morar com a mãe, morar com a sogra, morar de favor, não ter nossa casa, não foi fácil e você segurou todas as pontas. Largou tudo e foi atrás de

mim na Alemanha, aliás nosso melhor momento em todo esse doutorado. Obrigado por ser a razão dessa dupla, por ser tão correto, humilde e inteligente. Obrigada pelo amor, companheirismo, apoio, parceria e amizade. Obrigada por me fazer ser uma pessoa melhor. Obrigada por incentivar e me animar todas as vezes que eu queria desistir. Se hoje estou aqui prestes a defender esse doutorado foi porque você não me deixou desistir. Obrigada por suportar a distância e minha ausência quando necessária. Obrigada por estar sempre ao meu lado. TE AMO!

Aos meus animais Fusca, Belina, Cacau e Lola que nunca me abandonam ou deixam sozinha, transmitindo o amor mais puro e sincero.

A todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram durante esse período. Foram dias de alegria, tristezas, conhecimentos, saudades, privações e trabalho, que jamais serão esquecidos por toda a vida.

Obrigada!

"Porque todo aquele que se exaltar
será humilhado, e todo aquele que se
humilhar será exaltado"

Lucas 14:11

"Nunca se ouviu dizer que alguém
tenha feito um pedido a Nossa Senhora
e não tenha sido atendido"

Pe. Juarez de Castro

"Faça o melhor que puder. Seja o
melhor que puder. O resultado virá na
mesma proporção de seu esforço"

Mahatma Gandhi

CÁCERES, Mirela Brochado Souza. **Aspectos moleculares de oócitos de fêmeas bos indicus e bos taurus submetidos ao estresse térmico**. 2018. 162 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a influência do estresse térmico sobre a competência oocitária, bem como sobre parâmetros fisiológicos de fêmeas bovinas de diferentes raças, foram realizados três experimentos. No experimento I, foram avaliados complexo *cumulus-oócitos* (COCs) de vacas da raça Simental maturados *in vitro* em diferentes temperaturas (37°C, 38,5°C ou 40°C). Antes da maturação, os oócitos foram corados com Brilhante Cresilblue (BCB) e, classificados em BCB+ e BCB-. Os COCs marcados (BCB+) eram considerados de melhor qualidade. Após a maturação, foram produzidos embriões *in vitro* e os oócitos foram avaliados através de PCR em tempo real e imunofluorescência, para avaliação das sirtuínas, BCL11A e p53. A alteração da temperatura ($\pm 1,5^\circ\text{C}$) de maturação do oócito afetou negativamente a taxa de blastocisto após a fertilização *in vitro*, além de influenciar a expressão de genes importantes para a proteção celular. A expressão dos genes SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5, BCL11a e p53 foi alterada pela temperatura de maturação, em oócitos e células da granulosa. No experimento II foram avaliados complexo *cumulus-oócitos* (COCs) de fêmeas da raça Nelore (*Bos Taurus indicus*) maturados *in vitro* em diferentes temperaturas (37°C, 38,5°C e 40°C). Após esse período parte dos COCs foram submetidos a fecundação e cultivo dos embriões e a outra parte, após determinação da taxa de maturação, foram fixados em paraformoldeído para análise de HSP70 e HSP90 por western blott. O estresse térmico não influenciou a taxa de maturação nuclear dos oócitos, porém influenciou a taxa de clivagem e de blastocisto. A intensidade do sinal da HSP70 foi aumentado nos oócitos submetidos a estresse, em relação ao grupo controle, além disso as células *cumulus* mostraram um aumento significativo da intensidade de sinal dessa proteína à 40°C. A HSP90 mostrou maior quantidade em oócitos maturados à 37°C, porém se mantendo estável nas demais temperaturas. A menor taxa de blastocistos e a ação paralela das HSP's demonstram que a produção *in vitro* de embriões é afetada quando a maturação *in vitro* ocorre em situações de estresse crônico (24 hs de MIV; 37°C e 40°C). E no experimento III foram avaliados complexos oócitos-*cumulus* (COCs) recuperados através da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU), de vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* (Girolando) e *Bos taurus* (Pantaneira). Parte dos COCs viáveis foram submetidos a análise de imunofluorescência sob microscopia confocal para identificação das proteínas HSP70 e HSP90. Antes da realização de cada OPU, foi aferida a temperatura retal (TR) e frequência respiratória (FR) de cada animal. O estresse térmico foi estimado pelo Índice de Temperatura do Globo e Umidade (ITGU) que foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Buffington et al. (1981) e classificados de acordo com o National Weather Service, 90 dias antes de cada OPU. A rusticidade das raças Girolando e Pantaneira pode ser confirmada pela manutenção da TR e FR em níveis fisiológicos em ITGUs de até 94. A HSP nos oócitos foi influenciada pelo ITGUs para as duas raças, porém com comportamentos contrários. No entanto, a raça Pantaneira sofreu efeitos negativos em ITGUs <78 demonstrando estresse em

temperaturas mais amenas. Por outro lado, observa-se que ITGUs >78 apresentam efeito deletério na qualidade do oócitos de vacas Girolando. Aparentemente a raça Pantaneira reage negativamente em temperaturas mais baixas, já que apresentou menor viabilidade oocitária com ITGUs <78. Por outro lado observa-se que ITGUs de >79 aos 90 dias antes da OPU apresentam um efeito deletério na qualidade do oócitos de vacas Girolando.

Palavras-chave: Girolando. Heat Shock protein (HSP). ITGU. Nelore. Pantaneira. Simmental. Sirtuínas. Viabilidade oocitária.

CÁCERES, Mirela Brochado Souza. **Molecular aspects of gametes and embryos submitted to thermal stress**. 2018. 162 p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Aiming to evaluate the effects of in vivo and in vitro thermal stress on oocyte competence and early embryonic development as well as on physiological parameters of cows of different breeds, they were conducted three experiments. In the experiment I, the cumulus-oocyte complex (COCs) of Simmental cows matured in vitro at different temperatures (37°C, 38.5°C and 40°C) were evaluated. Before maturation the oocytes were stained with Brilliant Cresilblue (BCB) and then categorized according to staining in BCB + and BCB-. The labeled COCs (BCB +) were considered to be of better quality. After maturation, embryos were produced in vitro and oocytes were evaluated by real-time PCR and immunofluorescence, for the evaluation of sirtuins, BCL11A and p53. The change in temperature ($\pm 1,5^{\circ}\text{C}$) of oocyte maturation adversely affects the blastocyst rate after in vitro fertilization, in addition to influencing gene expression important for cell protection. Expression of the SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5, BCL11a and p53 genes were influenced by the maturation temperature in oocytes and granulosa cells. In the experiment II, cumulus-oocyte complexes (COCs) of Nellore (*Bos Taurus indicus*) females were evaluated in vitro at different temperatures (37°C, 38,5°C and 40°C). After this period part of the COCs were submitted to embryo fertilization and culture and the other part, after determining the maturation rate, were fixed in paraformoldeído for analysis of HSP70 and HSP90 by western blot. Thermal stress did not influence the maturation rate of oocytes, but influenced the rate of cleavage and blastocyst. The signal intensity of HSP70 was increased in stressed oocytes compared to the control group, and cumulus cells showed a significant increase in the signal intensity of this protein at 40°C. HSP90 showed higher numbers in oocytes matured at 37 ° C, but remained stable in the other temperatures. The lower rate of blastocysts and the parallel action of HSPs demonstrate that the in vitro production of embryos is affected when in vitro maturation occurs in situations of chronic stress (24 hours of IVM) by cold and heat. In the experiment III, cumulative oocytes (COCs) recovered through ultrasound-guided follicular aspiration (OPU), *Bos taurus* x *Bos indicus* (Girolando) and *Bos taurus* (Pantaneira) cows were evaluated. Part of the viable COCs were submitted to immunofluorescence analysis under confocal microscopy for identification of HSP70 and HSP90 proteins. Before each OPU, the rectal temperature (RT) and respiratory frequency (RF) of each animal were measured. Thermal stress was estimated by the Black Globe Humidity Index (BGHI) which was calculated according to the formula described by Buffington et al. (1981) classified according to the National Weather Service, 90 days before each OPU. The rusticity of the Girolando and Pantaneira breeds can be confirmed by the maintenance of the RT and RF in physiological levels in BGHIs of up to 94. The HSP in the oocytes was influenced by the BGHIs for both breeds, but with opposite behaviors. However, the Pantaneira breed had

negative effects on BGHIs <78 demonstrating stress at warmer temperatures. On the other hand, it is observed that BGHIs >78 have a deleterious effect on the quality of Girolando cow oocytes. It appears that the Pantaneira breed reacts negatively at lower temperatures, since it presented lower oocyte viability with BGHI <78. On the other hand it is observed that ITGUs of > 79 at 90 days before OPU have a deleterious effect on the quality of Girolando cow oocytes.

Key words: BGHI. Girolando. Heat stress. HSP. Immunofluorescence. Nelore. Oocyte viability. Simmental. Sirtuins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

- Figura 1** - Figura esquemática representando o crescimento folicular desde o folículo primordial até a ovulação e sua relação com hormônios e fatores de crescimento em cada fase do desenvolvimento (Webb et al. 2004).....31
- Figura 2** - Regulação e mecanismo de ação das proteínas do choque térmico (HSPs). Adaptado de Tomanek and Somero (2002).35
- Figura 3** - Esquema do mecanismo de ação das proteínas do choque térmico (HSPs) (Wang et al. 2004).....37

Artigo I

- Figure 1** - Transcripts of SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5, BCL11a and p53 genes in relation to the house keeping gene RPS18 measured with rtPCR in samples of 30 purified Oocytes (3 repeats) depending on maturation temperature and BCB staining. Different uppercases or lowercases indicate significant differences.....63
- Figure 2** - Transcripts of SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT, BCL11a and p53 genes in relation to the house keeping gene RPS18 measured with rtPCR in samples of cumulus cells recovered from 30 COCs (3 repeats) depending on maturation temperature and BCB staining. Different uppercases or lowercases indicate significant differences.....65
- Figure 3** - Examples of confocal microscopic images of immunofluorescence stained COCs after maturation at 37 °C (1), 38.5 °C (2) and 40 °C (3). The stained proteins are Sirt1 (A), Sirt2 (B), BCL11a (C) and p53 (D) in red, nuclear counter staining in green. Row 4 display unspecific control66

Figure 4 - Densitometric evaluation (mean channels & SD; n = 10 / group) of confocal microscopic images of immunofluorescence stained COCs from Simental breed after maturation at 37°C, 38.5°C, and 40°C. The stained proteins are Sirt1, Sirt2, BCL11a and p53. Different uppercases or lowercases indicate significant differences (P<0.05)..... 67

Artigo II

Figure 1 - Results of Western blotting for HSP70 and HSP90 in oocytes and cumulus cells after maturation of COCs recovered 37 °C, 38.5 °C, and 40 °C. Examples are shown on top site with exposure time for 2 min. Quantitative evaluation are represented by the diagrams (mean & SD; 3 biological repeats. Different uppercases or lowercases indicate significant differences (p<0.05).....79

Artigo III

Figure 1 - Climatic profile from October/2013 to November/2014, in the region of brazilian high wetland. The temperature data (T, in °C) and relative humidity (RH, in%) were obtained from the UEMS / Inmet meteorological station. The BGHI was calculated according to the formula proposed by Buffington et al. [2]92

Figure 2 - Profile of BGHI in each OPU session, from October/2013 to November/2014, in the brazilian high wetland region. 90, 60, 30 and 7 days before the OPU session and the day of the OPU session. The BGHI was calculated according to the formula proposed by Buffington et al. [2].....93

Figure 3 - Regression analysis of the viability rate of Crossbred milk cows (p=0.0291) in relation to the BGHI of 90 days before the OPUs were performed94

Figure 4 - Regression analysis of the respiratory frequency of Crossbred milk cows (p=0.0103) in relation to BGHI of OPU day95

Figure 5 - Confocal microscopic images of COCs of Crossbred milk cows and Adapted Bos taurus taurus cows marked by immunofluorescence, according to BGHI, cold (BGHI<80) and heat (BGHI>80). Red stained proteins, HSP70 and HSP90, and DNA marking in green	96
Figure 6 - Graphic representation of the signal intensity of HSPs 70 and 90 of oocytes of adapted Bos taurus taurus and Crossbred milk cows when BGHI<80 or BGHI> 80	97
Figure 7 - Regression analysis of the signal intensity of HSP70 from Crossbred milk cows (p=0.048) and adapted Bos taurus taurus (p=<.0001) animals in relation to the BGHI of the OPU day	98

LISTA DE TABELA

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Principais características das sirtuínas de mamíferos, adaptado de Pereira (2016).	40
--	----

Artigo I

Table 1 - Primer sequences used for rtPCR.....	58
Table 2 - Antibodies and dilutions of antibodies used for western blotting and immunofluorescence staining (more information: ABIN: Antibodies-Online, CST: CellSignaling Technology, A: Invitrogene / Thermo Fisher Scientific).....	59
Table 3 - Maturation success: percentage of oocytes with excluded first polar body after 24 hrs depending on maturation temperature and BCB staining.....	60
Table 4 - Number and percentage of blastocysts obtained from in vitro fertilized oocytes (Simmental) matured at different temperatures (24 hrs; 37°C, 38.5°C and 40°C).....	61

Artigo II

Table 1 - Maturation rate (%), cleavage rate (%) and blastocyst rate (%) of Nellore cow oocytes, submitted to in vitro maturation at different temperatures (37, 38,5 e 40°C).....	78
---	----

Artigo III

Table 1 - Oocyte viability rate of Crossbred milk cows and Adapted Bos taurus Taurus cows 90 days before OPU, when BGHI was <80 or > 80.....	93
Table 2 - Rectal temperature (RT) and Respiratory frequency (RF) of adapted Bos taurus taurus and Crossbred milk cows in relation to BGHI of OPU day when BGHI was >80 or <80	94
Table 1 - Oocyte viability rate of Girolando and Pantaneira cows in different climatic conditions 90 days before OPU	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosinatrifosfatases
COC	Complexo oócito-cumulus
CTR	Carga térmica radiante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ETC	Estresse térmico calórico
FIV	Fertilização in vitro
FR	Frequência respiratória
FSH	Hormônio folículo estimulante
HDAC	Histona deacetilase
HSE	Elemento de choque térmico
HSF1	Fator de choque térmico I
HSP	Proteínas do choque térmico
HSR	Resposta ao choque térmico
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
ITGU	Índice de temperatura do globo e umidade
ITU	Índice de temperatura e umidade
LH	Hormônio luteinizante
MIV	Maturação in vitro
mRNA	RNA mensageiro
NUBOPAN	Núcleo de Bovinos Pantaneiros
OPU	Aspiração folicular guiada por ultrassonografia
PIVE	Produção in vitro de embriões
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SIRT	Sirtuínas
TGN	Temperatura do globo negro
TPO	Temperatura do ponto de orvalho
TR	Temperatura retal
ZTC	Zona de conforto térmico

SUMÁRIO

1			
2			
3	1.	INTRODUÇÃO	21
4			
5	2.	REVISÃO DE LITERATURA	23
6	2.1.	ESTRESSE TÉRMICO EM BOVINOS	23
7	2.2.	ESTRESSE TÉRMICO EM DIFERENTES RAÇAS BOVINAS	25
8	2.3.	EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE A REPRODUÇÃO DE	
9		FÊMEAS BOVINAS	28
10	2.3.1.	<i>CICLO ESTRAL</i>	28
11	2.3.2.	<i>OÓCITOS E EMBRIÕES</i>	29
12	2.4.	FISIOLOGIA DO ESTRESSE TÉRMICO	32
13	2.5.	RESPOSTA MOLECULAR AO ESTRESSE.....	33
14	2.5.1.	<i>HSP70 E HSP90</i>	33
15	2.5.2.	<i>SIRTUÍNAS</i>	39
16	2.5.3.	<i>OUTRAS PROTEÍNAS (BCL11A e P53)</i>	41
17			
18		REFERÊNCIAS	43
19			
20	3.	HIPÓTESE	53
21			
22	4.	OBJETIVOS	54
23	4.1.	OBJETIVO GERAL.....	54
24	4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
25			
26	5.	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	55
27	5.1.	ARTIGO 1 - MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT	55
28		<i>Introduction</i>	56
29		<i>Material and Methods</i>	57
30		<i>Results</i>	61
31		<i>Discussion</i>	68
32		<i>Bibliographic references</i>	72

1	5.2.	ARTIGO 2 - REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT	75
2		Abstract	75
3		Introduction	75
4		Material and Methods	76
5		Results	78
6		Discussion	79
7		Bibliographic references	83
8	5.3.	ARTIGO 3 - THERIOGENOLOGY	88
9		Abstract	88
10		1. Introduction	88
11		2. Material and methods	90
12		3. Results	92
13		4. Discussion	99
14		5. Bibliographic references	103
15			
16	6.	DISCUSSÃO GERAL	107
17			
18	7.	CONCLUSÕES	110
19			
20	8.	ANEXOS	111

1. INTRODUÇÃO

O estresse térmico calórico (ETC) faz com que bovinos reduzam o consumo de alimentos, fato que prejudica o seu crescimento, desempenho produtivo e reprodutivo (Brown-Brandl *et al.*, 2005). Nesse sentido, o ETC está associado à mortalidade embrionária precoce (Edwards *et al.*, 2005), queda na taxa de concepção (García-Ispuerto *et al.*, 2007), alterações de hormônios esteroides (Wolfenson *et al.*, 2000; Jasnic *et al.*, 2010), mudanças nos padrões de ondas foliculares e alterações fisiológicas e moleculares de oócitos (Zeron *et al.*, 2001; Torres-Junior *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011).

Diante do estresse térmico, os animais podem reagir de diferentes formas. Sabe-se que o modo de defesa molecular contra o estresse térmico de oócitos e embriões baseia-se na ativação de proteínas com função de recuperação do DNA danificado devido ao estresse, entre elas sirtuínas e as heat shock proteins (HSPs) (Michan e Sinclair, 2007; Chen *et al.*, 2015). As sirtuínas são fundamentais para algumas funções celulares, como deacetilação de histonas, acetilação e deacetilação de proteínas, causando alterações no metabolismo (Chen *et al.*, 2015). Essas proteínas, apresentam outras funções (funções antioxidante, atuação mitocondrial, apoptose etc) além de participar do processo de reparação de danos no DNA (Nakagawa e Guarente, 2011). Além disso, as sirtuínas podem atuar como um interruptor entre o metabolismo energético e outras vias de sinalização para processos fisiológicos específicos das células (Singh *et al.*, 2017).

As sirtuínas Sirt1 e Sirt2 são distribuídas principalmente no citoplasma e estão envolvidas na regulação da expressão de enzimas e genes que regulam as deacetilases e outras; as sirtuínas Sirt3 e Sirt5 estão localizadas nas mitocôndrias e ligadas diretamente ao metabolismo energético (Bai e Zhang, 2016; Grabowska *et al.*, 2017). No entanto, pouco se sabe neste contexto o seu envolvimento com a reprodução de fêmea (Tatone e Di Emidio, 2015a). Considerando sua ligação com o processo de apoptose e reparo do DNA, é provável que exista uma relação entre sirtuínas nos complexos cumulus-oócitos (COC) e a resposta à adaptação ao calor em fêmeas bovinas. A apoptose e o reparo eficiente do DNA podem afetar a qualidade dos oócitos, especialmente a competência e o desenvolvimento de embriões após a fertilização *in vitro* (FIV).

1 As HSPs são conhecidas principalmente pela proteção contra o
2 estresse térmico agudo em nível celular, através da sua função chaperona
3 (Maloyan *et al.*, 1999; Daugaard *et al.*, 2007) e que são divididas em diferentes
4 grupos de acordo com o tamanho molecular (Romanucci *et al.*, 2006; Beachy *et*
5 *al.*, 2007). Em particular, a HSP70 e HSP90 são interessantes porque, além de
6 sua atividade complementar, elas também estão envolvidas em circuitos de
7 controle com Sirt1 e, portanto, modulam a atividade gênica dentro da resposta
8 ao estresse (Westerheide *et al.*, 2009).

9 Outro fator importante é que animais *B. taurus indicus* são
10 considerados mais termotolerantes, no entanto podem sofrer injúrias na
11 produção e reprodução diante do estresse térmico (Paula-Lopes *et al.*, 2003).
12 Desta forma a escolha de raças mais adaptadas às regiões de clima quente tem
13 sido uma alternativa para manejar os efeitos de estresse térmico calórico (ETC)
14 sobre a produção animal. As raças Girolando, Pantaneira e Nelore se enquadram
15 nessa categoria. Nesse sentido, acredita-se que as raças criadas sob diferentes
16 condições climáticas reagem de forma diferente ao estresse por calor. Diante
17 disso, procurou-se investigar as proteínas HSP70, HSP90 e Sirtuínas em COCs
18 maturados *in vitro* em diferentes temperaturas de fêmeas da raça Simental e
19 Nelore e em oócitos, obtidos por OPU, de fêmeas da raça Girolando e
20 Pantaneira. Ainda buscou-se investigar os efeitos fisiológicos dos animais
21 estudados na dependência do nível de estresse causado pelo ambiente.

22

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ESTRESSE TÉRMICO EM BOVINOS

O clima é um dos componentes ambientais que exerce maior influência sobre o bem-estar animal (Pereira, 2005), influenciando negativamente na sanidade, reprodução e produção de leite (Sartori *et al.*, 2002; Bilby *et al.*, 2009). O estresse térmico é definido como ação dos componentes do ambiente térmico sobre um organismo, causando nele uma reação fisiológica e a capacidade do organismo em compensar os desvios causados pela ambiente, ou seja, resistência (Silva, 2000). O conhecimento da interação entre os animais e o ambiente é fundamental para a análise crítica, e consequentes decisões quanto à estratégias de manejo a serem utilizadas para maximizar as respostas produtivas do rebanho (Ferreira *et al.*, 2009).

Animais homeotérmicos, como os mamíferos, possuem uma zona de termoneutralidade, isto é, uma faixa de temperatura em que o animal não precisa produzir ou perder temperatura corporal e seu metabolismo é mínimo, para manter seu conforto térmico, expressando assim o máximo do seu potencial genético (Silanikove, 2000). Foi definido um limite de zona de conforto térmico (ZCT) entre -1 e 16°C para bovinos europeus adultos e entre 10 e 27°C para zebuínos adultos (Baêta e Souza, 1997). A capacidade de homeotermia dos animais tem sido avaliada fisiologicamente por alterações da temperatura retal e das frequências cardíaca e respiratória, segundo esses dados é possível explicar se a tentativa do animal em perder e absorver calor está sendo eficiente (Azevedo *et al.*, 2005). O estado fisiológico em que se encontram os animais, como a lactação, também influenciam a capacidade do animal realizar adequadamente a termorregulação (Azevedo e Alves, 2009).

Nas regiões de clima tropical, as raças de origem europeia possuem grandes problemas na adaptação ao clima, sofrendo alterações fisiológicas e comportamentais causadas pelo estresse térmico (Silva *et al.*, 2002). Estudos já relataram a influência do aumento da temperatura do trato genital feminino, devido ao ETC, sobre a mortalidade embrionária precoce (Edwards e Hansen, 1997). Garcia-Ispuerto *et al.* (2007) observaram que animais que sofreram estresse térmico calórico no período pré-inseminação apresentaram queda na

1 taxa de concepção de 11,4% comparado com o período de temperaturas
2 amenas.

3 Vacas de alta produção leiteira são consideradas termossensíveis,
4 quando manejadas em condições de estresse térmico reduzem o consumo de
5 matéria seca e como consequência observam-se perdas produtivas e
6 reprodutivas. Porém, animais tidos como termotolerantes, como é o caso de
7 animais zebuínos, também sofrem perdas reprodutivas como consequência do
8 ETC, mas são perdas menos evidentes, comparadas aos taurinos (Paula-Lopes
9 *et al.*, 2003).

10 Altas temperaturas combinadas com alta umidade do ar, podem
11 prejudicar a capacidade de dissipação do calor para o ambiente, e isso pode
12 provocar diminuição da produção. O Índice de Temperatura e Umidade (ITU) foi
13 desenvolvido para medir o nível de estresse promovido pelo ambiente
14 combinando temperatura ambiente e umidade. Esse índice foi amplamente
15 utilizado para avaliar o ambiente térmico no qual o animal está inserido (Silva,
16 2000; Bohmanova *et al.*, 2007). Entretanto outros fatores, como velocidade do
17 vento, radiação, entre outros influenciam a sensação térmica (Collier *et al.*, 2006;
18 Dikmen e Hansen, 2009). Animais criados em campo aberto sofrem grande
19 influência da radiação solar, e assim a utilização do ITU pode não ser o melhor
20 índice para a avaliação do ambiente em que esses animais são criados (Silva,
21 2000). Devido a isso, desenvolveu-se o Índice de Temperatura de Globo e
22 Umidade (ITGU) (Buffington *et al.*, 1981), que a princípio foi elaborado para
23 vacas leiteiras criadas a pasto, e posteriormente utilizado na avaliação do
24 ambiente térmico de outros animais de produção. O ITGU é baseado na
25 associação das medidas da temperatura de globo negro (TNG) e temperatura do
26 ponto de orvalho (TPO). A equação sugerida foi: $ITGU = Tgn + (0,36 \times Tpo) +$
27 $41,5$; em que: Tgn é a temperatura do globo negro (°C), e o Tpo é a temperatura
28 do ponto de orvalho (°C) (Buffington *et al.*, 1981).

29 A TNG indica a combinação da energia radiante, temperatura do ar e
30 velocidade do vento, e a forma de obtê-la é por meio de um globo negro, que
31 consiste em uma esfera oca de cobre, com aproximadamente 0,15m de diâmetro
32 e pintada de preto fosco para maximizar a absorção da radiação solar, e em seu
33 interior é posicionado um termômetro para a leitura da temperatura (Kadzere *et*
34 *al.*, 2002). A esfera de cobre possui um alto custo, diante disso, na área da

1 bioclimatologia, tem-se buscado materiais alternativos de baixo custo, como
2 isopor, que apresenta resultados semelhantes e satisfatórios, com alto valor de
3 correlação (Souza *et al.*, 2002).

4 Uma desvantagem do uso do ITGU para o diagnóstico bioclimático de
5 uma determinada região é a inexistência de medições da temperatura de globo
6 negro nas estações meteorológicas distribuídas ao longo do país (Yanagi Junior,
7 2006). Dessa forma, foi proposta uma equação para estimar a temperatura de
8 globo negro a partir da temperatura do bulbo seco, para animais criados ao ar
9 livre, possibilitando calcular a TGN com um bom índice de confiabilidade (Abreu
10 *et al.*, 2011).

11 Os valores obtidos a partir da equação de ITGU são comumente
12 classificados no modelo definido pelo National Weather Service (Nwscr, 1976) e
13 confirmado por Baêta (Baêta, 1985) onde: em situação de conforto o ITGU atinge
14 valor até 74, em situação de alerta de 75 a 78, em situação de perigo de 79 a 84
15 e em situação crítica ultrapassa 84. No entanto, esses valores devem ser
16 analisados com cuidado, pois foi definido principalmente para a raça Holandesa.
17 Na literatura ainda são escassos os dados que associam o ITGU crítico para
18 bovinos de diferentes raças, tornando-se necessária a busca do entendimento e
19 relação desse índice para raças específicas criadas no Brasil.

20 Diante da sensibilidade dos animais ao estresse térmico e a
21 manutenção dessa situação estressora em regiões tropicais, as biotecnologias
22 da reprodução podem possibilitar a utilização dos embriões no melhor momento
23 possível, quando o clima está favorável ao bem-estar das receptoras, fazendo
24 com que haja um melhor desempenho reprodutivo dos animais. Desta forma, a
25 aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*ovum pick up* – OPU), a produção
26 *in vitro* de embriões (PIVE) e a criopreservação de embriões associadas podem
27 alavancar o mercado da pecuária mundial, pois tornam possível a multiplicação
28 de material de alto valor genético em período pré determinado com o clima
29 propício a produção e reprodução de determinadas raças bovinas.

30

31 2.2. ESTRESSE TÉRMICO EM DIFERENTES RAÇAS BOVINAS

32 Para as regiões tropicais do Brasil, principalmente no Pantanal, raças
33 como Pantaneira, Nelore e Girolando tem-se destacado, produzindo e
34 reproduzindo-se sob estresse térmico por calor. O bovino Pantaneiro (*Bos taurus*

1 *taurus*) passou por um longo processo de seleção natural que lhes permitiu
2 adaptar-se ao ambiente peculiar de zonas alagadiças, como o Pantanal,
3 suportando condições climáticas e hidrológicas extremas, caracterizadas por
4 elevadas temperaturas no verão, com máximas absolutas ultrapassando 40°C,
5 e alternância entre períodos secos e encharcamentos (Mazza *et al.*, 1994).

6 Já foi descrita a boa produção de leite da raça, a qual foi indicada para
7 o uso em assentamentos e comunidades quilombolas, devido a sua rusticidade
8 (Lopes, 2014; Oliveira, 2015). Além disso, em avaliação a dinâmica folicular, a
9 raça Pantaneira demonstrou algumas peculiaridades, como o intervalo entre a
10 retirada do dispositivo de progesterona e a ovulação (77 horas) superior ao de
11 outras raças (Ferreira *et al.*, 2017). Ainda sabe-se que os parâmetros fisiológicos
12 e a viabilidade oocitária de fêmeas da raça Pantaneira não foram afetados
13 negativamente por ITUs entre 72 e 78 (Fialho *et al.*, 2018). Considerando a
14 importância da manutenção do material genético dessa raça, atualmente em risco
15 de extinção, e seu potencial de resistência a condições climáticas extremas, é
16 essencial que suas características específicas sejam melhor compreendidas para
17 que estratégias de manejo sejam desenvolvidas com a possibilidade de alcançar
18 o seu melhor potencial reprodutivo e produtivo.

19 A raça Girolando vem sendo amplamente utilizada para a produção
20 de leite do país e da região pantaneira (Westerheide *et al.*, 2009). Esta raça
21 possui condições corporais que lhe atribuem grande resistência e adequação
22 aos mais diversos tipos de ambientes, inclusive excelente capacidade de
23 regulação do calor corporal (Ruas *et al.*, 2004). Já foi relatado que ITUs entre
24 72 e 78, considerados pela classificação de como estresse térmico, não
25 alterou os parâmetros fisiológicos e viabilidade oocitária de animais da raça
26 Girolando (Fialho *et al.*, 2018).

27 A raça Nelore é a de maior destaque na pecuária nacional e apresenta
28 índices de desempenho reprodutivo e produtivo de grande competitividade em
29 climas tropicais (Oliveira *et al.*, 2002). Animais dessa raça são mais tolerantes
30 ao calor devido à sua superfície corporal ser maior em relação ao corpo e por
31 possuir maior número de glândulas sudoríparas. As características de seus pêlos
32 também facilitam o processo de troca com o ambiente e o trato digestivo é 10%
33 menor em relação aos europeus. Portanto, seu metabolismo é menor e gera
34 menor quantidade de calor (Acnb, 2011). Experimentos *in vitro* têm mostrado

1 que embriões de animais *Bos indicus* submetidos ao estresse térmico até os
2 estágios iniciais de desenvolvimento são mais hábeis para sobreviver em
3 comparação ao embrião *Bos taurus* (Paula-Lopes *et al.*, 2003). Eberhardt *et al.*
4 (2009) demonstraram consequências menos deletérias do ETC sobre o
5 desenvolvimento embrionário de animais da raça Nelore quando comparados
6 com taurinos ou mestiços (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Além disso, oócitos de
7 vacas Holandesas foram mais termorresistentes quando fertilizados com sêmen
8 de Nelore do que com sêmen de Angus (Block *et al.*, 2002). Demonstrando assim
9 o potencial de resistência da raça Nelore.

10 A raça simental é criada em todos os continentes, devido a sua grande
11 adaptabilidade e fertilidade (Schmitt *et al.*, 2011). No Brasil, é mais utilizada
12 visando cruzamentos, principalmente com animais da espécie zebuína,
13 proporcionando excepcional adaptabilidade, vigor e habilidade materna (Mota,
14 2012). O interesse econômico neste gado, logo ultrapassou as fronteiras suíças,
15 sendo que países vizinhos, como a Áustria, Itália, França e Alemanha
16 naturalizaram animais com genótipos Simental. Estes países acabaram
17 desenvolvendo linhagens próprias, sendo que hoje a raça Simental é
18 cosmopolita, estando presente em todos os continentes, destacando-se
19 principalmente na Europa, onde apresenta alta representatividade, chegando a
20 80% do rebanho leiteiro na Sérvia e Áustria e a 30% na Alemanha (Thom, 1959).
21 Dentre as várias linhagens derivadas do Simental, a Montbeliarde presente na
22 França caracteriza-se por ser de dupla aptidão, destacando-se na produção de
23 carne e leite bem como, pela precocidade produtiva e reprodutiva dos animais
24 (Abcss, 2011).

25 Além da produção de leite com elevado teor de sólidos, a raça
26 Simental também se destaca pelo bom desempenho reprodutivo. Vacas da raça
27 Simental tiveram 89% de prenhez após a segunda cobertura e 70,7 dias de
28 intervalo do parto primeira cobertura, contra 59% de prenhez após a segunda
29 cobertura e 77,4 dias de intervalo do parto até a primeira cobertura para as vacas
30 Holandês (Ravagnolo e Misztal, 2002). Na República Tcheca foi observado
31 índice de 52,52% de prenhez na primeira cobertura e intervalo entre partos de
32 372,75 dias para vacas Simental (Morris *et al.*, 2011). Resultados similares foram
33 reportados na Turquia com 371 dias para intervalo entre partos e 87 dias período
34 parto primeira cobertura (Giralt e Villarroya, 2012).

2.3. EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE A REPRODUÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS

Como descrito acima o ETC pode afetar a reprodução em vários aspectos, no entanto nessa revisão serão descritos os efeitos sobre o ciclo estral, oócitos e embriões.

2.3.1. CICLO ESTRAL

O estresse térmico pode comprometer o comportamento sexual da vaca. Em geral, as vacas leiteiras possuem estro com duração de aproximadamente 14 a 18 horas durante o período frio e 8 a 10 horas em períodos quentes, o que dificulta o diagnóstico de cio (Barbosa e Damasceno, 2002). Nos meses mais quentes do ano, o índice de falha na detecção de estro de vacas de leite chega a 75-80%, pois o calor reduz tanto a duração do estro quanto o número de montas (Hansen, 2007).

Vacas em condições de ETC sofrem um decréscimo nas concentrações de hormônio luteinizante (LH) (Lee, 1993), e os pulsos pré-ovulatórios de LH são menores quando há baixas concentrações de estradiol (Gilad *et al.*, 1993). Já foi demonstrado que folículos ovarianos (em estágio inicial de crescimento antral e pré-ovulatórios), de animais previamente estressados pelo calor, possuem células da granulosa menos eficientes do que animais que estão em conforto térmico, e como consequência, apresentam menor produção de estradiol (Roth *et al.*, 2001). Além disso no verão, as concentrações de inibina estão reduzidas, e conseqüentemente são observadas altas concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) e menores de LH no período pré-ovulatório (De Rensis e Scaramuzzi, 2003). Todas essas alterações hormonais em situação de ETC culminam com alterações no fenômeno ovulatório (ausência de ovulação ou alteração dos padrões de horário e número de ovulações).

Já foi relatado que o risco de falência da ovulação de vacas leiteiras é 3,9 vezes maior para inseminações realizadas no verão do que no inverno, com conseqüente redução na taxa de prenhez no verão e que há um maior número de duplas ovulações na estação fria do ano (Lopez-Gatiús *et al.*, 2005). Isso se explica pelo fato de que o perfil hormonal, e conseqüentemente o crescimento e

1 desenvolvimento folicular, são afetados por mudanças da temperatura corporal
2 (Zeron *et al.*, 2001).

3

4 2.3.2. OÓCITOS E EMBRIÕES

5 Embora o crescimento folicular seja controlado principalmente por
6 gonadotrofinas e fatores de crescimento produzidos localmente, uma série de
7 fatores ambientais, como o estresse térmico, pode influenciar o desenvolvimento
8 folicular e a qualidade do oócito, e, portanto, a fertilidade (Garnsworthy e Webb,
9 1999; Webb *et al.*, 2003).

10 Sabe-se que ocorrem injúrias em consequência do ETC diretamente
11 nos oócitos, porém ainda não está claro o mecanismo que prejudica a qualidade
12 dos oócitos (Roth *et al.*, 2001). Em vacas de alta produção leiteira, há maior
13 quantidade de folículos e oócitos no inverno do que no verão, e a viabilidade
14 oocitária também é maior nos períodos de menor temperatura, 85% no inverno
15 e de 65% no verão (Zeron *et al.*, 2001). A má qualidade dos oócitos no período
16 do verão foi associada a altas taxas de fragmentação de blastocisto produzidos
17 *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2011). Um dos métodos de avaliação da qualidade e
18 competência dos oócitos é a avaliação da capacidade de clivar e se tornar
19 blastocisto após a fecundação. Diversos estudos demonstraram que o estresse
20 térmico não afeta a taxa de clivagem após três dias da fecundação, porém, afeta
21 de forma negativa a taxa de blastocisto (Al-Katanani *et al.*, 2002; Torres-Junior
22 *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011).

23 O controle da maturação meiótica do oócito ocorre em função de uma
24 íntima e complexa interação entre células somáticas e germinativas envolvendo
25 uma série de vias metabólicas (Fulka *et al.*, 1998). Constatou-se que há uma
26 deficiência na esteroidogênese das células da teca e granulosa previamente
27 estressados pelo calor, e isso gera uma redução nas concentrações de
28 estradiol no fluido folicular. Essa redução pode afetar a secreção de
29 gonadotrofinas que estejam envolvidas na aquisição de competência meiótica
30 dos oócitos. Assim é possível supor que a comunicação entre células da
31 granulosa e do *cumulus* também pode causar prejuízos na competência oocitária
32 (Roth *et al.*, 2001). Esse fato leva a um comprometimento nutricional do oócito
33 e, por consequência (Thompson *et al.*, 2007), a um impacto negativo na
34 retomada da meiose do oócito (Van Soom *et al.*, 2007).

1 Edwards *et al.* (2005) verificaram que o estresse de 41°C por uma
2 hora durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos não comprometeu a
3 capacidade dos oócitos completarem a maturação nuclear e citoplasmática,
4 porém fez com que o tempo necessário para estes fenômenos fosse menor
5 (Edwards *et al.*, 2005). Assim o aumento da temperatura durante a fase de
6 maturação oocitária pode induzir ao envelhecimento precoce dos oócitos, e
7 reduzir assim a vida fértil dos mesmos.

8 Em ruminantes, estudos confirmaram que leva meses para um folículo
9 primordial atingir o estágio pré-ovulatório (Campbell *et al.*, 2000) (Figura 1).
10 Sabe-se que oócitos de folículos pré-antrais estão em crescimento, e com uma
11 intensa síntese de RNA (Li *et al.*, 2015), o que os torna sensíveis a mudanças
12 ambientais. Estudos demonstram a influência dos efeitos do estresse térmico
13 calórico (41°C; 8 - 16 horas) sobre o progresso da maturação nuclear
14 (capacidade de prosseguir de prófase I até metáfase II) e citoplasmática
15 (alterações no cito esqueleto, reorganização das organelas, alteração do
16 metabolismo, redução nos níveis de mRNA e alterações nos perfis de proteínas
17 sintéticas) dos oócitos (Edwards *et al.*, 2005).

18

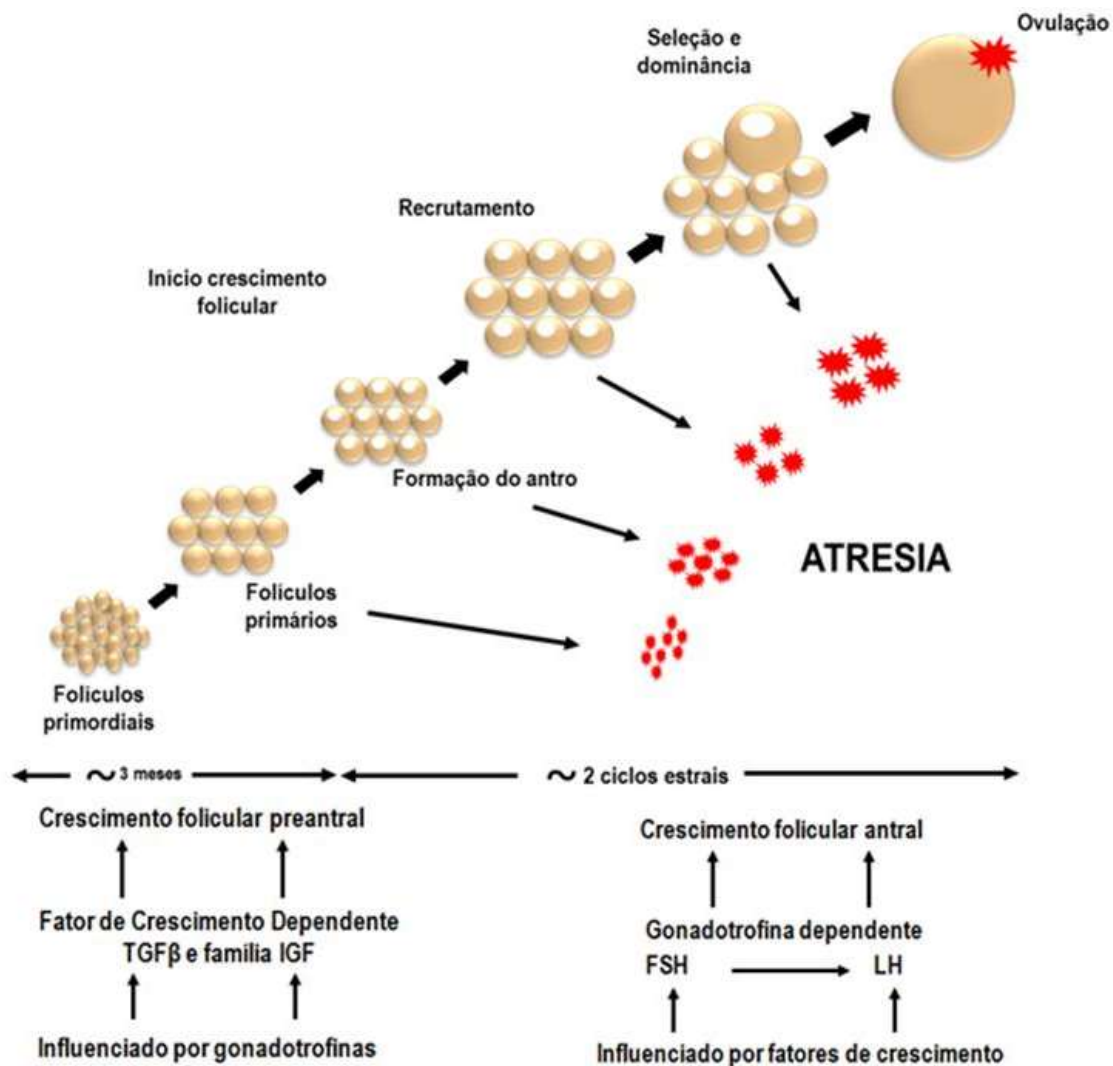


Figura 1 – Figura esquemática representando o crescimento folicular desde o folículo primordial até a ovulação e sua relação com hormônios e fatores de crescimento em cada fase do desenvolvimento (Webb *et al.*, 2004).

O ETC afeta folículos antrais e pré-antrais de vacas, que tendem a produzir oócitos de menor capacidade de fertilização, e caso haja a fertilização, os embriões passam a ter desenvolvimento anormal (Hansen, 2005). E considerando o tempo de desenvolvimento folicular desde a fase primordial (90 dias), os efeitos negativos do estresse térmico calórico do verão podem influenciar na fertilidade na estação de outono (Zeron *et al.*, 2001; De Rensis e Scaramuzzi, 2003). Já foi relatado que oócitos que se desenvolvem em folículos antrais previamente estressados pelo calor, continuam sendo sensíveis mesmo que sejam cultivados *in vitro* (Nabenishi *et al.*, 2012).

Embriões em fases iniciais de desenvolvimento, produzidos *in vivo* ou *in vitro*, são mais sensíveis à exposição a altas temperaturas (Edwards e

1 Hansen, 1997). O choque térmico durante o período de zigoto compromete a
2 capacidade destes atingir as fases de mórula e blastocisto, embora não
3 comprometa a capacidade de clivagem até 16 células (Rivera e Hansen, 2001;
4 Sakatani *et al.*, 2012; Ortega *et al.*, 2016). Blastocistos que sofreram choque
5 térmico tendem a ter um menor número de células do trofoblasto. A taxa de
6 blastocistos foi menor quando o estresse térmico ocorreu durante a fase de
7 zigoto, entretanto, quando o estresse ocorreu durante a fase de mórula, não
8 causou efeito sobre o desenvolvimento até a fase de blastocisto (Sakatani *et al.*,
9 2012).

10

11 2.4. FISILOGIA DO ESTRESSE TÉRMICO

12 O conhecimento do comportamento e das mudanças fisiológicas nos
13 animais, diante do estresse térmico, é importante para a busca de maior
14 eficiência na produção (Baêta e Souza, 2010). Em temperaturas que
15 ultrapassam os limites da zona de conforto térmico (ZCT), ocorre uma perda da
16 eficiência produtiva (Azevedo *et al.*, 2005), pois afetam direta e indiretamente os
17 animais através de importantes reações biológicas, como variações endócrinas,
18 hematológicas e bioquímicas (Facó *et al.*, 2002). Estas ocasionam alterações
19 metabólicas, em busca da manutenção da homeostase (Façanha *et al.*, 2013),
20 e, conseqüentemente, impactam negativamente na sanidade, produção e
21 reprodução (Head, 1995; Mader *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010).

22 Os mecanismos fisiológicos e comportamentais que se alteram com
23 o estresse térmico são: aumento de taxa respiratória, aumento dos batimentos
24 cardíacos, aumento da taxa de sudorese, aumento na ingestão de água e
25 diminuição na ingestão de alimentos (Azevedo e Alves, 2009). A vasodilatação
26 é o primeiro mecanismo acionado para a perda de calor (Robinson, 2004),
27 seguido pela sudorese e aumento da frequência respiratória. A redução de
28 ingestão de alimentos é uma estratégia usada pelo animal na busca de manter
29 a temperatura corporal constante, pois resulta em decréscimo do incremento
30 calórico proveniente da alimentação (Hooda e Singh, 2010). O principal
31 termorregulador do organismo é o hipotálamo, e por uma série de mecanismos,
32 ocorre ativação hormonal e do sistema nervoso autônomo, com o intuito de
33 preservar a integridade do organismo, mantendo a homeostasia (Cruz *et al.*,
34 2011).

1 O aumento ou a diminuição da FR depende da intensidade e duração
2 do estresse ao qual os animais estão submetidos (Martello, 2006). Nos bovinos
3 expostos ao estresse térmico, 30% de suas perdas evaporativas ocorrem por
4 meio dos movimentos respiratórios e 70% pela sudorese (Silva, 2000). O
5 comportamento respiratório pode ser caracterizado em movimentos rápidos e
6 superficiais ou lentos e profundos, além disso, em casos extremos, pode ocorrer
7 respiração bucal acompanhada de salivação intensa e protusão da língua
8 (Baccari Jr, 2001). O aumento da frequência respiratória por períodos longos,
9 causa prejuízos ao organismo animal, tais como: redução no consumo de
10 forragens, produção de calor endógeno adicional devido ao exercício da
11 ofegação, desvio de energia para outros processos metabólicos e redução de
12 gás carbônico (CO₂) (acarretando em alcalose respiratória pelos baixos níveis de
13 ácido carbônico no sangue) (Matarazzo *et al.*, 2006).

14 A temperatura corporal depende do equilíbrio entre a termogênese e
15 a termólise, ou seja, a relação entre a utilização da energia de manutença para
16 produzir ou dissipar calor, e em casos de ineficiência de perda de calor pelos
17 mecanismos de termólise, ocorre um aumento da temperatura retal acima dos
18 valores fisiológicos, caracterizando um quadro de hipertermia (Baccari Jr, 2001;
19 Souza e Batista, 2012). Para Hansen (2005), a mensuração da temperatura retal
20 é a melhor forma para se determinar o estresse térmico em vacas. A temperatura
21 retal média em bovinos leiteiros é igual a 38,6°C, aceitando-se o intervalo de 38
22 a 39,3°C (Cunningham, 2004), havendo variações de acordo com a idade, sexo,
23 nível nutricional, lactação e estágio reprodutivo (Martello *et al.*, 2004; Martello,
24 2006).

25 As vacas de alta produção, em início de lactação, são mais sensíveis
26 ao estresse por calor, e a produção de leite e eficiência reprodutiva diminuem
27 significativamente quando a temperatura retal excede 39°C e frequência
28 respiratória 60 mov/min (Kadokawa *et al.*, 2012).

29

30 2.5. RESPOSTA MOLECULAR AO ESTRESSE

31

32 2.5.1. HSP70 E HSP90

33 A primeira resposta de um organismo a qualquer estresse ambiental
34 acontece bioquimicamente. A resposta ao estresse compreende a atuação de

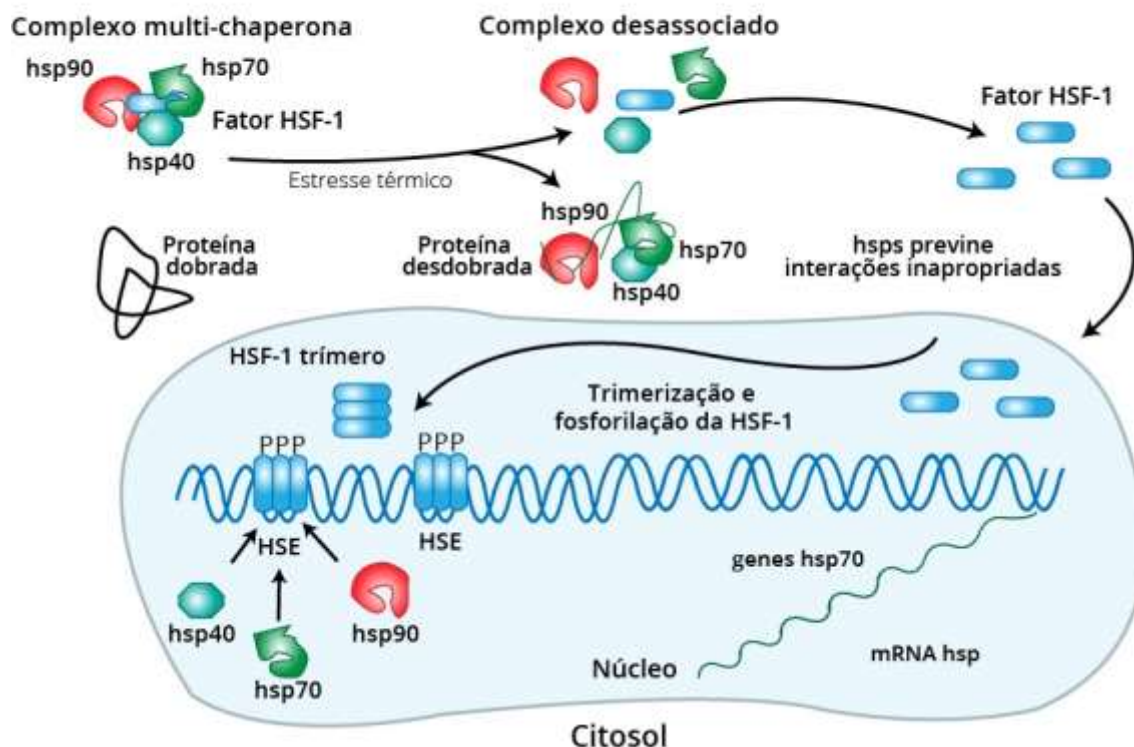
1 proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP), sendo esta uma das
2 respostas primárias de proteção celular (Lindquist e Craig, 1988). Inicialmente,
3 as HSPs foram identificadas como proteínas produzidas sob indução do estresse
4 térmico (Ritossa, 1962), contudo foi verificado que se trata não só de um
5 componente crítico de um mecanismo de defesa complexo e altamente
6 conservado, como também desempenha papel fundamental tanto durante a
7 síntese, montagem, dobramento e degradação de proteínas, quanto na
8 preservação da sobrevivência celular sob condições ambientais adversas (Gupta
9 *et al.*, 2007). As HSPs podem ser classificadas de acordo com suas sequências
10 de aminoácidos e o seu peso molecular em KD, sendo distribuídas em seis
11 famílias: pequenas HSP, HSP 40, HSP 60, HSP 70, HSP 90 e HSP 100 (Fuller
12 *et al.*, 1994).

13 Em condições adversas, como por exemplo o aumento de
14 temperatura, estresse osmótico ou oxidativo, os níveis de HSP são aumentados,
15 auxiliando, desta forma, na síntese e maturação de novas proteínas que irão
16 substituir aquelas afetadas pelo estresse metabólico (Bukau e Horwich, 1998).
17 As HSP também fornecem subsídio às células para identificar e facilitar o
18 restauração de proteínas danificadas ou destiná-las a um sistema proteolítico
19 adequado, facilitando a eliminação de proteínas, cujos danos não são passíveis
20 de restauração (Mayer e Bukau, 2005).

21 As HSPs são ativadas da seguinte maneira: logo após um estresse
22 térmico, ocorre uma resposta ao choque térmico (HSR), em que um fator
23 transcricional, conhecido como fator de choque térmico I (HSF1), que se
24 encontra na sua forma inativa, passa rapidamente por uma trimerização,
25 permitindo que se ligue a uma região promotora dos genes que codificam as
26 HSPs. Tal região é descrita como elemento de choque térmico (HSE). Dessa
27 forma, ocorre um aumento da expressão dos genes para HSP (Castro *et al.*,
28 2013) (Figura 2).

29

REGULAÇÃO DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE TÉRMICO



1

2 **Figura 2** - Regulação e mecanismo de ação das proteínas do choque térmico
 3 (HSPs). Adaptado de Tomanek e Somero (2002).

4

5 O aumento de HSP nas células lesadas, além de auxiliar no reparo de
 6 proteínas, apresenta um importante papel na manutenção da viabilidade da
 7 mesma. A HSP 70 atua modulando as vias da apoptose. Essa proteína regula a
 8 apoptose tanto na via intrínseca como na extrínseca. Na via intrínseca, ela atua
 9 na prevenção da perda de potencial da membrana mitocondrial externa.
 10 Resumidamente, a HSP 70 impede a translocação da proteína Bax para a
 11 membrana mitocondrial, evitando que ela crie poros na membrana (Mosser *et al.*,
 12 1997; Castro *et al.*, 2013). Na via extrínseca, a HSP 70 atua inibindo a
 13 ativação de moléculas apoptóticas, tais como JNK, caspase-8, Bax, AIF, Apaf-1
 14 e a caspase-3 (Castro *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Vasaikar *et al.*, 2015).

15 As proteínas de choque térmico, além de atuarem modulando as vias
 16 da apoptose, podem também ser utilizadas como marcador de estresse celular
 17 e, por consequência, influenciar na competência oocitária (Camargo *et al.*, 2007).

18 Já foi descrito que complexos oócitos-cumulus (COCs) de bubalinos
 19 (Yadav *et al.*, 2013) e bovinos (Paynton *et al.*, 1988), quando submetidos a

1 elevadas temperaturas durante a maturação *in vitro* (MIV), respondem a esse
2 estresse incrementando a expressão de RNAm para HSP 70.

3 Apesar da indução destas proteínas ter sido inicialmente interpretada
4 como um sinal para a detecção de estresse através da alteração de funções
5 fisiológicas, está bem estabelecido que a indução é fundamental nos processos
6 de reparo que seguem diferentes tipos de danos e na prevenção contra a
7 agregação e coagulação de proteínas (Santoro, 2000), que é o principal
8 mecanismo através do qual as HSP conferem citoproteção, evitando dobraduras
9 e interações incorretas entre as proteínas. Em condições fisiológicas, os
10 segmentos predominantemente hidrofóbicos das cadeias polipeptídicas, que
11 formam as proteínas corretamente dobradas, localizam-se no interior da
12 molécula, enquanto os segmentos hidrofílicos voltam-se para o exterior. Esta
13 disposição possibilita a solubilidade das proteínas em meio aquoso e impede a
14 formação de agregados que ocorreriam pela interação das partes hidrofóbicas
15 de diferentes moléculas (Meyer e Silva, 1999).

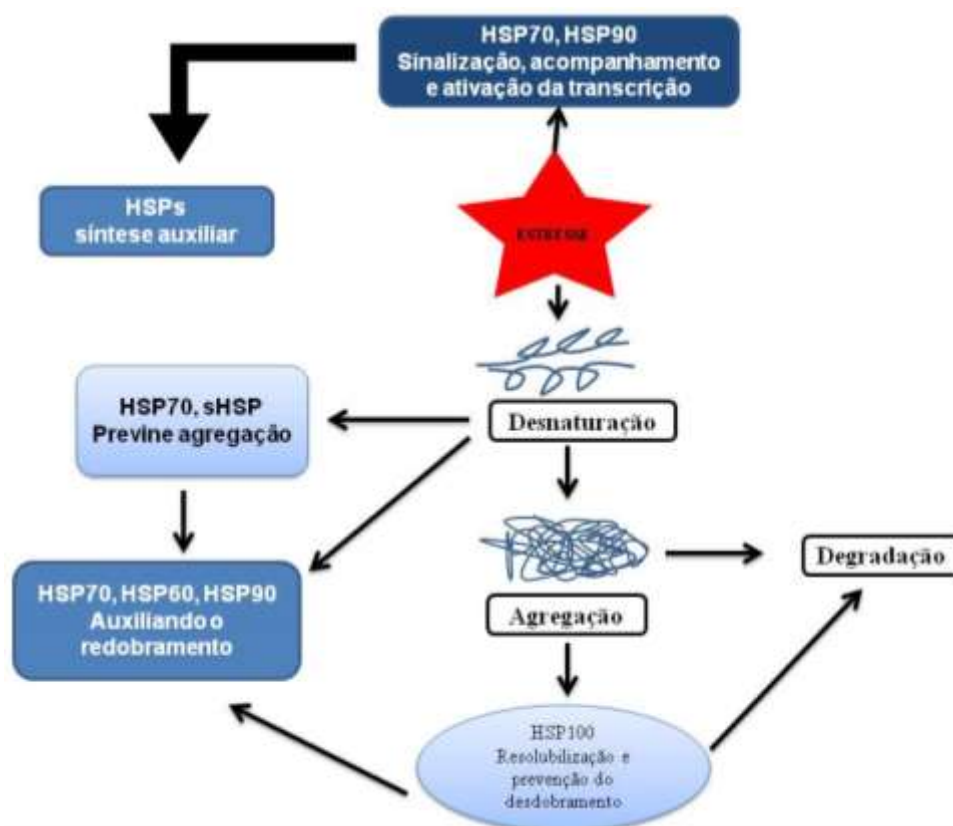
16 O papel citoprotetor das HSPs (Figura 3) e, em particular, das HSP70,
17 tem sido extensivamente documentado tanto *in vitro* como *in vivo*, em uma
18 variedade de doenças humanas, incluindo: distúrbios metabólicos, inflamação,
19 infecção e isquemia (Oliveira Jr., 2005). Dentre os genes da família de resposta
20 ao choque térmico, a HSP70 é um dos genes altamente conservados e o
21 primeiro a ser induzido em resposta a diversos fatores estressantes
22 (Mukhopadhyay *et al.*, 2003).

23 As HSP70 compõem uma grande família de proteínas comumente
24 associadas à tolerância à temperatura (Mayer e Bukau, 2005). Kawarsky e King
25 (2001) demonstraram não haver alteração da distribuição de HSP70 no
26 ooplasma de oócitos bovinos submetidos a xxx graus C por xxxx horas durante
27 a maturação *in vitro*, mas relataram uma íntima relação dessa proteína com o
28 fuso meiótico, indicando um possível papel da HSP 70 com a estabilização dessa
29 estrutura.

30 Matwee *et al.* (2001) observaram que a presença do anticorpo anti-
31 HSP70 em meio de cultura do dia 3 ao dia 9 do cultivo *in vitro* de embriões de
32 camundongos aumentou a apoptose e reduziu significativamente a taxa de
33 blastocistos. No mesmo trabalho observou-se que a proporção de células

1 apoptóticas em blastocistos bovinos foi significativamente menor após cultivo *in*
 2 *vitro* com exposição prévia ao aumento da temperatura (42°C, 6 horas).

3



4

5 **Figura 3** - Esquema do mecanismo de ação das proteínas do choque térmico
 6 (HSPs) (Wang *et al.*, 2004).

7

8 Quando as células sofrem estresse térmico, acontece a desnaturação
 9 proteica, danificando a célula. Desta forma, sabe-se que HSP70 e HSP90
 10 interagem com proteínas lesadas pelo estresse para evitar a agregação e iniciar
 11 o redobramento do substrato de maneira dependente de ATP e cochaperona
 12 (Liberek *et al.*, 2008). Nesses casos observa-se que o aumento de HSP70 resulta
 13 na redução da formação de agregados via estimulação de proteassoma,
 14 protease dependente de ATP usada para destruir proteínas danificadas (Dul *et*
 15 *al.*, 2001). Em última análise, oócitos envelhecidos tem menor capacidade de
 16 produzir HSPs e apresentam maior número de proteínas danificadas agregadas
 17 em função do estresse oxidativo (Mihalas *et al.*, 2017).

18 A HSP90 é uma chaperona abundante e representa de 1 a 3% do total
 19 de proteínas citosólicas em condições fisiológicas (Welch e Feramisco, 1982).
 20 Essa proteína participa da estabilização, ativação e maturação de mais de 200

1 proteínas, denominadas proteínas clientes (ou substrato), que dependem dela
2 para atingir e/ou manter sua conformação funcional, sendo que, muitas dessas
3 células alvo são essenciais para sinalização e transcrição celular, além de
4 respostas adaptativas a situações de estresse (Mayer e Bukau, 2005; Da Silva
5 e Ramos, 2012).

6 Como a HSP90 é responsável pela ativação de uma gama de
7 proteínas clientes, essa chaperona evoluiu para formar uma variedade de
8 complexos com co-chaperonas, que por sua vez, regulam o ciclo funcional da
9 HSP90 (Prodromou, 2012). O repertório de proteínas alvo da HSP90 implica na
10 interação com diferentes co-chaperonas reguladoras e proteínas de sinalização,
11 incluindo as proteínas quinases e fatores de transcrição, que estão envolvidos
12 no controle da proliferação, diferenciação celular e apoptose (Roe *et al.*, 2004;
13 Da Silva e Ramos, 2012). Portanto, a HSP90 é uma proteína essencial para
14 viabilidade e integridade celular e é tida como um mediador chave da
15 homeostase, função que realiza sendo um facilitador de diversas interações
16 proteína-proteína do tipo transiente e de baixa afinidade (Pratt *et al.*, 2008). Em
17 contraste com outras chaperonas moleculares, a HSP90 parece ser
18 relativamente específica em relação à interação com suas células alvo; contudo,
19 as bases moleculares dessa especificidade ainda não são bem compreendidas.
20 A resistência à insulina tem sido relacionada com expressão alterada da HSP90
21 (Piccinini *et al.*, 2006). HSP90 é bem controlada por várias modificações pós-
22 traducionais, incluindo fosforilação, acetilação e nitrosilação. Essas modificações
23 influenciam a atividade chaperona de HSP90 e, portanto, a maturação de
24 proteína alvo (Li *et al.*, 2012).

25 A acetilação e a fosforilação podem afetar a função da HSP90 por
26 vários mecanismos diferentes, incluindo efeitos sobre a atividade ATPase, a
27 ligação de co-chaperonas e a ligação de proteínas alvo. Além dessas
28 modificações pós-tradução, a HSP90 também pode ser ubiquitinada, embora
29 seja menos conhecida nesta modificação covalente particular, o foco da maioria
30 dos estudos está na ubiquitinação e posterior degradação das proteínas alvo de
31 HSP90. Há também evidências de que, além disso, para as modificações pós-
32 translacionais regulatórias, a HSP90 pode reagir com vários nucleófilos de
33 pequenas moléculas celulares, tais como aldeídos reativos produzidos como
34 resultado de dano oxidativo aos lipídios, que pode desempenhar um papel em

1 alguns estados de doença (Sakamoto *et al.*, 2013).

2 Schirling *et al.* (2004) avaliando oócitos de anfíbios observaram baixo
3 nível de HSP90, enquanto a HSP70 estava no seu pico, em oócitos imaturos.
4 Quando no final do ciclo, já com oócitos maduros o oposto era verdadeiro. Diante
5 disso, afirmaram que os níveis de proteínas de estresse refletem o estágio de
6 maturidade dos oócitos. Avaliando ovários bovinos, Velazquez *et al.* (2010),
7 observaram que a HSP70 e HSP90 apresentaram padrão semelhante de
8 imunomarcagem, com expressão gênica moderada em folículos primários e
9 secundários. Observaram ainda um aumento da expressão em folículos
10 terciários e atrésicos com maior expressão gênica em folículos císticos. As HSPs
11 também foram localizadas no corpo lúteo, corpus albicans, tecido intersticial e
12 túnica albugínea. Diante disso, concluíram que o aumento da expressão de
13 genes HSP diminui a apoptose na parede folicular.

14 Já foi observado por Pennarossa *et al.* (2012) que COCs de suínos
15 isolados de ovários coletados no verão apresentaram o mesmo padrão de HSPs
16 dos coletados no inverno. Após estímulos térmicos ou variações sazonais, a
17 expressão gênica relacionada à célula do cumulus, a HSP não sofre variação, e
18 apenas oócitos ativam uma resposta, sugerindo que esse mecanismo é
19 insuficiente para preservar a competência do oócito *in vitro* e *in vivo* em suínos.

20

21 2.5.2. SIRTUÍNAS

22 As sirtuínas são reguladores importantes de uma ampla variedade de
23 processos celulares e fisiológicos, tais como proliferação celular, diferenciação,
24 resposta ao estresse, estabilidade do genoma, sobrevivência celular,
25 metabolismo e homeostasia energética e processo de envelhecimento (Michan
26 e Sinclair, 2007). Estas participam também na regulação de diversas patologias,
27 tais como neoplasias, doenças inflamatórias crônicas, diabetes, doenças
28 cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Michan e Sinclair, 2007).

29 As sirtuínas fazem parte de um expressivo grupo de enzimas (Tabela
30 1), da família das histonas desacetilases ou HDACs, cujo papel principal é
31 reverter a acetilação regulatória das proteínas histonas, influenciando
32 diretamente na estrutura dos nucleossomos e conseqüentemente na transcrição
33 gênica (Gregoret *et al.*, 2004).

34

Tabela 1 - Principais características das sirtuínas de mamíferos, adaptado de Pereira (2016).

Sirtuina	Localização intracelular	Atividade	Processos biológicos envolvidos
SIRT 1	Núcleo/Citoplasma*	Desacetilase	Metabolismo/inflamação/ Neurodegeneração/Aoptose/ Proliferação celular/ Regeneração
SIRT 2	Citoplasma/Núcleo*	Desacetilase	Metabolismo/ Ciclo celular/ Neuroinflamação
SIRT 3	Mitocôndria/Núcleo*	Desacetilase	Metabolismo/ Estresse oxidativo
SIRT 4	Mitocôndria	ADP-ribosil transferase	Metabolismo
SIRT 5	Mitocôndria	Desacetilase?, Demalonilase e	Metabolismo
SIRT 6	Núcleo (heterocromatina)	Desacetilase e ADP-ribosil transferase	Reparo DNA/ Inflamação
SIRT 7	Núcleo (núcleolo)	Desacetilase	Transcrição DNAr

*Localização secundária; (?) Função pouco proeminente

A SIRT1 é, sem dúvida, a representante mais estudada do grupo. Encontra-se predominantemente no núcleo, mas com capacidade de deslocar-se ao citosol, e atua em inúmeros processos do metabolismo como na secreção de insulina, mecanismos de neuroproteção, regulação do sistema imune, câncer, estresse oxidativo e apoptose (Stunkel e Campbell, 2011). A SIRT2 está presente prioritariamente no citoplasma, mas também pode deslocar-se ao núcleo. Está envolvida na diferenciação de adipócitos, resposta celular ao estresse e regulação do ciclo celular (Mahlknecht e Zschoernig, 2012).

As SIRT 3, 4 e 5 estão localizadas nas mitocôndrias e estão associadas ao metabolismo energético e a respostas relacionadas ao estresse oxidativo e sinalização celular (Baur et al., 2012). Dentre estas, a SIRT3 vem se destacando devido a sua capacidade desacetilase ser a mais robusta entre as sirtuínas mitocondriais, atuando em um maior número de alvos metabólicos e, conseqüentemente, atraindo muito interesse em sua potencial ação benéfica em complicações associadas ao envelhecimento, homeostase metabólica e proteção ao estresse oxidativo (Houtkooper *et al.*, 2012).

1 A SIRT4 é a única sirtuína sem substrato para desacetilação
2 conhecida, porém, possui ação de ADP-ribosil transferase. Sua relevância
3 fisiológica e ação precisa no metabolismo ainda é pouco entendida, entretanto
4 já foi proposto que atue como potente supressor tumoral em camundongos e
5 células humanas (Osborne *et al.*, 2014). Recentemente, a SIRT5 é a única com
6 outras duas atividades identificadas, desuccinilase e demalonilase, as quais são
7 aparentemente mais relevantes que sua função desacetilase na regulação do
8 metabolismo celular na mitocôndria (Baur *et al.*, 2012).

9 O estudo das sirtuínas fez um progresso notável e ampliou o
10 conhecimento acerca destas moléculas. No entanto, a compreensão acerca da
11 biologia e mecanismos das sirtuínas ainda está longe de estar completa e muitas
12 perguntas ainda necessitam de respostas. Emergindo da pesquisa sobre as
13 sirtuínas, existe uma crescente compreensão de que elas são um sistema de
14 resposta biológica muito complexo, que influencia muitas outras moléculas
15 reguladoras e vias de sinalização (Soares, 2014).

16 De acordo com Tatone e Di Emidio (2015b) recentemente, descobriu-
17 se o papel crucial para SIRT1 e SIRT3, são como sensores e guardiões do
18 estado redox em oócitos, células da granulosa e embriões iniciais. Já Di Emidio
19 *et al.* (2014) observou que a SIRT1 desempenha um papel crucial na resposta
20 adaptativa de oócitos de camundongos, principalmente na fase de vesícula
21 germinativa (GV), que sofrem o estresse oxidativo. Zhang *et al.* (2015) utilizaram
22 inibidores de sirtuínas (nicotinamida e sirtinol) durante a maturação de oócitos
23 suínos, e observaram os fusos da meiose anormais e os cromossomos
24 desalinhados. Entretanto, Okamoto *et al.* (2013) avaliando ovários de
25 camundongos idosos observaram que os oócitos expressavam altos níveis de
26 SIRT6, enquanto as expressões de SIRT1, SIRT2, SIRT4 e SIRT6 eram altas
27 nas células do cumulus. Ao comparar amostras de camundongos jovens e
28 idosos, os níveis de RNAm de SIRT1 e SIRT7 em oócitos não foram diferentes.
29 No entanto, SIRT2 e SIRT6 foram menores nas células do cumulus de
30 camundongo idosos. Sugerindo uma possível associação da SIRT2 e SIRT6 em
31 células do cumulus com comprometimento da qualidade do oócito em
32 camundongos idosos (Okamoto *et al.*, 2013).

33

34 2.5.3. OUTRAS PROTEÍNAS (BCL11A e P53)

1 O gene BCL11A, chamado oncogene, já foi identificado em embriões,
2 em que determinadas mutações do gene podem apresentar ausência de
3 linfócitos B e alterações em várias linhagens de linfócitos T, demonstrando sua
4 função para o desenvolvimento normal dos linfócitos (Liu *et al.*, 2003). Além
5 disso, esse gene, tem expressão estágio-específica na ontogenia das
6 hemoglobinas, e os progenitores eritróides embriônicos e fetais, que tem altas
7 concentrações de hemoglobina F, tem baixas expressões do gene BCL11a
8 (Sankaran *et al.*, 2009).

9 O gene BCL11A funciona como silenciador da gama-globina, atuando
10 através da interação à distância com o cluster da β -globina e de interação em
11 nível local com a proteína SOX6, que funciona como co-fator (Xu *et al.*, 2010).
12 Além disso, o gene BCL11A tem sido associado como o principal agente
13 repressor dos genes HBG (gene globínico fetal), sendo demonstrado que
14 eritrócitos adultos com níveis elevados de HbF apresentam redução da
15 expressão de mRNA do BCL11A. Os mecanismos moleculares envolvidos nessa
16 regulação ainda não foram completamente elucidados, entretanto, acredita-se
17 que a proteína BCL11A se ligaria a um sítio específico localizado próximo a
18 região promotora dos genes HBG, reprimindo sua expressão. Polimorfismos em
19 HGB tem sido associados a um fenótipo de síntese continuada de hemoglobina
20 F, em indivíduos normais e em portadores de hemoglobinopatias como a HbSS
21 (Uda *et al.*, 2008). Entretanto, BCL11A é altamente expresso em câncer de
22 mama (Khaled *et al.*, 2015). Avaliando células da granulosa humanas, Perlman
23 *et al.* (2006), observaram que a BCL11A é regulado pelo hormônio FSH,
24 sugerindo a participação do gene na folículo-gênese. Esses resultados
25 demonstram que apesar de ainda pouco conhecido, essa proteína está envolvida
26 com fenômenos da reprodução.

27 O p53 é um gene supressor tumoral, que codifica uma fosfoproteína
28 nuclear que desempenha um papel importante no controle do ciclo celular, no
29 reparo do DNA e na indução da apoptose. Em condições de stress,
30 particularmente por indução de dano no DNA, a proteína p53 bloqueia o ciclo
31 celular, permitindo dessa forma o reparo do DNA ou promovendo a apoptose.
32 Estas funções são efetuadas pela capacidade transcricional da proteína p53 que
33 ativa uma série de genes envolvidos na regulação do ciclo celular (Cavalcanti
34 Júnior *et al.*, 2002).

1 O gene p53 é considerado como o “guardião do genoma”, dentre
2 todos aqueles reconhecidamente envolvidos nos processos de carcinogênese,
3 é o de maior importância. O gene é ativado em resposta a sinais de dano celular.
4 Embora seja considerado um gene supressor de tumor, porque a maioria das
5 mutações leva à perda de função, o p53 quando sofre alguns tipos de mutações
6 pode exercer um efeito negativo dominante, ou seja, o produto do único alelo
7 mutado interage e inativa o alelo normal, induzindo o câncer e atuando, portanto,
8 como um oncogene (Levine, 1997).

9 Apesar das mutações em p53 serem observadas principalmente em
10 células somáticas, as que ocorrem em células germinativas são responsáveis
11 pela Síndrome de Li-Fraumeni. O p53 mutado pode ser observado em cerca de
12 75% das famílias, cujos portadores apresentam aumento dos níveis da proteína
13 p53 em tecidos normais e neoplásicos (Hodgson e Maher, 1999). Na rara
14 Síndrome de Li Fraumeni, existe uma predisposição hereditária ao câncer,
15 incluindo vários tipos de neoplasias malignas, tais como leucemias agudas,
16 sarcomas em crianças e adultos jovens e câncer de mama em mulheres jovens.
17 Nos indivíduos acometidos por esta síndrome, foi demonstrado que os pais
18 possuíam em suas células germinativas o gene p53 mutado. Os pacientes
19 afetados apresentam mutação do gene p53 em um dos alelos demonstrando
20 desta forma a ação desse gene na patogênese desta síndrome (Li *et al.*, 1988;
21 Preudhomme e Fenaux, 1997).

22

23 REFERÊNCIAS

- 24
25 ABCSS. Associação Brasileira dos Criadores das Raças Simental e Simbrasil
26 2011. Disponível em: < <http://simentalsimbrail.org.br/?p=raca-simental>. >.
27 Acesso em: 09/01/2018.
- 28 ABREU, P. G. et al. Estimativa da temperatura de globo negro a partir da
29 temperatura de bulbo seco. **Engenharia na agricultura**, v. 19, n. 6, p. 557-563,
30 2011.
- 31 ACNB. ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL - Raça
32 Nelore. 2011. Disponível em: < <http://www.nelore.org.br> >. Acesso em: 09/01.
- 33 AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season
34 and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **J Dairy**
35 **Sci**, v. 85, n. 2, p. 390-396, Feb 2002.
- 36 AZEVEDO, M. et al. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de
37 temperatura e umidade para vacas leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês-Zebu em
38 lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2000-2008, 2005.

- 1 AZEVEDO, M. M. R.; ALVES, A. A. **Bioclimatologia aplicada a produção de**
2 **bovinos leiteiros nos trópicos**. Teresina: Embrapa - Meio Norte: 83 p. 2009.
- 3 BACCARI JR, F. **Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes**.
4 2001. 142 (Doutorado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- 5 BAËTA, F. C. **Responses of lactating dairy cows to the combined effects of**
6 **temperature, humidity and wind velocity in the warm season**. 1985. 218
7 (Doutorado). State University of Missouri Missouri, Columbia, EUA.
- 8 BAËTA, F. C.; SOUZA, C. F. **Ambiência em edificações rurais - conforto**
9 **animal**. Viçosa: Editora da UFV, 1997. 246.
- 10 BAI, W.; ZHANG, X. Nucleus or cytoplasm? The mysterious case of SIRT1's
11 subcellular localization. **Cell Cycle**, v. 15, n. 24, p. 3337-3338, Dec 16 2016.
- 12 BARBOSA, O. R.; DAMASCENO, J. C. **Bioclimatologia e bem estar animal**
13 **aplicados a bovinocultura de leite**. 2002. Universidade Estadual de
14 Maringá, Maringá - PR.
- 15 BAUR, J. A. et al. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and
16 lifespan? **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 6, p. 443-461, Jun 1 2012.
- 17 BEACHY, S. H. et al. Engineering secretable forms of chaperones for immune
18 modulation and vaccine development. **Methods**, v. 43, n. 3, p. 184-193, 2007.
- 19 BILBY, T. R.; TATCHER, W. W.; HANSEN, P. J. **Estratégias farmacológicas,**
20 **nutricionais e de manejo para aumentar a fertilidade de vacas leiteiras sob**
21 **estresse térmico**. Anais do XIII Curso Novos Enfoques na Produção e
22 Reprodução de Bovinos. Uberlândia 59-71 p. 2009.
- 23 BLOCK, J.; CHASE, C. C., JR.; HANSEN, P. J. Inheritance of resistance of
24 bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the
25 maternal versus paternal contribution. **Mol Reprod Dev**, v. 63, n. 1, p. 32-37,
26 Sep 2002.
- 27 BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J. B. Temperature-humidity indices as
28 indicators of milk production losses due to heat stress. **J Dairy Sci**, v. 90, n. 4,
29 p. 1947-1956, Apr 2007.
- 30 BROWN-BRANDL, T. M. et al. Dynamic Response Indicators of Heat Stress in
31 Shaded and Non-shaded Feedlot Cattle, Part 1: Analyses of Indicators.
32 **Biosystems Engineering**, v. 90, n. 4, p. 451-462, 2005.
- 33 BUFFINGTON, E. D. et al. Black Globe-Humidity Index (BGHI) as Comfort
34 Equation for Dairy Cows. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, MI, v. 24, n.
35 3, p. 711, 1981.
- 36 BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines.
37 **Cell**, v. 92, n. 3, p. 351-366, Feb 6 1998.
- 38 CAMARGO, L. S. et al. Developmental competence and expression of the Hsp
39 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a
40 tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 626-632, Sep 1 2007.
- 41 CAMPBELL, B. K. et al. Ovarian autografts in sheep as a model for studying
42 folliculogenesis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 163, n. 1-2, p. 131-139, May 25 2000.
- 43 CASTRO, S. V. et al. Proteínas de choque térmico Hsp 70: estrutura e atuação
44 em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, p. 261-271,
45 2013.
- 46 CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. C. p53 e as hemopatias
47 malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.
- 48 CHEN, B. et al. The chemical biology of sirtuins. **Chem Soc Rev**, v. 44, n. 15,
49 p. 5246-5264, Aug 7 2015.

- 1 COLLIER, R. J.; DAHL, G. E.; VANBAALE, M. J. Major advances associated
2 with environmental effects on dairy cattle. **J Dairy Sci**, v. 89, n. 4, p. 1244-1253,
3 Apr 2006.
- 4 CRUZ, L. V. et al. Efeitos do estresse térmico na produção leiteira: Revisão de
5 literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. IX, n. 16,
6 2011.
- 7 CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro:
8 Guanabara Koogan, 2004. 579.
- 9 DA SILVA, V. C.; RAMOS, C. H. The network interaction of the human cytosolic
10 90 kDa heat shock protein Hsp90: A target for cancer therapeutics. **J**
11 **Proteomics**, v. 75, n. 10, p. 2790-2802, Jun 6 2012.
- 12 DAUGAARD, M.; ROHDE, M.; JAATTELA, M. The heat shock protein 70 family:
13 Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS Lett**,
14 v. 581, n. 19, p. 3702-3710, Jul 31 2007.
- 15 DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on
16 reproduction in the dairy cow--a review. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1139-
17 1151, Oct 1 2003.
- 18 DI EMIDIO, G. et al. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative
19 stress and is deregulated during aging. **Human Reproduction**, v. 29, n. 9, p.
20 2006-2017, 2014.
- 21 DIKMEN, S.; HANSEN, P. J. Is the temperature-humidity index the best
22 indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? **J**
23 **Dairy Sci**, v. 92, n. 1, p. 109-116, Jan 2009.
- 24 DUL, J. L. et al. Hsp70 and antifibrillogenic peptides promote degradation and
25 inhibit intracellular aggregation of amyloidogenic light chains. **J Cell Biol**, v.
26 152, n. 4, p. 705-716, Feb 19 2001.
- 27 EBERHARDT, B. G. et al. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs.
28 *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus*
29 and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Anim Reprod Sci**,
30 v. 114, n. 1-3, p. 54-61, Aug 2009.
- 31 EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and
32 preimplantation embryos to heat shock. **Mol Reprod Dev**, v. 46, n. 2, p. 138-
33 145, Feb 1997.
- 34 EDWARDS, J. L. et al. Exposure to a physiologically relevant elevated
35 temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. **J Dairy Sci**, v. 88, n.
36 12, p. 4326-4333, Dec 2005.
- 37 FAÇANHA, D. A. E. et al. Tendências metodológicas para avaliação da
38 adaptabilidade ao ambiente tropical. **Revista Brasileira de saúde e produção**
39 **animal**, v. 14, n. 1, p. 91-103, 2013.
- 40 FACÓ, O. et al. Análise do Desempenho Produtivo de Diversos Grupos
41 Genéticos Holandês x Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n.
42 5, p. 1944-1952, 2002.
- 43 FERREIRA, F. et al. Parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e
44 hormonais de bovinos submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de**
45 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 769-776, 2009.
- 46 FERREIRA, M. G. C. R. et al. Follicular dynamics of induced estrus of females
47 from the Pantaneira breed. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 11, n. 2, p. 133-136,
48 2017.

- 1 FERREIRA, R. M. et al. The low fertility of repeat-breeder cows during summer
2 heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **J**
3 **Dairy Sci**, v. 94, n. 5, p. 2383-2392, May 2011.
- 4 FIALHO, A. L. L. et al. Efeito do estresse térmico calórico agudo e crônico
5 sobre a qualidade oocitária de bovinos de raças adaptadas. **Arquivo Brasileiro**
6 **de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.1, p.64-72, 2018.
- 7 FULKA, J., JR.; FIRST, N. L.; MOOR, R. M. Nuclear and cytoplasmic
8 determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Mol**
9 **Hum Reprod**, v. 4, n. 1, p. 41-49, Jan 1998.
- 10 FULLER, K. J. et al. Cancer and the heat shock response. **Eur J Cancer**, v.
11 30a, n. 12, p. 1884-1891, 1994.
- 12 GARCÍA-ISPIERTO, I. et al. Climate factors affecting conception rate of high
13 producing dairy cows in northeastern Spain. **Theriogenology**, v. 67, n. 8, p.
14 1379-1385, 2007.
- 15 GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. The influence of nutrition on fertility in dairy
16 cows. In: GARNSWORTHY, P. C. e WISEMAN, J. (Ed.). **Recent Advances in**
17 **Animal Nutrition**. Nottingham: Nottingham University press, 1999. p.39-58.
- 18 GILAD, E. et al. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced
19 gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of
20 cyclic cows. **J Reprod Fertil**, v. 99, n. 2, p. 315-321, Nov 1993.
- 21 GIRALT, A.; VILLARROYA, F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions:
22 metabolism, cell death and aging. **Biochem J**, v. 444, n. 1, p. 1-10, May 15
23 2012.
- 24 GRABOWSKA, W.; SIKORA, E.; BIELAK-ZMIJEWSKA, A. Sirtuins, a promising
25 target in slowing down the ageing process. **Biogerontology**, v. 18, n. 4, p. 447-
26 476, Aug 2017.
- 27 GREGORETTI, I. V.; LEE, Y. M.; GOODSON, H. V. Molecular evolution of the
28 histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. **J**
29 **Mol Biol**, v. 338, n. 1, p. 17-31, 2004.
- 30 GUPTA, S. C. et al. Induction of hsp70, alterations in oxidative stress markers
31 and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila*
32 *melanogaster*: modulation by reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**,
33 v. 1770, n. 9, p. 1382-1394, Sep 2007.
- 34 HANSEN, P. J. Managing the heat-stressed cow to improve reproduction. 7th
35 Western Dairy Management Conference., 2005. p.9-11.
- 36 HANSEN, P. J. **Manejo da vaca de leite durante o estresse calórico para**
37 **aumento da eficiência reprodutiva. XI curso novos enfoques na produção e**
38 **reprodução de bovinos**. Uberlândia - MG. 11: 3-12 p. 2007.
- 39 HEAD, H. H. Management of dairy cattle in tropical and subtropical
40 environments., Congresso Brasileiro de Biometeorologia., 1995, Jaboticabal.
41 SSBiomet. p.26-68.
- 42 HODGSON, S. V.; MAHER, E. R. **Human cancer genetics**. United Kingdom:
43 Cambridge University Press, 1999. 336.
- 44 HOODA, O. K.; SINGH, G. Effect of thermal stress on feed intake, plasma
45 enzymes and blood biochemicals in buffalo heifers. **Indian Journal of Animal**
46 **Nutrition**, v. 27, n. 2, p. 122-127, 2010.
- 47 HOUTKOOPER, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of
48 metabolism and healthspan. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 225-238,
49 03/07 2012.

- 1 JASNIC, N. et al. The effect of acute heat exposure on rat pituitary corticotroph
2 activation: the role of vasopressin. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 48, n. 4, p.
3 507-512, Dec 2010.
- 4 KADOKAWA, H.; SAKATANI, M.; HANSEN, P. J. Perspectives on improvement
5 of reproduction in cattle during heat stress in a future Japan. **Anim Sci J**, v. 83,
6 n. 6, p. 439-445, Jun 2012.
- 7 KADZERE, C. T. et al. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock
8 Production Science**, v. 77, n. 1, p. 59-91, 2002.
- 9 KAWARSKY, S. J.; KING, W. A. Expression and localisation of heat shock
10 protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. **Zygote**, v. 9, n. 1, p. 39-50,
11 Feb 2001.
- 12 KHALED, W. T. et al. BCL11A is a triple-negative breast cancer gene with
13 critical functions in stem and progenitor cells. **Nature Communications**, v. 6, p.
14 5987, 2015.
- 15 LEE, C. N. Environmental stress effects on bovine reproduction. **Vet Clin North
16 Am Food Anim Pract**, v. 9, n. 2, p. 263-273, Jul 1993.
- 17 LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88,
18 n. 3, p. 323-331, Feb 7 1997.
- 19 LI, F. P. et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res**,
20 v. 48, n. 18, p. 5358-5362, Sep 15 1988.
- 21 LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery:
22 conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochim Biophys
23 Acta**, v. 1823, n. 3, p. 624-635, Mar 2012.
- 24 LI, Q. et al. Characterization and expression of DDX6 during gametogenesis in
25 the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 2, p. 4420-
26 4437, Apr 30 2015.
- 27 LIBEREK, K.; LEWANDOWSKA, A.; ZIETKIEWICZ, S. Chaperones in control of
28 protein disaggregation. **Embo j**, v. 27, n. 2, p. 328-335, Jan 23 2008.
- 29 LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annu Rev Genet**, v.
30 22, p. 631-677, 1988.
- 31 LIU, P. et al. Bcl11a is essential for normal lymphoid development. **Nat
32 Immunol**, v. 4, n. 6, p. 525-532, Jun 2003.
- 33 LOPES, R. T. **Potencial leiteiro de vacas primíparas da raça Pantaneira
34 mantidas em regime de confinamento e alimentadas com diferentes níveis
35 de concentrado**. 2014. (Mestrado). Universidade Estadual do Mato Grosso do
36 Sul, Aquidauana - MS.
- 37 LOPEZ-GATIUS, F. et al. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle:
38 risk factors and effects. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1298-1307, Mar 15
39 2005.
- 40 MADER, T. L.; JOHNSON, L. J.; GAUGHAN, J. B. A comprehensive index for
41 assessing environmental stress in animals. **Journal Animal Science**, v. 88, n.
42 6, p. 2153-2165, Jun 2010.
- 43 MAHLKNECHT, U.; ZSCHOERNIG, B. Involvement of sirtuins in life-span and
44 aging related diseases. **Adv Exp Med Biol**, v. 739, p. 252-261, 2012.
- 45 MALOYAN, A.; PALMON, A.; HOROWITZ, M. Heat acclimation increases the
46 basal HSP72 level and alters its production dynamics during heat stress. **The
47 American Journal Physiology**, v. 276, n. 5 Pt 2, p. R1506-1515, May 1999.
- 48 MARTELLO, L. S. **Interação animalambiente: efeito do ambiente climático
49 sobre as respostas fisiológicas e produtivas de vacas Holandesas em
50 freestall**. 2006. 165 (Doutorado). Universidade de São Paulo, Pirassununga.

- 1 MARTELLO, L. S.; SAVASTANO JR., H.; PINHEIRO, M. G. Avaliação do
2 microclima de instalações para gado de leite com diferentes recursos de
3 climatização. **Engenharia Agrícola**, v. 24, n. 2, p. 263-273, 2004.
- 4 MATARAZZO, S. V. et al. Intermittência do sistema de resfriamento adiabático
5 evaporativo por aspersão em instalação para vacas em lactação. **Engenharia**
6 **Agrícola**, v. 26, p. 654-662, 2006.
- 7 MATWEE, C. et al. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in
8 fertilization and embryo development. **MHR: Basic science of reproductive**
9 **medicine**, v. 7, n. 9, p. 829-837, 2001.
- 10 MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular
11 mechanism. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 6, p. 670-684, Mar 2005.
- 12 MAZZA, M. C. M. et al. **Etnobiologia e Conservação do Bovino Pantaneiro**.
13 1994. 61.
- 14 MEYER, T. N.; SILVA, A. L. D. Resposta celular ao estresse. **Revista da**
15 **Associação Médica Brasileira**, v. 45, p. 181-188, 1999.
- 16 MICHAN, S.; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological
17 function. **Biochem J**, v. 404, n. 1, p. 1-13, May 15 2007.
- 18 MIHALAS, B. P. et al. Molecular Mechanisms Responsible for Increased
19 Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage. **Oxid Med Cell**
20 **Longev**, v. 2017, p. 4015, 2018.
- 21 MORRIS, K. C. et al. Pathways for ischemic cytoprotection: Role of sirtuins in
22 caloric restriction, resveratrol, and ischemic preconditioning. **Journal of**
23 **Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 31, n. 4, p. 1003-1019, 2012.
- 24 MOSSER, D. D. et al. Role of the human heat shock protein hsp70 in
25 protection against stress-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**,
26 v. 17, n. 9, p. 5317-5327, 1997.
- 27 MOTA, R. R. **Avaliação genética do crescimento de bovinos da raça**
28 **simental utilizando modelos multicaracterísticos e de regressão aleatório**.
29 2012. (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- 30 MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Hazardous effects
31 of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein
32 expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila*
33 *melanogaster* (hsp70-lacZ). **Environ Health Perspect**, v. 111, n. 16, p. 1926-
34 1932, Dec 2003.
- 35 NABENISHI, H. et al. The effects of cysteine addition during in vitro maturation
36 on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine
37 oocytes exposed to heat stress. **Zygote**, v. 20, n. 3, p. 249-259, Aug 2012.
- 38 NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt
39 6, p. 833-838, Mar 15 2011.
- 40 NWSCR. National Weather Service Central Region - Livestock hot weather
41 stress. 1976. Acesso em: 09/01.
- 42 OKAMOTO, N. et al. Effects of Maternal Aging on Expression of Sirtuin Genes
43 in Ovulated Oocyte and Cumulus Cells. **Journal of Mammalian Ova**
44 **Research**, v. 30, n. 1, p. 24-29, 2013.
- 45 OLIVEIRA, J. H. F.; MAGNABOSCO, C. U.; BORGES, A. M. S. M. **Nelore:**
46 **base genética e evolução seletiva no Brasil**. Planaltina: Doc 49 2002.
- 47 OLIVEIRA JR., L. P. **INDUÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS DE CHOQUE**
48 **TÉRMICO (HSP) MEDIADA PELO ÓXIDO NÍTRICO EM RESPOSTA AO**
49 **EXERCÍCIO DE RESISTÊNCIA**. 2005. 108 Universidade Federal do Rio
50 Grande do Sul, Porto Alegre.

- 1 OLIVEIRA, N. C. **Potencial leiteiro de vacas da raça pantaneira mantidas**
2 **em regime de pastoreio e suplementadas com farinha de bocaiúva**
3 **(*acrocomia aculeata*)**. 2015. 60 (Mestrado). Universidade Estadual do Mato
4 Grosso do Sul, Aquidauana - MS.
- 5 ORTEGA, M. S. et al. Modification of embryonic resistance to heat shock in
6 cattle by melatonin and genetic variation in HSPA1L. **J Dairy Sci**, v. 99, n. 11,
7 p. 9152-9164, Nov 2016.
- 8 OSBORNE, B.; COONEY, G. J.; TURNER, N. Are sirtuin deacylase enzymes
9 important modulators of mitochondrial energy metabolism? **Biochim Biophys**
10 **Acta**, v. 1840, n. 4, p. 1295-1302, 2014.
- 11 PAULA-LOPES, F. F. et al. Genetic divergence in cellular resistance to heat
12 shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot
13 climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues
14 and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 125, n.
15 2, p. 285-294, Feb 2003.
- 16 PAYNTON, B. V.; REMPEL, R.; BACHVAROVA, R. Changes in state of
17 adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte
18 maturation and early embryonic development in the mouse. **Dev Biol**, v. 129, n.
19 2, p. 304-314, Oct 1988.
- 20 PENNAROSSA, G. et al. Characterization of the Constitutive Pig Ovary Heat
21 Shock Chaperone Machinery and Its Response to Acute Thermal Stress or to
22 Seasonal Variations1. **Biol Reprod**, v. 87, n. 5, p. 111-119, 2012.
- 23 PEREIRA, J. C. C. **Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção**
24 **animal**. Belo Horizonte: 2005. 195.
- 25 PEREIRA, T. C. B. **Caracterização das sirtuínas frente a modelo de**
26 **inflamação em zebrafish e avaliação de parâmetros associados à**
27 **inflamação, apoptose e estresse oxidativo**. 2016. (Doutorado). Pontifícia
28 Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.
- 29 PERLMAN, S. et al. Transcriptome analysis of FSH and FSH variant
30 stimulation in granulosa cells from IVM patients reveals novel regulated genes.
31 **Mol Hum Reprod**, v. 12, n. 3, p. 135-144, Mar 2006.
- 32 PICCININI, P. S. et al. Expressão de heat shock protein 90 (Hsp90) em
33 músculo esquelético, adipócitos e placenta de gestantes com pré-eclâmpsia.
34 XVIII Salão de iniciação Científica 2006, Porto Alegre - RS. Univerisdade
35 Federal do Rio Grande do Sul.
- 36 PRATT, W. B.; MORISHIMA, Y.; OSAWA, Y. The Hsp90 Chaperone Machinery
37 Regulates Signaling by Modulating Ligand Binding Clefs. **J Biol Chem**, v. 283,
38 n. 34, p. 22885-22889, 2008.
- 39 PREUDHOMME, C.; FENAUX, P. The clinical significance of mutations of the
40 P53 tumour suppressor gene in haematological malignancies. **Br J Haematol**,
41 v. 98, n. 3, p. 502-511, Sep 1997.
- 42 PRODROMOU, C. The 'active life' of Hsp90 complexes. **Biochim Biophys**
43 **Acta**, v. 1823, n. 3, p. 614-623, Mar 2012.
- 44 RAVAGNOLO, O.; MISZTAL, I. Effect of Heat Stress on Nonreturn Rate in
45 Holsteins: Fixed-Model Analyses. **J Dairy Sci**, v. 85, n. 11, p. 3101-3106, 2002.
- 46 RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in
47 drosophila. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 571-573, 1962.
- 48 RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after
49 exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v.
50 121, n. 1, p. 107-115, Jan 2001.

- 1 ROBINSON, N. E. Homeostase—Termorregulação. In: CUNNINGHAM, J. G.
2 (Ed.). **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,
3 v.3, 2004. p.550-561.
- 4 ROE, S. M. et al. The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-
5 specific cochaperone p50(cdc37). **Cell**, v. 116, n. 1, p. 87-98, Jan 9 2004.
- 6 ROMANUCCI, M. et al. Heat shock protein expression in canine malignant
7 mammary tumours. **BMC Cancer**, v. 6, p. 171, Jun 27 2006.
- 8 ROTH, Z. et al. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-
9 sized and preovulatory bovine follicles. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 745-751,
10 May 2001.
- 11 RUAS, J. R. M. et al. Cria e cria da fêmea F1: Holandês x Zebu para
12 produção de leite. **EPAMIG Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n.
13 221, p. 40-46, 2004.
- 14 SAKAMOTO, T. M. et al. Increased adhesive and inflammatory properties in
15 blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. **Microvasc**
16 **Res**, v. 90, p. 173-179, Nov 2013.
- 17 SAKATANI, M. et al. Consequences of physiological heat shock beginning at
18 the zygote stage on embryonic development and expression of stress response
19 genes in cattle. **J Dairy Sci**, v. 95, n. 6, p. 3080-3091, Jun 2012.
- 20 SANKARAN, V. G. et al. Developmental and species-divergent globin switching
21 are driven by BCL11A. **Nature**, v. 460, n. 7259, p. 1093-1097, Aug 27 2009.
- 22 SANTORO, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response.
23 **Biochem Pharmacol**, v. 59, n. 1, p. 55-63, Jan 1 2000. ISSN 0006-2952 (Print)
- 24 SARTORI, R. et al. Fertilization and early embryonic development in heifers
25 and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J Dairy Sci**,
26 v. 85, n. 11, p. 2803-2812, Nov 2002.
- 27 SCHIRLING, M.; TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.-R. Variation in stress protein
28 levels (hsp70 and hsp90) in relation to oocyte development in *Gammarus*
29 *fossarum* (Koch 1835). **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 45, n.
30 2, p. 161-167, 2004/07/01 2004.
- 31 SCHMITT, E.; MENEZES, L. M.; ROSA, F. T. **Nutrição de ruminantes e raças**
32 **bovinas**. PELOTAS, U. F. D. Pelotas: NUPEEC 2011.
- 33 SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed
34 domestic ruminants. **Livestock Production Science**, v. 67, n. 1, p. 1-18, 2000.
35 Disponível em:
36 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301622600001627> >.
- 37 SILVA, I. J. O. et al. Efeitos da climatização do curral de espera na produção
38 de leite de vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 2036-
39 2042, 2002. Disponível em:
40 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982002000800019&nrm=iso)
41 [35982002000800019&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982002000800019&nrm=iso) >.
- 42 SILVA, R. G. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo: 2000. 286.
- 43 SINGH, C. K. et al. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling.
44 **Antioxid Redox Signal**, Oct 20 2017.
- 45 SOARES, T. J. C. **Sirtuínas**. 2014. 30 (Mestrado). Instituto de Ciências Abel
46 Salazar, Universidade do Porto, Porto.
- 47 SOUZA, B. B.; BATISTA, N. L. Os efeitos do estresse térmico sobre a fisiologia
48 animal. **Agropecuária científica no semiárido**, v. 8, n. 3, p. 6-10, 2012.

- 1 SOUZA, B. B. et al. Efeito do ambiente sobre as respostas fisiológicas de
2 caprinos saanen e mestiços ½saanen+ ½boer no semi-árido paraibano.
3 **Agropecuária científica no semiárido**, v. 6, n. 2, p. 47-51, 2010.
- 4 SOUZA, C. F. et al. Avaliação de materiais alternativos para confecção do
5 termômetro de globo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 1, p. 157-164, 2002.
- 6 STUNKEL, W.; CAMPBELL, R. M. Sirtuin 1 (SIRT1): the misunderstood HDAC.
7 **J Biomol Screen**, v. 16, n. 10, p. 1153-1169, Dec 2011. ISSN 1087-0571.
- 8 TATONE, C.; DI EMIDIO, G. Sirtuin Functions in Female Fertility: Possible Role
9 in Oxidative Stress and Aging. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 659687,
10 2015a.
- 11 TATONE, C.; DI EMIDIO, G. Sirtuin Functions in Female Fertility: Possible Role
12 in Oxidative Stress and Aging. v. 2015, p. 659687, 2015b.
- 13 THOM, E. C. The discomfort index. **Weatherwise**, v. 12, p. 57-61, 1959.
- 14 THOMPSON, J. G.; LANE, M.; GILCHRIST, R. B. Metabolism of the bovine
15 cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental
16 competence. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 64, p. 179-190, 2007.
- 17 TOMANEK, L.; SOMERO, G. N. Interspecific- and acclimation-induced variation
18 in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock
19 transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus *Tegula*):
20 implications for regulation of hsp gene expression. **Journal of Experimental**
21 **Biology**, v. 205, n. 5, p. 677-685, 2002. Disponível em: <
22 <http://jeb.biologists.org/content/jexbio/205/5/677.full.pdf> >.
- 23 TORRES-JUNIOR, J. R. S. et al. Effect of maternal heat-stress on follicular
24 growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, n.
25 2, p. 155-166, 2008.
- 26 UDA, M. et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with
27 persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-
28 thalassemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 5, p. 1620-1625, Feb 5
29 2008.
- 30 VAN SOOM, A. et al. Gamete origin in relation to early embryo development.
31 **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S131-137, Sep 1 2007.
- 32 VASAIKAR, S. V. et al. HSP70 mediates survival in apoptotic cells-Boolean
33 network prediction and experimental validation. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p.
34 319, 2015.
- 35 VELAZQUEZ, M. M. L. et al. Heat shock protein patterns in the bovine ovary
36 and relation with cystic ovarian disease. **Anim Reprod Sci**, v. 118, n. 2, p. 201-
37 209, 2010. Disponível em:
38 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432009002140>>.
- 39 WANG, W. et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones
40 in the abiotic stress response. **Trends Plant Sci**, v. 9, n. 5, p. 244-252, May
41 2004.
- 42 WANG, X. et al. HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer
43 therapy (Review). **Int J Oncol**, v. 45, n. 1, p. 18-30, Jul 2014.
- 44 WEBB, R. et al. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional
45 influences. **J Anim Sci**, v. 82, n. 13, p. 63-74, 2004.
- 46 WEBB, R. et al. Mechanisms regulating follicular development and selection of
47 the dominant follicle. **Reprod Suppl**, v. 61, p. 71-90, 2003.
- 48 WELCH, W. J.; FERAMISCO, J. R. Purification of the major mammalian heat
49 shock proteins. **J Biol Chem**, v. 257, n. 24, p. 14949-14959, Dec 25 1982.

- 1 WESTERHEIDE, S. D. et al. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1
2 by the deacetylase SIRT1. **Science**, v. 323, n. 5917, p. 1063-1066, Feb 20
3 2009.
- 4 WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-
5 stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 535-
6 547, Jul 2 2000.
- 7 XU, J. et al. Transcriptional silencing of {gamma}-globin by BCL11A involves
8 long-range interactions and cooperation with SOX6. **Genes Dev**, v. 24, n. 8, p.
9 783-798, Apr 15 2010.
- 10 YADAV, A. et al. Effect of physiologically relevant heat shock on development,
11 apoptosis and expression of some genes in buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos
12 produced in vitro. **Reprod Domest Anim**, v. 48, n. 5, p. 858-865, Oct 2013.
- 13 YANAGI JUNIOR, T. Inovações tecnológicas na bioclimatologia animal visando
14 a aumento da produção animal: relação bem-estar animal x clima., Infobibos:
15 Informações tecnológicas, 2006. Disponível em:
16 <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/ITBA/Index.ht>. Acesso em: 09/01.
- 17 ZERON, Y. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental
18 competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of
19 follicles. **Reproduction**, v. 121, n. 3, p. 447-454, Mar 2001. ISSN 1470-1626
- 20 ZHANG, L. et al. Sirtuin Inhibition Adversely Affects Porcine Oocyte Meiosis.
21 **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132941, 2015.
- 22

1 3. HIPÓTESE

2

3 O estresse térmico promove alterações moleculares em oócitos e embriões
4 bovinos, além de alterar padrões fisiológicos e reprodutivos em fêmeas
5 adaptadas as trópicos.

6

1 4. OBJETIVOS

2

3 4.1. OBJETIVO GERAL

4 Avaliar a influência de mudanças moderadas de temperatura durante
5 a maturação de oócitos *in vitro* sobre a competência de desenvolvimento do
6 embrião e a influência do estresse térmico sobre parâmetros fisiológicos,
7 moleculares e reprodutivos de fêmeas bovinas

8

9 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

10 Investigar a influência das mudanças de temperatura durante a
11 maturação *in vitro* na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos, da
12 raça Simental, bem como a expressão e abundância de sirtuínas e proteínas
13 BCL11a1 e p53.

14 Investigar a influência das mudanças de temperatura durante a
15 maturação *in vitro* de oócitos, bem como a produção de embriões e a abundância
16 de HSPs 70 e 90 em bovinos da raça Nelore.

17 Avaliar a influência do estresse térmico sobre parâmetros fisiológicos,
18 viabilidade oocitária e presença de HSP 70 e 90 em oócitos de raças adaptadas
19 aos trópicos.

20

5. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

5.1. ARTIGO 1 - Molecular Reproduction and Development

Effect of thermal stress on the maturation of bovine oocytes on the in vitro production of embryos and expression of genes related to the stress response

Pöhland, R^{1*}; Souza-Cácares, MB^{2*}; Datta, TK³; Tomek, W¹; Vanselow, J¹; Martins, MIM²; Silva, WAL⁴; Cardoso, C.J.T.⁴; Melo-Sterza, FA^{5}**

¹Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Institute of Reproductive Biology, Dummerstorf, Germany

²State University of Londrina, Animal Science, Londrina, Paraná, Brazil

³National Dairy Research Institute, Animal Biotechnology Centre, Karnal, Haryana, India

⁴Federal University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

⁵State University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brazil.

*These authors contributed equally to this work

**Correspondence: Fabiana de Andrade Melo Sterza, State University of Mato Grosso do Sul (UEMS), Animal Science, Aquidauana, Rodovia Aquidauana - UEMS, Km 12, Mato Grosso do Sul, Brazil, Email: fabiana.sterza@uems.br

Abstract

With the objective of investigating the influence of temperature changes during in vitro maturation on the development competence of bovine oocytes, as well as the expression and abundance of sirtuins and proteins involved in inflammatory processes. The cumulus-oocyte complex (COCs) of simian cows matured in vitro at different temperatures (37°C, 38.5°C e 40°C). Before maturation, the oocytes were stained with Cresilblue Brilliant (BCB) and then categorized as labeled BCB (BCB+) and unlabelled BCB (BCB-). After maturation, in vitro embryos were produced and the oocytes were evaluated for the extrusion rate of the polar body, and also undergoing real-time PCR and immunofluorescence, to determine the sirtuins, BCL11A and p53. The different maturation temperatures did not significantly influence the proportion of oocytes that had the first polar corpuscle and the cleavage rate in Simental animals, however, there were significant differences in the rate of blastocysts. COCs matured at 38.5 ° C (control) had the highest blastocyst rate (37%), in contrast to that at 37 ° C and 40 ° C, which showed a partially significant reduction in the blastocyst rate (33.2% and 21.5%). In all three maturation groups, the blastocyst rates were higher for BCB+ oocytes than for BCB-oocytes. In BCB+ oocytes the expression of SIRT1, SIRT2, SIRT3 and SIRT5 genes were higher after maturation than before maturation. The maturation temperature proved to have an effect on the expression of SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5 and BCL11a1 genes in BCB+ oocytes. When the cumulus cells were evaluated, only the SIRT2 gene had no effect on temperature in BCB+ oocytes. And cumulus cells from BCB- oocytes had a temperatem effect only on the SIRT3 gene. In summary, the change in temperature ($\pm 1.5^{\circ}\text{C}$) of oocyte maturation adversely affects the blastocyst rate after in vitro fertilization, in addition to influencing gene expression important for cell protection.

Keywords: Embryo, In vitro maturation, Simmental, Sirtuins, Temperature.

1 **Introduction**

2 Climate is one of the environmental components that has the greatest
3 influence on animal welfare (Pereira 2005), negatively influencing the health,
4 reproduction and production of milk (Bilby et al. 2009; Sartori et al. 2002). The
5 combination of all environmental factors characterize animal comfort or thermal stress.
6 Thermal stress leads to adverse effects on animal production and reproduction (García-
7 Ispuerto et al. 2007; Piccand et al. 2013), resulting in serious economic problems and
8 compromising animal welfare.

9 The first response of an organism to any environmental stress happens
10 biochemically, which implies all the effects of a higher organizational level (Lindquist
11 and Craig 1988). The stress response comprises the action of (Michan and Sinclair 2007),
12 HSPs and other proteins and protein complexes. Sirtuins are important regulators of a
13 wide variety of cellular and physiological processes, such as stress response, genome
14 stability, apoptosis, cell survival, metabolism, among others (Michan and Sinclair 2007).
15 The sirtuins also participate in the regulation of several pathologies, such as neoplasias
16 and inflammatory diseases (Michan and Sinclair 2007).

17 Histones are known to play a role in the structure of chromatin, being essential
18 for gene expression. Thus, modifications of acetylation, deacetylation and
19 phosphorylation of histones may result in repression or increase of transcription genes
20 (Jenuwein and Allis 2001). These modifications are controlled by histone deacetylase
21 (HDAC) and histone acetyltransferase (HAT) enzymes. Any mismatch in this system can
22 cause damage to the development of the oocyte or embryo, and lead to the appearance of
23 diseases (Taddei et al. 2005). SIRT, for example, belongs to the NAD-dependent histone
24 deacetylase family and is involved in regulating the activation of transcription and
25 apoptosis related to the p53 (tumor suppressor gene) (Blander and Guarente 2004). In
26 addition, in stressed cells, SIRT1 promotes cell survival by inhibiting p53-dependent
27 apoptosis. This sirtuin can directly modify the cellular chromatin, silence the gene
28 transcription, modulate the meiotic point and promote anti-aging effect (Luo et al. 2001;
29 Voelter-Mahlknecht and Mahlknecht 2006), thus directly influencing oocyte quality and
30 embryo development.

31 The study of sirtuins made remarkable progress and expanded knowledge
32 about these molecules. However, understanding about the biology and mechanisms of
33 sirtuins is still far from complete and many questions still need to be answered. Emerging
34 from sirtuin research there is a growing realization that they are a very complex biological

1 response system, which influences many other regulatory molecules and signaling
2 pathways (Soares 2014).

3 Thus, the objective of this study was to investigate the influence of
4 temperature changes during in vitro maturation on bovine oocyte developmental
5 competence, as well as the expression and abundance of sirtuins and proteins BCL11a1
6 and p53.

7

8 **Material and Methods**

9 The experiment was conducted at the Leibniz Institute for Farm Animal
10 Biology (FBN) in Dummerstorf - Germany.

11

12 *Animals*

13 Ovaries from Simmental (*Bos taurus taurus*) were used, which came from
14 commercial properties in Germany (Franconia) and were slaughtered in a commercial
15 slaughterhouse during the months of January to March 2017. The ovaries collected were
16 transported to the laboratory within 3 hours on PBS plus antibiotics (37°C).

17

18 *In vitro maturation of oocytes*

19 The follicles were aspirated with a syringe (18G needle) and transferred to
20 petri dishes (PBS, 0.3% w / v BSA, pyruvate, heparin, penicillin and streptomycin). We
21 used only COCs classified by stereomicroscopy as grade 1 or 2 (Alm et al. 2005).

22 The selected COCs were stained by Cresilblue Brilliant (BCB) as described
23 in the literature (Alm et al. 2005; Lima et al. 2016) and then categorized as BCB (BCB
24 +) and BCB (BCB) labeled. COC maturation was performed on a 4-well plate with 420
25 µl of maturation medium (TCM199 with Earl salts, 5% v / v estrus cow serum, 0.5 ng /
26 ml estradiol, 0.01 mIE / ml HCG, 200 mM L-glutamine, 0.01 mg / ml streptomycin, 10
27 U / ml penicillin) under mineral oil in incubators (Heracell™, ThermoScientific, Bonn,
28 Germany) with 5% CO₂, and different temperatures (37°C, 38,5°C (control) and 40°C)
29 for 24 hours. A group of immature oocytes was not matured to be used as comparison
30 samples.

31 The mature COCs, after evaluation of the presence of the polar body, were
32 washed (1x) and transferred to fertilization medium (supplemented with heparin with
33 TALP medium, 6 mg / ml BSA). Simmental cryopreserved semen was used for in vitro

1 embryo production. The mobile spermatozoa were separated by the Swim-up method and
2 fertilization was performed at the final concentration of 1×10^6 sperm / ml. COCs and
3 sperm were co-incubated for 22 hours at maximum humidity, 38.5°C and 5% CO₂. After
4 washing, the zygotes were transferred to 4 well plates containing medium SOF (Minitüb,
5 Tiefenbach, Germany, 10% v / v estral cow serum). Embryo culture was performed at
6 39° C in 5% CO₂, 5% O₂ and maximum moisture.

7 8 *Preparation of DNA, RNA and cDNA synthesis*

9 Total RNA from the oocytes and cumulus cell samples were isolated with the
10 Nucleo Spin® RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the
11 manufacturer's instructions. Therefore, matured and unmaturred COCs were separated
12 mechanically (frequent pipetting, 100 ml automatic pipette) into naked oocytes and
13 cumulus cells. The pure Oocytes were removed and washed (3x) in PBS. 30 Oocytes per
14 group (3 repetitions) were transferred with a minimum (smallest possible, not more than
15 5 µl) of PBS into lysis buffer. The cumulus cells belonging to the respective oocytes were
16 group wise collected and washed (3x) in PBS. The precipitates of the last washing steps
17 were resuspended in lysis buffer. RNA concentration was measured with a
18 NanoDrop1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Bonn, Germany). Synthesis of
19 cDNA was performed with M-MLVreverse transcriptase and RNasin ribonuclease
20 inhibitor (M3683 and N2515, Promega Mannheim, Gemany) using oligo-(dT) primers (2
21 ng / µl, #10814270001) mixed with random hexamer primers (4 ng / µl, #11034731001;
22 both Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's advice. Afterwards,
23 cDNA was cleaned with the High Pure PCR Purification Kit (#11732676001, Roche) and
24 eluted in 115 µl elution buffer.

25 26 *Real-time quantitative PCR*

27 Real-time PCR was performed with SensiFast™ SYBR No-ROX (# BIO-98020,
28 Bioline, Luckenwalde, Germany) and gene-specific primers (Table 1). Each transcript
29 was quantitated in triplicate on a LightCycler® 480 instrument (Roche) with the
30 following cycle conditions: preincubation at 95°C for 5 min, 40 denaturation cycles at
31 95°C for 20 sec, annealing at 60°C for 15s, extension at 72°C for 15s and acquisition of
32 single point fluorescence for 10s. The analysis of the melting points of all samples was
33 done to ensure the amplification of correct products. The length of the PCR products was

1 checked after each run by agarose gel electrophoresis (3%, stained with ethidium
2 bromide). Initially, all amplifications were sequenced to verify authenticity. The cloned
3 PCR products of the studied transcripts were used as external standards. Fresh dilutions
4 of these were used to obtain five different concentrations of standards (5×10^{-12} - 5×10^{-16}
5 g DNA / reaction) that were co-amplified. Levels of transcript abundance were
6 generally normalized to the transcripts of RPS18.

7

Table 3- Primer sequences used for rtPCR

Name	Sequence	RefSeq	Bp
SIRT1F	TGGTTCCTTTGCAACAGCATCTTGC	NM_001192980.1	100
SIRT1R	AGGACATCGAGGAACACCTGATT		
SIRT2F	ACTTACAGCTCTTTTCTGGGGAGCT	NM_001113531.1	400
SIRT2R	TTTCAGAGTTGGAGGCAGAGGCG		
SIRT3F	ACACCAGAGGTTACTTGGGAGTCAC	NM_001206669.1	100
SIRT3R	GTGTCCTGGTTCAGCCACAATTTGT		
SIRT4F	TCTGACCGAGGCTTACCAACTGTA	NM_001075785.1	100
SIRT4R	AACTCCTGAGCTCTGAAACCTGCT		
SIRT5F	TGTGGATGGTGAGCCAAATACTGGA	NM_001034295.2	100
SIRT5R	CTGTTGCTTCCAAGTCCCCATCAA		
TP53F	TCTCCACAGCCAAAGAAGAAACCAC	NM_174201.2	100
TP53R	AGGCATCATTCAGCTCTCGGAACA		
BCL11aF	ATGCCCCGCAGGGTATTTGTAAAG	NM_001076121.1	100
BCL11aR	TGTGCGTGTGCAAGAGAAACCA		
RPS18 forward	GAGGTGGAACGTGTGATCACCATT		
RPS18 reverse	TGTATTTCCCGTCCTTCACGTCCT		

8

9 *Immunofluorescence*

10 The mature COCs, oocytes and cumulus cells were partially but not completely
11 separated (frequent pipetting) under microscopic control. The resulting complexes (20
12 per group, 3 replicates) were washed (3x) in PBS and fixed in 3% v / v Paraformaldehyde
13 + 2% w / v Sucrose in PBS (4°C, 4h).

14 The complexes were washed in wash buffer (TBS + 0.5% v / v + 0.05% v / v Triton
15 X100) for 10 min at room temperature and permeabilized in permeabilization buffer (20
16 mM HEPES, sucrose 300 mM, 50 mM NaCl 3 mM MgCl₂, 0.5% v / v Triton X100, pH
17 7.4, 10 min, 0°C adjustment). After washing in wash buffer (5 min), the non-specific
18 binding was blocked by incubation with Roti® Block (Carl Roth, Karlsruhe, Germany;
19 1:50 in H₂O, 2 hours, room temperature). Immediately thereafter, incubation with the
20 first antibodies diluted in TBS (0.05% v / v Tween 20, 2% v / v Roti® Block) at 4 ° C

overnight (Table 2). COCs were then washed in wash buffer (4 x 10 min, room temperature) and incubated with the second appropriate antibody (Table 2) for 5 h in the dark at room temperature. The complexes were washed again (4x, wash buffer, room temperature) and the SYBR1 green-challenged nuclei (S-7563, Molecular Probes, Thermo Fisher, Dreieich, Germany) in a 1: 500 dilution in PBS. (1 hour, room temperature). After washing (wash buffer, 4x 10 min, room temperature) and a second fixation (2% v / v paraformaldehyde in PBS, 4°C overnight) the complexes were mounted on cover sheets with glycerin gelatin, cooled and stored in 4°C until microscopy.

Table 4 - Antibodies and dilutions of antibodies used for western blotting and immunofluorescence staining (more information: ABIN: Antibodies-Online, CST: CellSignaling Technology, A: Invitrogen / Thermo Fisher Scientific).

Proteína	Antibody ID	Description	immuno-fluorescence
BCL11A	ABIN462216	primary rabbit anti human BCL11A (polyclonal)	1:200
p53	ABIN184527	primary mouse anti bovine p53 (monoclonal)	1:100
Sirt1	ABIN729853	primary rabbit anti human SIRT1 (polyclonal)	1:100
Sirt2	ABIN493462	primary rabbit anti bovine SIRT2 (polyclonal)	1:100
2. Ab	A-11035	secondary goat anti rabbit Alexa® 546	1:100
2. Ab	A-32723	secondary goat anti mouse Alexa® 488	1:100

Confocal laser scanning microscopy

The stained COCs were analyzed using a laser scanning confocal microscope (LSM 5 Pascal) attached to an Axiovert 200M inverted microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). For the measurement of the red (AlexaFluor® 555) and green (SYBR®1, AlexaFluor® 488) fluorescence combinations, a multitrack procedure was used [Line 1: 488 nm of an argon laser (458, 488, 514 nm; mW), 505-530 nm filter; Lane 2: 543 nm line of a HeNe laser (543 nm, 1 mW), 560 nm long pass filter]. Stacks of images (40 images, $\Delta z = 4 \mu\text{m}$, 1024x1024 pixels) were recorded using a 40x lens (oil immersion) and software provided by Carl Zeiss. The distribution and intensities of the fluorescent staining were studied in the different compartments, oocytes and cumulus cells individually, by sieving the stacks of images. As a homogeneous approach, a level was selected on the cell, which revealed oocytes with the largest diameter (medium). At this

1 level, computer assisted analyzes were performed using ImageJ (open source) with a
 2 macro adapted to create two regions of interest (ROIs), one involving exactly the oocyte,
 3 the second involving the cumulus cells and reading the intensities (per channel) and x / y
 4 coordinates for each pixel in ROI (Poehland et al. 2008).

5

6 *Statistic*

7 The R (open source) software package was used to analyze the data and
 8 calculate the average intensities integrated by ROI. This method of evaluation is based
 9 on the methodology of Poehland et al. (2008). First, the normality of the data was
 10 evaluated by the Shapiro-Wilk test. Then, for parametric data, ANOVA was performed
 11 and when a significant difference was found, the Tukey test with 5% probability was
 12 performed. For non-parametric data, the Kruskal Wallis statistical test was performed
 13 with 5% probability (software R).

14

15 **Results**

16 *Oocyte maturation and early embryonic development*

17 The different temperatures under which maturation occurred did not
 18 significantly influence the proportion of oocytes that completed nuclear maturation, that
 19 is, that presented the first polar corpuscle (91.9 - 96.9%, $p = 0.7841$, Table 3). Even when
 20 the analysis took into account the quality of COCs (BCB+: better quality ($p=0.8453$) and
 21 BCB- (lower quality; $p=0.6543$) no influence of maturation temperature on nuclear
 22 maturation rate.

23

24 **Table 3** - Maturation success: percentage of oocytes with
 25 excluded first polar body after 24 hrs depending on maturation
 26 temperature and BCB staining.

Temperature (°C)	Maturation rate (%)
Total	
37	95.1 (312/328)
38.5	96.9 (320/330)
40	91.9 (275/299)
<i>P value</i>	0.7841
BCB+	
37	97.6 (165/169)
38.5	98.7 (161/163)
40	86.1 (124/144)
<i>P value</i>	0.8453

BCB-	
37	92.4 (147/159)
38.5	95.2 (159/167)
40	97.4 (151/155)
<i>P value</i>	0.6543

*No significant difference

No significant difference was found in the cleavage rate between the treated groups ($p = 0.5438$), nor when BCB+ oocytes ($p = 0.7869$) and BCB- ($p = 0.7683$, table 4) were evaluated. However, there were significant differences in the blastocyst rate (Table 4). COCs matured at 38.5°C (control) had the highest rate of blastocysts (37%), in contrast to those submitted to 40°C (21.5%), whereas those submitted to 37°C were not different from the control group and treated at 40°C ($p = 0.0498$). When only BCB+ oocytes were observed, a higher blastocyst rate (51.9%) was observed in the control group (38.5°C), which was statistically different from the groups treated at 37°C (37.8%) and from the 40°C (23.6%) ($p = 0.0276$). When evaluated only oocytes BCB-oocytes treated at 40°C had the lowest blastocyst rate (19.8%), when compared to the treated group at 37°C (28%) and 38.5°C (22.7%) ($p = 0.0344$, table 4).

Table 4 - Number and percentage of blastocysts obtained from in vitro fertilized oocytes (Simmental) matured at different temperatures (24 hrs; 37 °C, 38.5 °C and 40 °C).

Temperature (°C)	Cleaved rate (%)*	Blastocysts rate(%)
Total		
37	73.8 (229/310)	33.2 (103/310)^{ab}
38.5	74.8 (232/310)	37.0 (115/310)^a
40	66.9 (174/260)	21.5 (56/260)^b
<i>P value</i>	0.5438	0.0498
BCB +		
37	72.5 (119/164)	37.8 (62/164) ^b
38.5	77.6 (118/152)	51.9 (79/152) ^a
40	70.1 (80/114)	23.6 (27/114) ^c
<i>P value</i>	0.7869	0.0276
BCB -		
37	75.3 (110/146)	28.0 (41/146) ^a
38.5	70.8 (112/158)	22.7 (36/158) ^a
40	63.6 (93/146)	19.8 (29/146) ^b
<i>P value</i>	0.7683	0.0344

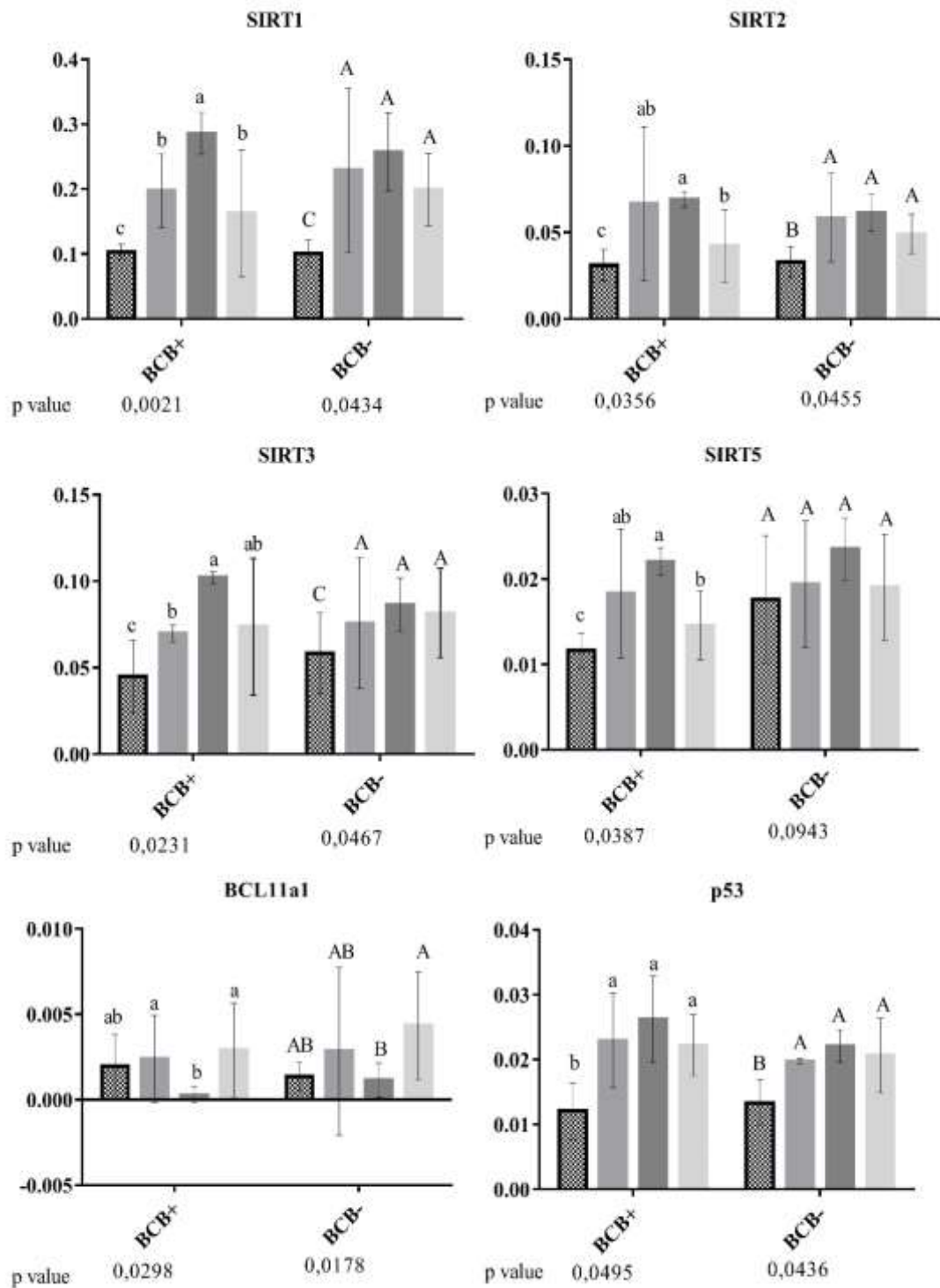
*No significant difference; ** lowercases differ significantly from each other in the column, within the set to which they are inserted ($P < 0.05$).

Gene expression

The results of the gene expression studies for sirtuins, BCL11a1 and p53 in oocytes before and after maturation at different temperatures are shown in figure 1. It can be observed

1 that the expression of the four sirtuin genes after maturation was greater than before maturation.
2 None of the maturation temperatures affected expression of the SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5
3 and p53 genes in BCB- oocytes. On the other hand, the control group presented the lowest level
4 of BCL11a when evaluated in BCB- oocytes. In general, in BCB+ oocytes the expression of the
5 sirtuins evaluated was higher in comfort (38.5°C). BCL11a1 was expressed in the same way under
6 stress conditions by heat and cold in BCB+ oocytes. Already the expression of p53 was not
7 influenced by the temperature at which BCB + and BCB- oocytes were matured, only immature
8 oocytes showed lower expression of the gene.

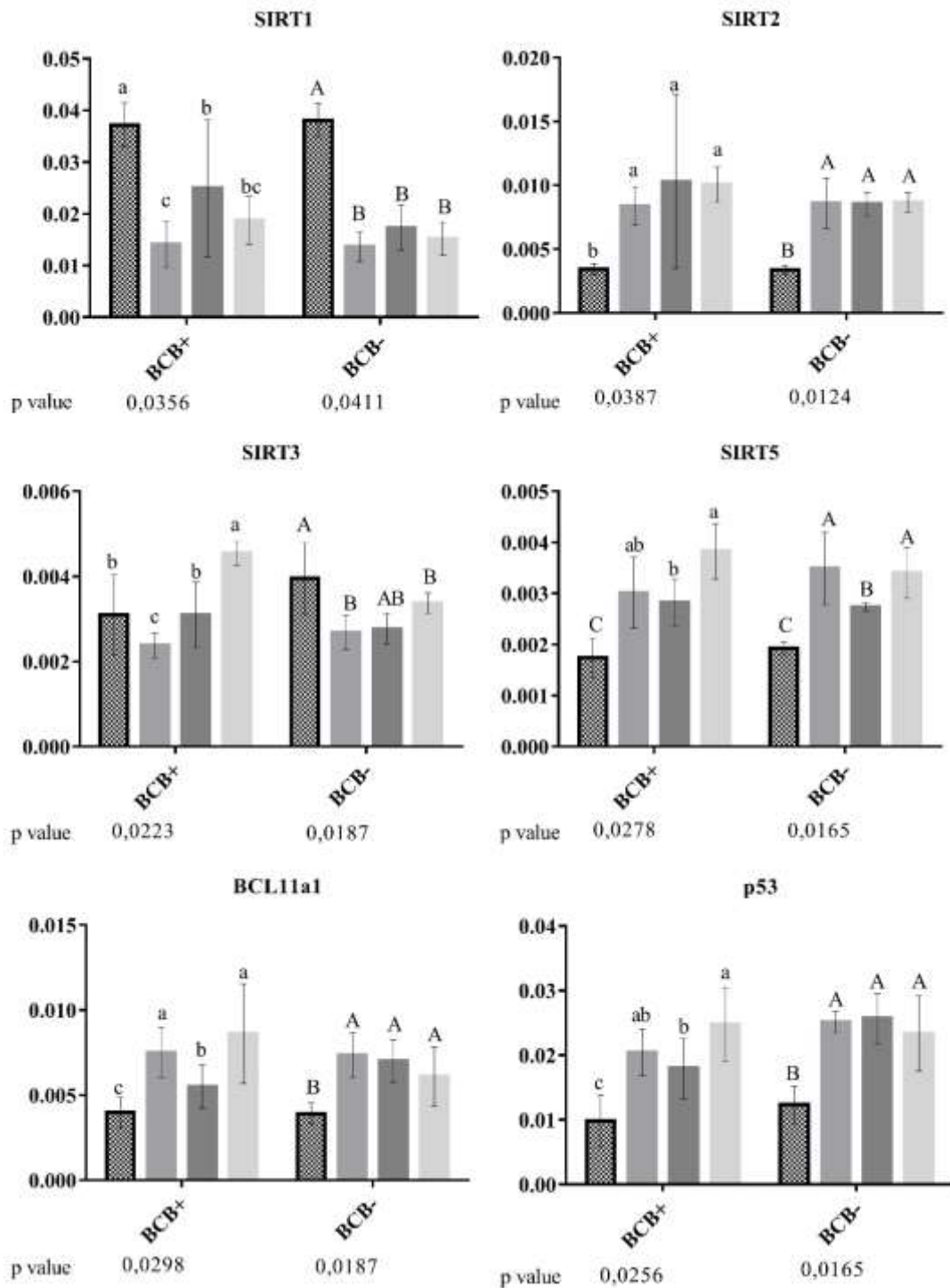
9
10



1
2
3
4
5
6
7
8

Figure 1 - Transcripts of SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5, BCL11a and p53 genes in relation to the house keeping gene RPS18 measured with rtPCR in samples of 30 purified Oocytes (3 repeats) depending on maturation temperature and BCB staining. Different upercases or lowercases indicate significant differences.

1 In contrast to oocytes, the temperature did not influence the expression of SIRT2 in
2 cumulus cells of BCB+ oocytes, cumulus cells of immature oocytes presented lower
3 results than the treated groups both BCB+ and BCB-. The maturation temperatures altered
4 the expression of the SIRT3 gene in cumulus cells of BCB- and BCB+ oocytes, so that
5 BCB- oocyte cumulus cells had higher gene expression. Furthermore, in SIRT3 there was
6 an increasing increase of expression in cumulus cells of oocytes labeled as BCB+ with
7 increasing temperature. Cumulus cells had lower expression of SIRT1 after maturation in
8 relation to immature oocyte cumulus cells. After maturation, in cumulus cells of BCB+
9 oocytes, a similar trend was observed for SIRT1 as described for oocytes, where the
10 control group showed higher expression of this gene. Increased transcript abundance at
11 higher temperature maturation can be found for SIRT5, also in cumulus BCB+ cells,
12 relative to immature oocyte cumulus cells. The BCL11a1 gene, only in the case of oocytes
13 stained with BCB+, showed reduced transcription levels in the corresponding cumulus
14 cells when matured at 38.5°C. Both labeled immature oocytes such as BCB+ and BCB-
15 resulted in a reduced correlation of BCL11a1 with respect to the treated groups. The
16 transcript of p53 was also increased during maturation in cumulus, of BCB+ oocytes is
17 40°C.
18



1

2

3

4 **Figure 2** - Transcripts of SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT, BCL11a and p53 genes in relation
 5 to the house keeping gene RPS18 measured with rtPCR in samples of cumulus cells
 6 recovered from 30 COCs (3 repeats) depending on maturation temperature and BCB
 7 staining. Different uppercases or lowercases indicate significant differences.

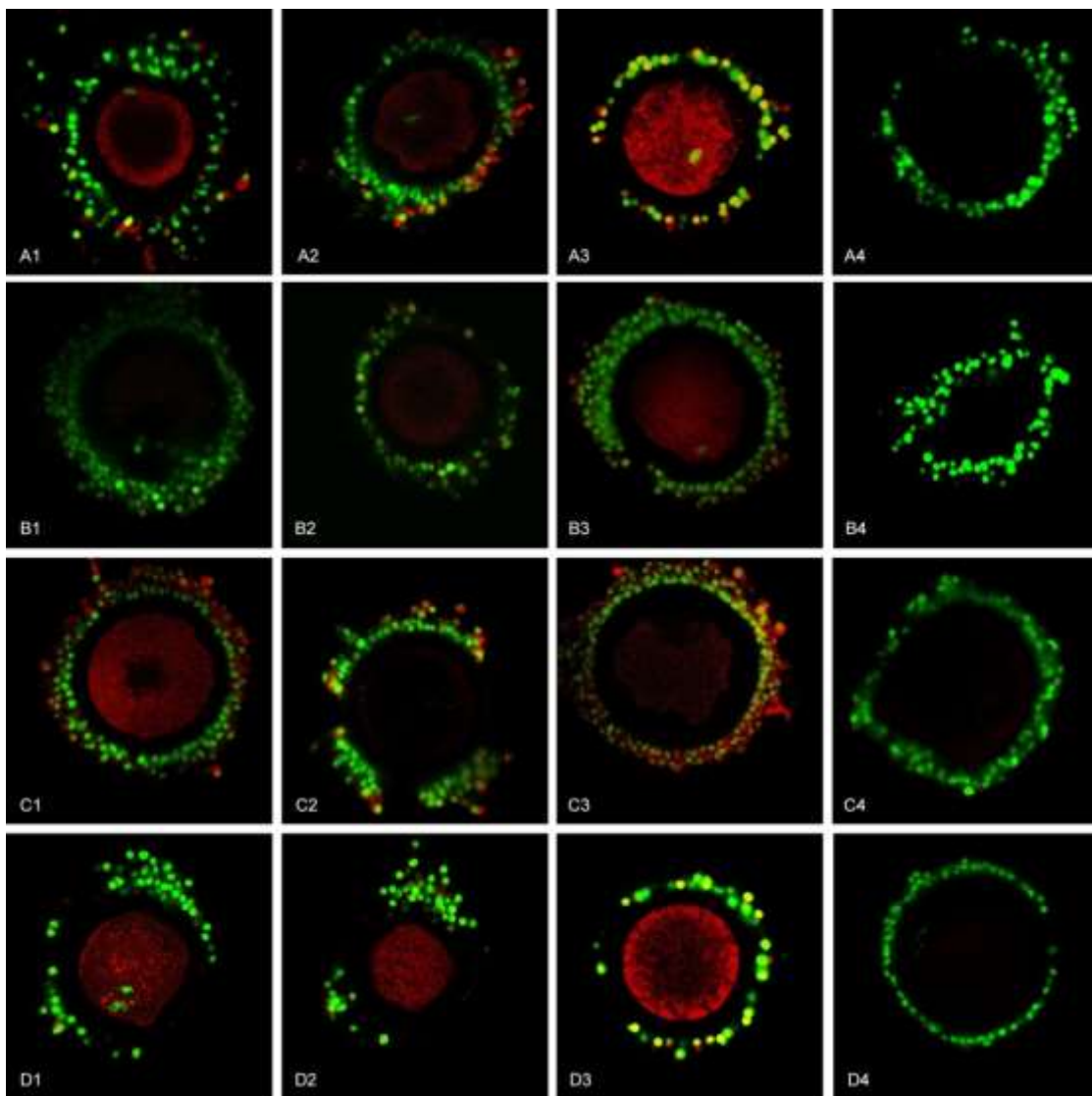
7

8

1 *Distribution and abundance of protein*

2 Examples of confocal microscopy images after immunofluorescence staining are
3 shown in Figure 3 and the results after quantification of fluorescence intensities are shown
4 in Figure 4.

5 For oocytes SIRT1 showed higher fluorescence intensities at different control
6 temperatures (38.5°C). In addition, at 40°C, the distribution of SIRT1 in cumulus cells
7 was more evident, and the opposite occurred in the groups treated at 37°C and 38.5°C.
8 SIRT2 was not influenced by the maturation temperature, as was BCL11a and p53.



10
11 **Figure 3** - Examples of confocal microscopic images of immunofluorescence stained
12 COCs after maturation at 37 °C (1), 38.5 °C (2) and 40 °C (3). The stained proteins are
13 Sirt1 (A), Sirt2 (B), BCL11a (C) and p53 (D) in red, nuclear counter staining in green.
14 Row 4 display unspecific control.

15
16

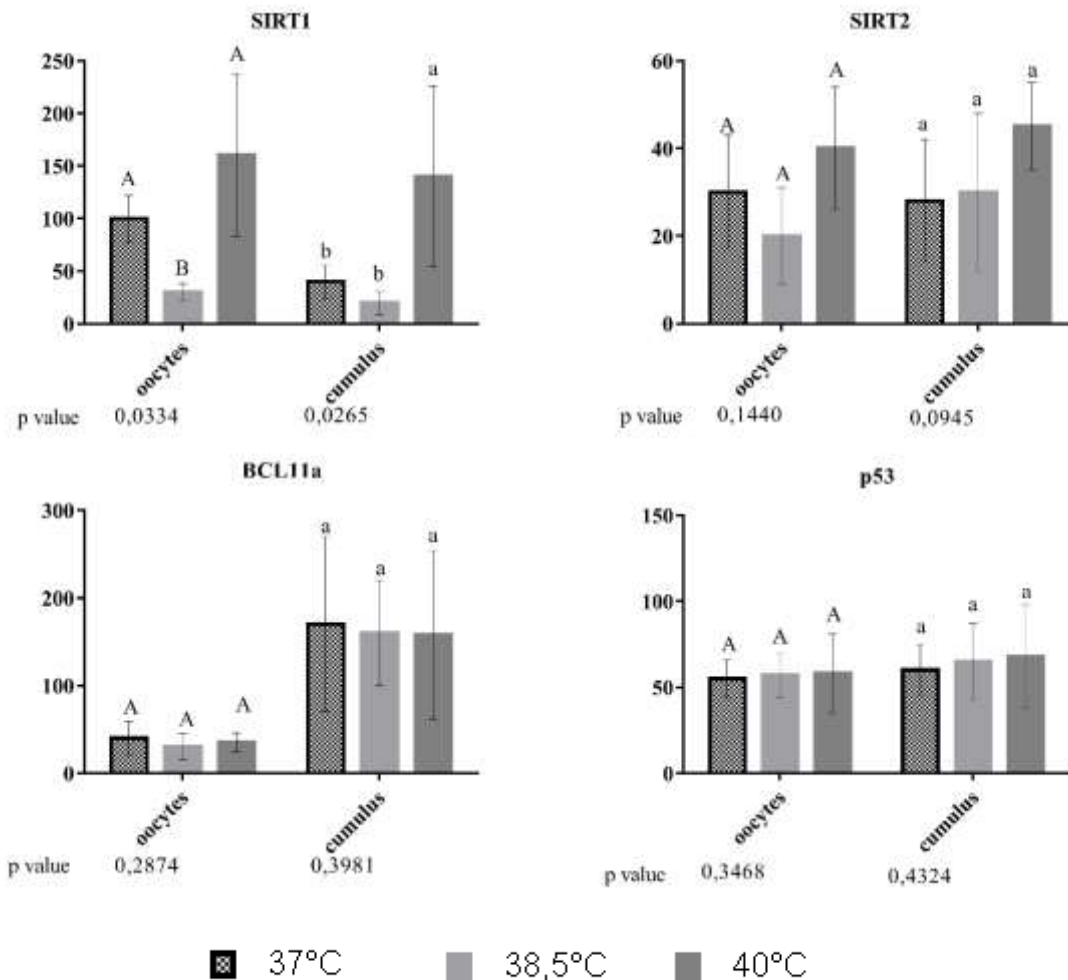


Figure 4 - Densitometric evaluation (mean channels & SD; n = 10 / group) of confocal microscopic images of immunofluorescence stained COCs from Simental breed after maturation at 37°C, 38.5°C, and 40°C. The stained proteins are Sirt1, Sirt2, BCL11a and p53. Different uppercases or lowercases indicate significant differences (P<0.05).

Discussion

The results showed that COCs subjected to in vitro maturation at temperatures below (37°C) and above (40°C) the conventionally recommended temperature (38.5°C) during the 24 hours of maturation completed similarly to nuclear maturation at However, with blastocyst. It is known that oocyte maturation comprises a series of events, both nuclear and cytoplasmic, that will prepare the oocyte for the next step which is fertilization (Shinmura et al. 2011). Therefore, the parameter "extrusion of the first polar body", method used to determine the maturation rate in this experiment, does not provide information on the competence of further development of oocytes or embryos resulting after fertilization (D'Aquila et al. 2012; Horio et al. 2011; Pais et al. 2013). Thus, for complete maturation of the oocyte it is necessary that intracellular events occur that

1 include redistribution of cytoplasmic organelles, storage of mRNA (messenger RNA),
2 protein synthesis and transcription factors (Ota et al. 2010). However, it is essential that
3 these events happen with excellence simultaneously, ensuring the success of embryonic
4 development.

5 The blastocyst rate was negatively affected when maturation occurred under
6 heat stress conditions. Nabenishi et al. (2012a) observed that IVM of bovine COCs was
7 performed at 40°C for 6 hours, there was a reduction in oocyte maturation rates (38.5°C:
8 72.7% and 40°C: 34.3%) and blastocyst (38.5°C: 31.4% and 40°C: 18.15%). In contrast,
9 authors reported that there was no influence of oocyte maturation at 40.5 ° C for 45
10 minutes on the rate of blastocysts, however a deleterious effect was observed when
11 maturation occurred at 43 ° C for a period of 45 minutes to 1 hour (Ju et al. 1999).
12 Corroborating Ju (2005) the duration of thermal stress plays a relevant role on the viability
13 of embryo development. Edwards and Hansen (1997a) found no effect on the rate of
14 blastocysts in oocytes matured at 41°C for 12 hours, but observed a significant reduction
15 in the rate of blastocysts when thermal stress was induced at the 2-cell stage. It is quite
16 possible that the time of exposure to high temperatures is the main reason for the
17 differences between the present work and the works cited above. The option to maturity
18 to a milder stress (40°C) than the experiments cited, refers to the fact that we consider
19 that the temperature at which the follicle is submitted is equal to or slightly below the
20 body temperature of the hyperthermic animal, considered the one that best represents the
21 reality of thermal stress *in vivo*. In this experiment, we investigated the effects of chronic
22 stress, that is, applied during the entire period of IVM. It has been reported that both
23 chronic and acute stress can be harmful to oocytes and result in low rate of blastocysts *in*
24 *vitro* (Gao et al. 2016; Prasad et al. 2016).

25 Evaluating the Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining, the authors observed that
26 the maturation rate was significantly higher in BCB+ oocytes than in BCB- (Alm et al.
27 2005), different from the results found in the present experiment. BCB + oocytes
28 produced a significantly higher proportion of blastocysts (34.1%) than BCB- (19.2%)
29 oocytes (Alm et al. 2005), which was the same as found in the present experiment. Other
30 authors found results similar to the present experiment, where the rates of cleavage were
31 similar (75%) between the BCB + and BCB- groups, while the blastocyst rates were
32 higher (35%) in BCB + oocytes than in BCB- oocytes (10%) (Silva et al. 2013). Although
33 BCB staining is used as an efficient method for oocyte selection, the competence of BCB
34 + oocytes can vary with oocyte diameter, sexual maturity of animals and stimulation with

1 gonadotrophins together (Wu et al. 2007), which may present different results on adverse
2 weather conditions.

3 In the oocytes, all SIRT genes evaluated in this study had a higher amount of
4 their transcripts after maturation (MII) than before (immature), except for SIRT5 in
5 oocytes labeled BCB-. Similarly, in cumulus cells, all SIRT genes evaluated showed
6 higher expression before maturation. However, there was an inverse result in SIRT1,
7 whose abundance was higher in the cumulus cells of immature COCs. This result
8 confirms the importance of these genes in the process of in vitro maturation of bovine
9 oocytes.

10 It is important to note that the quality of the oocyte, identified by the brilliant
11 cresyl blue (BCB) marking, showed a direct relationship with the stress response
12 mechanisms and consequently with the blastocyst production indexes. It is known that
13 BCB staining is a marker of glucose-6-phosphatohydrogenase activity (Stringfellow et al.
14 1999), a link to energy metabolism is evident. With a higher activity the G6PDH is able
15 to reduce the effects of a high temperature culture or only an indirect effect is responsible
16 for this observation should be clarified in following the investigations. Approximately
17 50% of COCs were BCB- and failure to identify this parameter could mask the effects
18 and mechanisms involved in the phenomena studied.

19 In the present experiment it was observed a greater abundance of transcripts
20 of all the sirtuins studied in mature oocytes in situation of thermal comfort. However,
21 cumulus cells SIRT3 and SIRT5 showed greater abundance when COCs were matured
22 under 40 ° C. SIRT 3 and 5 are located in mitochondria and are associated with energy
23 metabolism and responses related to oxidative stress and cellular signaling (Baur et al.
24 2012). It is possible that the first signaling in response to stress is given by these genes,
25 since the alteration of metabolism in organisms under stress is expected, such as the
26 establishment of oxidative stress as a consequence of thermal stress.

27 Considering that SIRT1 is a HDAC enzyme, and can directly modify the
28 cellular chromatin and modulate the meiotic spindle (Luo et al. 2001; Voelter-Mahlknecht
29 and Mahlkecht 2006), it is suggested that the success of meiotic maturation was
30 mediated by SIRT 1. The apparently efficient response of oocytes to SIRT1 could explain
31 the observation of other research groups that the oocyte is less sensitive to caloric heat
32 stress compared with the early embryonic stages (Edwards and Hansen 1997b; Nabenishi
33 et al. 2012a).

1 In general, the sites actively participate in the deacetylation of histone 3
2 (lysine 9 and 14) and histone 4 (lysine 16) (Imai et al. 2000). Considering that these
3 epigenetic events participate in the regulation of the initial development of the embryo
4 together with its genomic activation, the modification of the cytoplasmic sirtuins
5 according to the temperature of maturation could influence the initial embryonic
6 development.

7 The SIRT 2, BCL11a and P53 in the form of RNA and protein are present in
8 all studied IVM conditions, but their demand does not stand out in any of them.
9 Apparently they do not participate directly in the stress response in in vitro maturation,
10 however, such mRNAs may be stored for action during early embryonic development,
11 when the embryos still use the maternal mRNAs (Crocomo et al. 2014).

12 Unlike oocytes, cumulus cells have no storage mechanism for RNAs, and
13 therefore the mechanism of exchange of these substances with oocytes becomes even
14 more important. P53 can induce apoptosis of cells under stress conditions by activating
15 pro-apoptotic genes. SIRT1, in turn, can bind directly to p53 in vivo and in vitro, allowing
16 the survival of cells under stress, by repressing the p53-dependent apoptotic response,
17 due to its HDAC function (reviewed by Alm et al. 2005). In the present experiment,
18 greater abundance of p53 was observed in cumulus cells when COCs were matured under
19 heat stress condition, demonstrating a clear signal of stress, corresponding to the
20 apoptosis of these cells. Corroborating with the results of this study, authors have
21 suggested that failures in bovine oocyte maturation are not related to oocyte apoptosis or
22 DNA damage, but to cumulus cell apoptosis (Nabenishi et al. 2012a; Nabenishi et al.
23 2012b). This fact leads to a nutritional impairment of the oocyte (Thompson et al. 2007),
24 which may compromise vital functions for the early development of the embryo.

25 Cumulus cells are hypothesized to act as thermoprotectants and to modulate
26 the transfer of the substances to the oocytes according to the demand, by means of a
27 cooperation mediated by junctions communicating between the oocyte and the granulosa
28 cells (Bhojwani et al. 2007; Nabenishi et al. 2012a). A significantly higher amount of
29 SIRT2 protein can be observed in oocytes and cumulus cells when COCs were matured
30 at 40 C, probably in an attempt to control the accumulation of p53 protein, which was
31 partially obtained, since the amount of this protein in oocytes and cumulus cells were not
32 superior in COCs matured at 37 and 38.5 C. The behavior of BCL11 was similar to that
33 of p53, which indicates that this gene possibly also participates in the pathway of response
34 to thermal stress in vitro during maturation.

1 In summary, we can conclude that the increase in oocyte maturation
2 temperature of bovine *Bos taurus taurus* at $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ for 24 hours negatively affects the
3 rate of blastocysts after in vitro fertilization. The maturation at altered temperatures leads
4 to several cellular biochemical alterations, such as the expression of the sirtuins, BCL11a
5 and p53 genes in BCB + bovine oocytes and granulosa cells.

7 Bibliographic references

- 8 Alm H, Torner H, Lohrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W. 2005. Bovine
9 blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by
10 brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate
11 dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63(8):2194-2205.
- 12 Baur JA, Ungvari Z, Minor RK, Le Couteur DG, de Cabo R. 2012. Are sirtuins viable
13 targets for improving healthspan and lifespan? *Nature reviews Drug discovery*
14 11(6):443-461.
- 15 Bhojwani S, Alm H, Torner H, Kanitz W, Poehland R. 2007. Selection of
16 developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances
17 blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology*
18 67(2):341-345.
- 19 Bilby TR, Tatcher WW, Hansen PJ. 2009. Estratégias farmacológicas, nutricionais e de
20 manejo para aumentar a fertilidade de vacas leiteiras sob estresse térmico. *Anais*
21 *do XIII Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos.*
22 *Uberlândia pp 59-71.*
- 23 Crocomo LF, Landim-Alvarenga FC, Bicudo SD. 2014. Controle molecular do
24 acúmulo, tradução e degradação de mRNA em oócitos e embriões. *Revista*
25 *Brasileira de Reprodução Animal* 38:141-146.
- 26 D'Aquila P, Rose G, Panno ML, Passarino G, Bellizzi D. 2012. SIRT3 gene expression:
27 a link between inherited mitochondrial DNA variants and oxidative stress. *Gene*
28 497(2):323-329.
- 29 Edwards JL, Hansen PJ. 1997a. Differential responses of bovine oocytes and
30 preimplantation embryos to heat shock. *Molecular reproduction and*
31 *development* 46(2):138-145.
- 32 Edwards JL, Hansen PJ. 1997b. Differential responses of bovine oocytes and
33 preimplantation embryos to heat shock. *Molecular reproduction and*
34 *development* 46(2):138-145.
- 35 Gao Y, Chen F, Kong QQ, Ning SF, Yuan HJ, Lian HY, Luo MJ, Tan JH. 2016.
36 Stresses on Female Mice Impair Oocyte Developmental Potential: Effects of
37 Stress Severity and Duration on Oocytes at the Growing Follicle Stage.
38 *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)* 23(9):1148-1157.
- 39 García-Ispierto I, López-Gatius F, Bech-Sabat G, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C,
40 De Rensis F, López-Béjar M. 2007. Climate factors affecting conception rate of
41 high producing dairy cows in northeastern Spain. *Theriogenology* 67(8):1379-
42 1385.
- 43 Horio Y, Hayashi T, Kuno A, Kunimoto R. 2011. Cellular and molecular effects of
44 sirtuins in health and disease. *Clinical science (London, England : 1979)*
45 121(5):191-203.

- 1 Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L. 2000. Transcriptional silencing and
2 longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*
3 403(6771):795-800.
- 4 Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science (New York, NY)*
5 293(5532):1074-1080.
- 6 Ju JC, Parks JE, Yang X. 1999. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and
7 embryos after short-term heat shock. *Molecular reproduction and development*
8 53(3):336-340.
- 9 Lindquist S, Craig EA. 1988. The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*
10 22:631-677.
- 11 Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. 2001.
12 Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*
13 107(2):137-148.
- 14 Michan S, Sinclair D. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function.
15 *The Biochemical journal* 404(1):1-13.
- 16 Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. 2012a. The
17 effects of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental
18 competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat
19 stress. *Zygote (Cambridge, England)* 20(3):249-259.
- 20 Nabenishi H, Takagi S, Kamata H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y.
21 2012b. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence
22 after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. *Molecular*
23 *reproduction and development* 79(1):31-40.
- 24 Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. 2010. SIRT1/eNOS axis as a
25 potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis.
26 *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 17(5):431-435.
- 27 Pais TF, Szego EM, Marques O, Miller-Fleming L, Antas P, Guerreiro P, de Oliveira
28 RM, Kasapoglu B, Outeiro TF. 2013. The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2
29 is a suppressor of microglial activation and brain inflammation. *The EMBO*
30 *journal* 32(19):2603-2616.
- 31 Pereira JCC. 2005. Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal. Belo
32 Horizonte. p 195.
- 33 Poehland R, Tomek W, Becker F, Kurth J, Kanitz W, Bhojwani S. 2008. Qualitative
34 and quantitative differences of cytoskeleton proteins in embryos produced in
35 vitro, in vivo, and by somatic nuclear transfer. *Molecular reproduction and*
36 *development* 75(7):1109-1119.
- 37 Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, Shrivastav TG, Chaube SK. 2016. Impact of stress on
38 oocyte quality and reproductive outcome. *Journal of Biomedical Science* 23:36.
- 39 Ravagnolo O, Misztal I. 2002. Effect of Heat Stress on Nonreturn Rate in Holsteins:
40 Fixed-Model Analyses. *Journal of dairy science* 85(11):3101-3106.
- 41 Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. 2002.
42 Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in
43 summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of dairy science*
44 85(11):2803-2812.
- 45 Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Nakashima-Kamimura N, Wolf AM, Amo T, Ohta S,
46 Katsumata Y, Fukuda K, Ishiwata K, Suematsu M, Adachi T. 2011. Caloric
47 restriction primes mitochondria for ischemic stress by deacetylating specific
48 mitochondrial proteins of the electron transport chain. *Circulation research*
49 109(4):396-406.
- Soares TJC. 2014. Sirtuínas. Porto: Universidade do Porto. 30 p.

- 1 Stringfellow DA, Seidel SM, Oliveira Filho EB. 1999. Manual da Sociedade
2 Internacional de transferência de embriões: um guia de procedimentos e
3 informações gerais para o uso da tecnologia de transferência de embriões
4 enfatizando procedimentos sanitários. Brasil: Sociedade Brasileira de
5 Transferência de embriões - SBTE.
- 6 Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. 2005. The effects of histone
7 deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy?
8 *EMBO reports* 6(6):520-524.
- 9 Thompson JG, Lane M, Gilchrist RB. 2007. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte
10 complex and influence on subsequent developmental competence. *Society of
11 Reproduction and Fertility supplement* 64:179-190.
- 12 Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U. 2006. Cloning, chromosomal characterization and
13 mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. *International
14 journal of molecular medicine* 17(1):59-67.
- 15 Wu YG, Liu Y, Zhou P, Lan GC, Han D, Miao DQ, Tan JH. 2007. Selection of oocytes
16 for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse
17 model. *Cell research* 17(8):722-731.
- 18 Zeng H, He X, Tuo QH, Liao DF, Zhang GQ, Chen JX. 2016. LPS causes pericyte loss
19 and microvascular dysfunction via disruption of Sirt3/angiopoietins/Tie-2 and
20 HIF-2alpha/Notch3 pathways. *Scientific reports* 6:20931.
- 21

5.2. ARTIGO 2 - Reproduction, Fertility and Development

Influence of heat stress on *in vitro* maturation and HSP abundance of oocytes from zebu cows

Pöhland, R^{1*}; Souza-Cácares, MB^{2*}; Datta, TK³; Tomek, W¹; Vanselow, J¹; Martins, MIM²; Silva, WAL⁴; Cardoso, C.J.T⁴; Melo-Sterza, FA^{5**}

¹ Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Institute of Reproductive Biology, Dummerstorf, Germany

² State University of Londrina, Animal Science, Londrina, Paraná, Brazil

³ National Dairy Research Institute, Animal Biotechnology Centre, Karnal, Haryana, India

⁴ Federal University of Mato Grosso do Sul, Animal science, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

⁵ State University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brazil.

*These authors contributed equally to this work

**Correspondence: Fabiana de Andrade Melo Sterza, State University of Mato Grosso do Sul (UEMS), Animal Science, Aquidauana, Rodovia Aquidauana - UEMS, Km 12, Mato Grosso do Sul, Brazil, Email: fabiana.sterza@uems.br

Abstract

The objective of this study was to investigate the influence of temperature stress during *in vitro* maturation (IVM) of oocytes as well as *in vitro* embryo production (IVP) and abundance of HSP 70 and 90 in Nelore cattle. Viable cumulus-oocytes-complexes (COCs) were incubated for 24 hours at 37°C, 38.5°C and 40°C for maturation. The different temperatures of IVM did not affect nuclear maturation of oocytes ($p=0,8563$). However the IVP was negative affected when IVM occurred at 37 and 40°C ($p=0.001$). The higher amount of HSP70 in cumulus cells according to maturation temperature increase indicates its oocyte protection function, whereas HSP 90 appears to prepare the cells for the action of HSP 70. The higher level of HSPs at 37°C suggests that COCs of Nelore cows are more stressed at lower temperatures.

Keywords: Heat shock proteins, Nelore, Western Blot.

Introduction

The high environmental temperatures provoke a low performance in cattle, reduce the consumption of food, impairing the productive and reproductive performance (Brown-Brandl *et al.* 2005). Heat stress (HS) is associated with early embryonic mortality (Edwards *et al.* 2005), drop in conception rate (García-Ispuerto *et al.* 2007), changes in steroid hormones (Wolfenson *et al.* 2000; Jasnic *et al.* 2010), changes in follicular wave patterns and physiological and molecular alterations of oocytes (Zeron *et al.* 2001; Torres-Junior *et al.* 2008; Ferreira *et al.* 2011).

It has already been reported that heat stress causes negative effects on oocyte maturation, both *in vivo* (Gendelman and Roth 2012) and *in vitro* (Nabenishi *et al.* 2012). Among the negative effects, there is an increase in the rates of apoptosis and increase of reactive oxygen species (ROS) (Nabenishi *et al.* 2012), as well as reduction in the rates of oocytes that reach metaphase II (MII) *in vitro* (Nabenishi *et al.* 2012; Maya-Soriano *et al.* 2013). It has been reported that heat stress can accelerate germinal vesicle breakdown, however, there appears to be a compensatory effect with the blockade of these oocytes in

1 metaphase I, anaphase I and telophase I, consequently reducing the rates of MII (Roth
2 and Hansen 2005).

3 Cumulus cells provide essential metabolites to growing oocytes, such as
4 glucose, and regulate the resumption of meiotic division into mature oocytes (Gilula *et*
5 *al.* 1978; Hussein *et al.* 2006; Thompson *et al.* 2007). Thus, damage to these cells may
6 negatively influence oocyte development (Van Soom *et al.* 2007). In cattle, cumulus cells
7 increased mRNA expression for HSP 70, but the same did not occur with oocytes,
8 suggesting that the damage caused during IVM of bovine oocytes can be mediated by
9 cumulus cells (Payton *et al.* 2011). Further, demonstrating the importance of the
10 relationship between oocytes and cumulus cells, an increase in the expression of heat
11 shock proteins (HSP), when cumulus-oocyte complexes (COCs) were subjected to high
12 temperatures during maturation (12 hours) *in vitro* (IVM) (Payton *et al.* 2011). In
13 addition, it was observed that only the cumulus cells of bovine COCs that were heatly
14 stressed during IVM were in the process of apoptosis (Nabenishi *et al.* 2012).

15 HSPs are extremely important proteins, which play a key role in cell survival,
16 modulating the pathways of anti-heat stress apoptosis (Castro *et al.* 2013). HSPs are
17 molecular chaperone proteins, so-called because they can be reversibly bound to other
18 proteins, which act together in forming, folding and regulating trans-membrane transport
19 (Castro *et al.* 2013). Heat shock proteins, besides modulating apoptosis pathways, can
20 also be used as a marker of cellular stress and, as a consequence, influence on the oocyte
21 competence (Camargo *et al.* 2007).

22 The Nellore breed accounts for almost 80% of the Zebu herd in Brazil and
23 represents the largest genetic heritage in the Western world (ABCZ 2015). The great
24 expression of zebu breeds in national livestock breeding is due to the strong resistance to
25 internal and external parasites as well as high temperatures, low food requirement, and
26 the good fertility that these animals present (Macedo 2006). The biological effects
27 involved in the responses of zebu cows to thermal stress are not really known.

28 The objective of this study was to investigate the influence of temperature
29 changes during the *in vitro* maturation of oocytes, as well as on the embryo production
30 and the abundance of HSPs 70 and 90 in Nellore cattle.

31

32 **Material and Methods**

33 The experiment was carried out in the Laboratory of Animal Reproduction
34 Biotechnologies, belonging to the State University of Mato Grosso do Sul - University

1 Unit of Aquidauana (UEMS/UUA). Ovaries were collected at a local slaughterhouse. The
2 ovaries were transported to the laboratory (saline solution + antibiotic, 37°C) and with
3 the aid of a syringe and needle (18G), the follicles were aspirated and transferred to petri
4 dishes (PBS + SFB), for classification. Only COCs were classified in grade 1 or 2 by
5 stereomicroscopy. The selected COCs were matured for 24 hours in drops of 100 µl of
6 maturation medium (TCM199 with Earl's salts, FSB 5% v/v, 0,5ng/ml estradiol,
7 0,01mIE/ml LH, L-glutamin 200mM, streptomycin 0,01mg/ml, penicilin a 10U/ml) with
8 mineral oil in Incubator with low tension atmosphere of O₂(5% de CO₂, 5% O₂, 90% N₂;
9 EVE - WTA, Brazil) and maximum humidity. The COCs obtained were divided into 3
10 groups according to incubator temperature (37°C, 38,5°C (control) and 40°C).

11 After 24 hours of maturation at the designated temperature for each group,
12 the COCs were stripped (successive pipetting) to observe the extrusion rate of the first
13 polar body (PB). Only oocytes whose PB was identified were considered mature and
14 collected for analysis.

15 Part of the COCs was designated for fertilization and in vitro culture. After
16 24 hrs of maturation the COCs were washed (1x) and transferred to fertilization medium
17 (supplemented with heparin with TALP and BSA 6mg/ml). Nellore cryopreserved semen
18 was used for in vitro embryo production. Spermatozoa were separated using the Percoll
19 method (Sigma®). The inseminating dose was 1x10⁶sperm/ml. COCs and sperm were co-
20 incubated for 22 hours in a humidified incubator at 38.5 ° C and 5% CO₂ in air. After
21 washing, the probably zygotes were transferred to 100 µl SOF (BME, MEM, Sodium
22 Tricitrate, Myoinositol, L-glutamin) beads covered with mineral oil. The culture of the
23 probably embryos was carried out for 7 days in an humidified incubator at 38.5 ° C, 5%
24 CO₂ in air.

25 Western blot analysis were performed as described by Poehland et al. (2008).
26 Cumulus cells were mechanically separated from the oocytes (frequent pipetting), and thus
27 were washed (3x) in PBS and stored separately. Twenty oocytes per group (3 replicates) were
28 used, these were transferred with a minimum (not more than 5 µl) of PBS in 1 ml of SDS sample
29 buffer (2x) in eppendorf tubes. All samples were stored at -80°C until the Western Blot. For this
30 SDS-PAGE 10% and 12,5% (p/p) (acrylamide and bisacrylamide 29,7: 0,3) were used (Laemmli
31 1970). After rapid thawing, the samples were lysed and denatured for 2 min at 95°C and
32 immediately placed into the gel. Electrophoresis was performed (30mA, 1-2 hours) using a
33 system MightySmall SE 250 (Hoefer, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Proteins were
34 transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) (Towbin *et al.* 1992), using a semi-

1 dry electroblotting apparatus (OWL / peQLab, Erlangen, Germany, 1 mA / cm², 1 h).

2 Oocyte samples were treated with antibodies to HSP70 (CST #4872; rabbit
3 primary antibody anti-human (polyclonal); 1:700) and HSP90 (CST #4874; rabbit
4 primary antibody anti-human (polyclonal); 1:700). The membranes were incubated with
5 5% (p/v) of milk powder in fat in Tween Tris-buffered saline (TTBS, 1h, room
6 temperature) to avoid non-specific binding. After incubation the membranes were washed
7 with TTBS (3x 10 min, TTBS pH 7,4, Tween 0,1% (v/v)). The incubation time for the
8 first antibodies was 1 hour at room temperature and the second antibody (AlexaFluor®
9 546; goat secondary antibody anti-rabbit) for 2 hours at room temperature. The protein
10 bands were visualized with a kit ECL+ and ECL (Amersham Pharmacia Biotech,
11 Freiburg, Germany), in X-ray films (Kodak, Rochester, NY), with an improved
12 chemiluminescence kit (ECL).

13 The analysis of the images was performed using the package Fiji - ImageJ
14 (open source) with a self-adapted macro to create the region of interest (ROI). The
15 package software R (open source) was used to analyze the data and calculate the average
16 intensities integrated by ROI. This method of evaluation was based on the methodology
17 of Poehland *et al.* (2008).

18 The experimental design for the number of oocytes and embryos was
19 completely randomized. First, the normality of the data was verified by the Shapiro-Wilk
20 test. Then, for parametric data (evaluation of the amount of HSp70 and HSp90), ANOVA
21 was performed and when a significant difference was found the Tukey test 5% of
22 probability. For non-parametric data (maturation rate, cleavage rate, and blastocyst rate),
23 the Kruskal Wallis statistical test was used. The statistical package used was software R.

24

25 **Results**

26 The different temperatures at which the COCs of Nellore donors were matured in
27 vitro did not affect nuclear maturation of the oocytes, since the extrusion rate of the first
28 polar body was similar among groups (74% - 80%; $p=0.8563$; Table 1). However, the rate
29 of cleavage and blastocyst (Table 1) showed a significant difference in the dependence of
30 the maturation temperature. The cleavage rate of COCs matured at 37°C (35%) and 40°C
31 (26%) was lower when compared to the control group (38,5°C; 76%, $p=0.025$). Similarly,
32 the blastocyst rate of COCs matured at 37°C (14%) and 40°C (11%), was lower than the
33 control group (38,5°C), which presented a blastocyst rate of 32% ($p=0,001$).

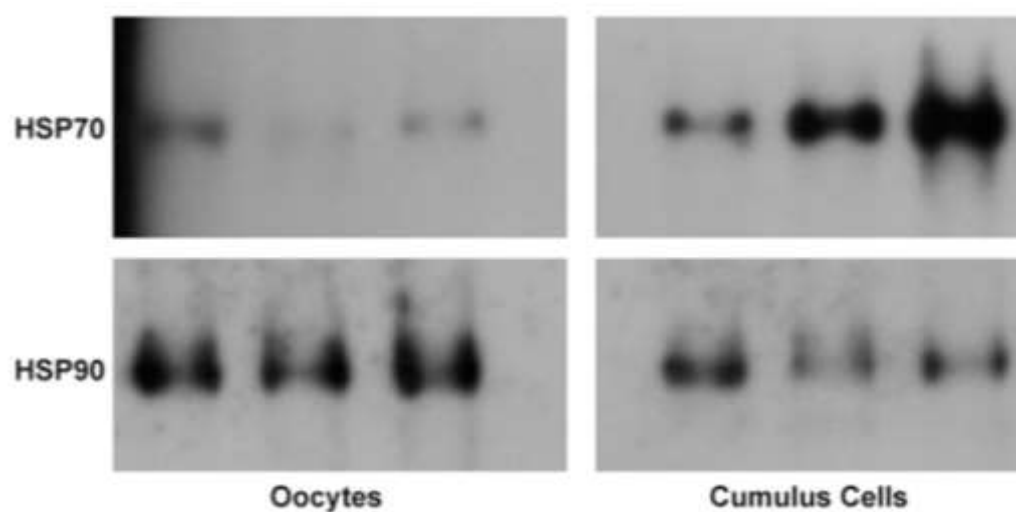
34

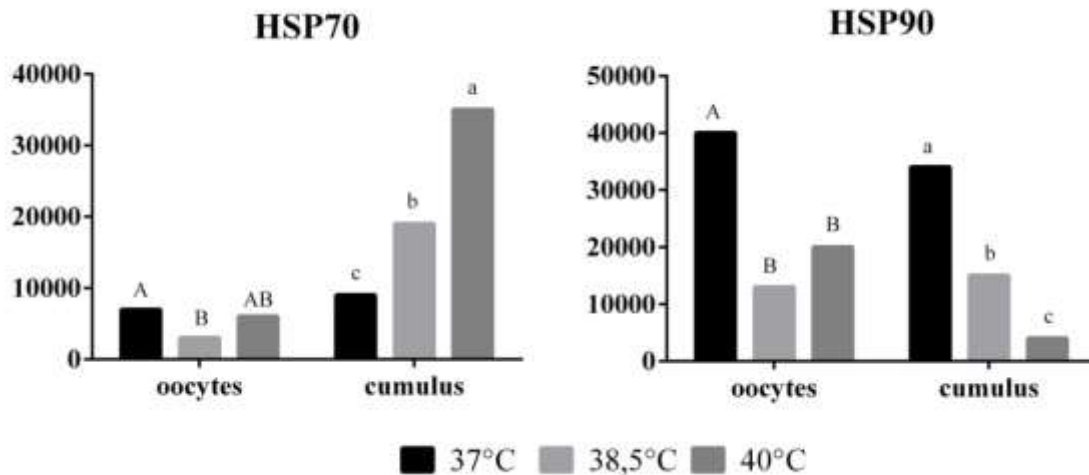
Table 1- Maturation rate (%), cleavage rate (%) and blastocyst rate (%) of Nellore donors, submitted to *in vitro* maturation at different temperatures (37, 38,5 e 40°C).

Temperature (°C)	Maturation rate(%)	Cleavage rate(%)	Blastocyst rate(%)
37	75 (212/281)	35 (55/154) ^b	14 (23/154) ^b
38,5	80 (271/336)	76 (116/152) ^a	32 (50/152) ^a
40	74 (219/294)	26 (38/143) ^b	11 (16/143) ^b
P value	0,8563	0,025	0,001

*lowercase letters differ in the column at 5% probability by the Kruskal Wallis test.

The influence of the maturation temperature on the abundance of HSP70 identified in COCs was evident. Although signal intensity increased slightly in oocytes ($p=0.0497$) at both low and high temperatures, cumulus cells showed a significant increase in signal intensity when matured at 40°C (Figure 1; $p=0,0134$). The HSP90 showed a significant decrease in cumulus cells according to increasing of maturation temperature (Figure 1; $p=0,0176$). In contrast, oocytes showed higher amounts of HSP90 in oocytes matured at 37°C but remaining stable at other temperatures (Figure 1; $p=0,0438$).





1
2 **Figure 1** - HSP70 and HSP90 abundance in oocytes and cumulus cells after maturation
3 of COCs matured at 37 °C, 38.5 °C, and 40 °C. Examples of western blott images are
4 shown on top site (exposure time 2 min.). Quantitative evaluation is represented by the
5 diagrams (mean & SD; 3 biological repeats). Different upper cases or lower cases indicate
6 significant differences ($p < 0.05$).
7

8 Discussion

9 The quality of the oocyte is closely related to the environment in which it is
10 found (Rocha *et al.* 2012). Therefore, it has been reported that temperature increases have
11 direct effects and leads to adverse consequences on cellular function compromising the
12 quality of the oocyte (Hansen 2002) and thus reducing the fertilization rate (Sartori *et al.*
13 2002). This fact was observed in the present experiment, where the *in vitro* maturation of
14 oocytes under heat stress caused changes in the rate of cleavage and *in vitro* production
15 of embryos (table 1). This study didn't show differences on extrusion of polar body, thus,
16 although meiotic maturation was not affected, heat stress may caused a reduction in
17 steroidogenic capacity in cumulus and granulosa cells, which propably altered mRNA
18 expression of cholesterol receptors, luteinizing hormone (LH) and estradiol (De Rensis
19 and Scaramuzzi 2003), leading to lower competence of the oocyte (Al-Katanani *et al.*
20 2002). Another fact is that heat stress may cause cytoplasmic changes in the oocyte.
21 According to Rivera *et al.* (2004), the heat shock increases the number of edemaciated
22 mitochondria, disorganizes the microtubules and the actin filaments, causing
23 disorganization of the cytoplasm and consequently reduction in cellular competence.

24 Controversial results were observed when COCs were submitted to IVM at
25 40°C for 5 hours. (Nabenishi *et al.* 2012). In the mentioned research, the meiotic
26 maturation rate was lower in situations of *in vitro* stress (38.5°C: 72.7% and 40°C:

1 34.3%). It is believed that different breeds show different behavior in response to stress.
2 It has already been demonstrated by Eberhardt *et al.* (2009), that there was minor
3 deleterious effect to the embryonic development in pure Nellore animals when compared
4 to crossbreed animals (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*). Nellore COCs used at this study were
5 developed in the heat of Brazilian wetland region, and because of their probable
6 adaptation to the heat, presented effects of stress only in the early stage of embryonic
7 development. It is believed, however, that although no changes in maturation have been
8 identified, heat stress suffered by the oocyte may have altered important reactions in
9 cytoplasmic maturation causing effects on the development of the embryo (Rivera *et al.*
10 2004).

11 Several studies (Sakatani *et al.*, 2008; Nabenishi *et al.*, 2012; Sakatani *et al.*,
12 2012), as in the present experiment, observed lower rate of blastocysts when COCs were
13 submitted to heat stress during IVM. In the experiments above described, the COCs were
14 exposed to high temperatures for a maximum of 6 hours, while in the present experiment
15 stress occurred during the 24 hours of maturation and could, therefore, be considered as
16 chronic stress. This is probably the main reason for the differences between our study and
17 literature. Making it clear that both chronic and acute stress can be harmful to oocytes
18 and result in a low blastocysts rate.

19 Heat stress can cause apoptosis of some cells, so if the embryo is of higher
20 quality and has a larger number of cells, after heat stress there will still be a reasonable
21 number of cells able to allow the continuity of its development (Edwards and Hansen
22 1997). COCs of adapted breeds, such as the Nellore breed, can produce better-quality
23 embryos with higher numbers of cells, and it is possible to reduce a fraction of their cells
24 without further damage to the embryo. However, further analysis are necessary to confirm
25 this fact.

26 The heat resistance of the embryos may be associated to the acquisition of
27 biochemical mechanisms of cellular thermoprotein, such as the production of heat shock
28 proteins (HSP) (Lima *et al.* 2013). In the present experiment, the amount of HSP 70 and
29 90 was increased in oocytes and mainly in cumulus cells matured *in vitro* at stressful
30 temperatures (37°C and 40°C). The increase of HSP70 and HSP90 amount in stressful
31 situations demonstrates the requirement of activation of molecular mechanisms to
32 promote cellular protection and DNA repair.

33 HSP70 acts by modulating apoptosis pathways (Mosser *et al.* 1997; Castro *et al.*
34 *et al.* 2013), protecting cells from elevated temperature by refolding damaged proteins,

1 stabilizing ribosomal RNA (Duncan and Hershey 1989) and avoiding DNA
2 fragmentation, the main characteristic of apoptosis (Paula-Lopes and Hansen 2002). It is
3 known that bovine COCs when subjected to elevated temperatures during IVM, respond
4 to stress by increasing mRNA expression for HSP70 (Paynton *et al.* 1988). Corroborating
5 with these results, in the present experiment oocytes and cumulus oocytes, showed an
6 increase in the amount of HSP70 at 37°C and 40°C, that means cold and heat stress.

7 An interesting fact is that cumulus cells had a higher amount of HSP70 in at
8 40°C and HSP90a higher amount when COC's are matured at 37°C. This difference may
9 have occurred because HSP70 has as its main function cell cytoprotection. It acts mainly
10 against apoptosis, preventing the translocation of the Bax protein to the mitochondrial
11 membrane, avoiding the formation of pores in the membrane (Mosser *et al.* 1997; Castro
12 *et al.* 2013). In addition, it inhibits the activation of apoptotic molecules, such as JNK,
13 caspase-8, Bax, AIF, Apaf-I and caspase-3 (Castro *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014; Vasaikar
14 *et al.* 2015). HSP90 has the function of cell cytoprotection but also participates in the
15 stabilization, activation, and maturation of more than 200 proteins, called client proteins
16 (Mayer and Bukau 2005). Many of these client proteins are essential for cell signaling
17 and transcription (Da Silva and Ramos 2012). It is believed that HSP90 had a precursor
18 action to that of HSP 70, preparing the cell for the cytoprotective action, since both
19 proteins presented opposite responses to the different temperatures at which the COCs
20 were submitted. It is also speculated that HSP 90 is responsible for triggering mechanisms
21 responsible for protection against cold stress since a greater amount of this protein was
22 observed in oocytes when maturation occurred at 37 °C (Harris and Starnes 2001),
23 showing that possibly that maturation at lower temperatures promote a higher thermal
24 stress for Nellore.

25 It has been reported that during the IVM of bovine COCs under heat stress, a
26 significant increase of ROS was observed, as well as a reduction of glutathione levels,
27 mainly in the oocyte, leading to apoptosis of cumulus cells (Nabenishi *et al.* 2012). In this
28 sense, we can assume that the cumulus cells have a thermoprotective role for the oocyte,
29 since the increase in temperature leads to a response of both cells (oocyte and cumulus
30 cells), but with apoptosis only of cumulus cells (Nabenishi *et al.* 2012). This fact leads to
31 a nutritional impairment of the oocyte causing (Thompson *et al.* 2007) a negative impact
32 on embryo development.

33 In conclusion, the stress of 1,5°C less and more than the ideal oocyte
34 maturation temperature causes negative effects on the cleavage and blastocyst rates, but

1 does not affect the rate of meiotic maturation of Nellore cows. The increase of HSP70
 2 amount in cumulus cells according to maturation temperature increase indicates its oocyte
 3 protection function, whereas HSP 90 appears to prepare the cells for the action of HSP
 4 70. Considering that HSP70 amount was 57% higher than the control when oocytes were
 5 matured at 37°C, while the abundance of this protein was only 39% greater than the
 6 control when the COCs were matured at 40°C, it suggests that COCs of Nellore cows are
 7 more stressed at lower temperatures.

8 There was no difference of HSP 70 and 90 abundance between oocytes
 9 matured at 38.5 ° C and 40 ° C showing the cumulus cells cytoprotection promoted to the
 10 oocytes. However not identified damages on the oocytes may be occurred, since the
 11 embryo development was negative affected.

12 The lower cleavage and blastocysts rates and the parallel action of HSPs
 13 demonstrate that in vitro production of Nellore embryos is affected when in vitro
 14 maturation occurs in situations of 24 hours thermal stress during IVM by low (37°C) and
 15 high (40°C) temperatures.

16

17 **Bibliographic references**

- 18 ABCZ (2015) Estatísticas. In: <<http://abcz.org.br/>>. Access: 28 Sep 2018.
- 19 Al-Katanani, Y.M., Paula-Lopes, F.F., and Hansen, P.J. (2002) Effect of season and
 20 exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci***85**(2), 390-6
- 21 Brown-Brandl, T.M., Eigenberg, R.A., Nienaber, J.A., and Hahn, G.L. (2005) Dynamic
 22 Response Indicators of Heat Stress in Shaded and Non-shaded Feedlot Cattle, Part 1:
 23 Analyses of Indicators. *Biosystems Engineering***90**(4), 451-462
- 24 Camargo, L.S., Viana, J.H., Ramos, A.A., Serapiao, R.V., de Sa, W.F., Ferreira, A.M.,
 25 Guimaraes, M.F., and do Vale Filho, V.R. (2007) Developmental competence and
 26 expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus*
 27 dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology***68**(4), 626-32
- 28 Castro, S.V., Lobo, C.H., Figueiredo, J.R., and Rodrigues, A.P.R. (2013) Proteínas de
 29 choque térmico Hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta*
 30 *Veterinaria Brasilica***7**, 261-271
- 31 Da Silva, V.C., and Ramos, C.H. (2012) The network interaction of the human cytosolic
 32 90 kDa heat shock protein Hsp90: A target for cancer therapeutics. *J Proteomics***75**(10),
 33 2790-802

- 1 De Rensis, F., and Scaramuzzi, R.J. (2003) Heat stress and seasonal effects on
2 reproduction in the dairy cow--a review. *Theriogenology***60**(6), 1139-51
- 3 Duncan, R.F., and Hershey, J.W. (1989) Protein synthesis and protein phosphorylation
4 during heat stress, recovery, and adaptation. *J Cell Biol***109**(4 Pt 1), 1467-81
- 5 Eberhardt, B.G., Satrapa, R.A., Capinzaiki, C.R., Trinca, L.A., and Barros, C.M. (2009)
6 Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of
7 cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine
8 embryos to heat. *Anim Reprod Sci***114**(1-3), 54-61
- 9 Edwards, J.L., and Hansen, P.J. (1997) Differential responses of bovine oocytes and
10 preimplantation embryos to heat shock. *Molecular Reproduction and*
11 *Development***46**(2), 138-45
- 12 Edwards, J.L., Saxton, A.M., Lawrence, J.L., Payton, R.R., and Dunlap, J.R. (2005)
13 Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation
14 in bovine oocytes. *Journal of Dairy Science***88**(12), 4326-33
- 15 Ferreira, R.M., Ayres, H., Chiaratti, M.R., Ferraz, M.L., Araujo, A.B., Rodrigues, C.A.,
16 Watanabe, Y.F., Vireque, A.A., Joaquim, D.C., Smith, L.C., Meirelles, F.V., and
17 Baruselli, P.S. (2011) The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat
18 stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *Journal of*
19 *Dairy Science***94**(5), 2383-92
- 20 García-Ispuerto, I., López-Gatius, F., Bech-Sabat, G., Santolaria, P., Yániz, J.L.,
21 Nogareda, C., De Rensis, F., and López-Béjar, M. (2007) Climate factors affecting
22 conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain.
23 *Theriogenology***67**(8), 1379-1385
- 24 Gendelman, M., and Roth, Z. (2012) Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine
25 oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos
26 associated with reduced developmental competence. *Biol Reprod***86**(1), 1-9
- 27 Gilula, N.B., Epstein, M.L., and Beers, W.H. (1978) Cell-to-cell communication and
28 ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol***78**(1), 58-75
- 29 Hansen, P.J. (2002) Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective.
30 *Journal of Animal Science***80**(suppl.2), E33-E44
- 31 Harris, M.B., and Starnes, J.W. (2001) Effects of body temperature during exercise
32 training on myocardial adaptations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol***280**(5), H2271-80
- 33 Hussein, T.S., Thompson, J.G., and Gilchrist, R.B. (2006) Oocyte-secreted factors
34 enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol***296**(2), 514-21

- 1 Jasnic, N., Korac, A., Velickovic, K., Golic, I., Djordjevic, J., Djurasevic, S.,
2 Djordjevic, I., Vujovic, P., and Cvijic, G. (2010) The effect of acute heat exposure on
3 rat pituitary corticotroph activation: the role of vasopressin. *Folia Histochemica et*
4 *Cytobiologica***48**(4), 507-12
- 5 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head
6 of bacteriophage T4. *Nature***227**(5259), 680-5
- 7 Lima, R.S., Assumpção, M.E.O., D., Visitin, J.A., and Lopes, F.F.P. (2013) Alterações
8 celulares induzidas pelo estresse térmico em embriões bovinos. *Brazilian Journal of*
9 *Veterinary Research and Animal Science***50**(4), 257-264
- 10 Macedo, L.O.B. (2006) Modernização da pecuária de corte bovina no brasil e a
11 importância de crédito rural. . *Informações econômicas***36**(7), 83-95
- 12 Maya-Soriano, M.J., Taberner, E., and Lopez-Bejar, M. (2013) Retinol improves in
13 vitro oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. *Zygote***21**(4), 377-84
- 14 Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular
15 mechanism. *Cell Mol Life Sci***62**(6), 670-84
- 16 Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Denis-Larose, C., and Massie, B. (1997) Role
17 of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis.
18 *Molecular and Cellular Biology***17**(9), 5317-5327
- 19 Nabenishi, H., Ohta, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K., and Tsuzuki, Y.
20 (2012) The effects of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental
21 competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress.
22 *Zygote***20**(3), 249-59
- 23 Paula-Lopes, F.F., and Hansen, P.J. (2002) Apoptosis is an adaptive response in bovine
24 preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem Biophys Res*
25 *Commun***295**(1), 37-42
- 26 Paynton, B.V., Rempel, R., and Bachvarova, R. (1988) Changes in state of adenylation
27 and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early
28 embryonic development in the mouse. *Dev Biol***129**(2), 304-14
- 29 Payton, R.R., Rispoli, L.A., Saxton, A.M., and Edwards, J.L. (2011) Impact of heat
30 stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and
31 embryo RNA populations. *J Reprod Dev***57**(4), 481-91
- 32 Poehland, R., Tomek, W., Becker, F., Kurth, J., Kanitz, W., and Bhojwani, S. (2008)
33 Qualitative and quantitative differences of cytoskeleton proteins in embryos produced in
34 vitro, in vivo, and by somatic nuclear transfer. *Mol Reprod Dev***75**(7), 1109-19

- 1 Rivera, R.M., Kelley, K.L., Erdos, G.W., and Hansen, P.J. (2004) Reorganization of
2 microfilaments and microtubules by thermal stress in two-cell bovine embryos. *Biol*
3 *Reprod***70**(6), 1852-62
- 4 Rocha, D.R., Salles, M.G.F., Moura, A.A.A.N., and Araújo, A.A. (2012) Impacto do
5 estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. *Revista Brasileira de Reprodução*
6 *Animal***36**(1), 18-24
- 7 Roth, Z., and Hansen, P.J. (2005) Disruption of nuclear maturation and rearrangement
8 of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation.
9 *Reproduction***129**(2), 235-44
- 10 Sakatani, M., Alvarez, N.V., Takahashi, M., and Hansen, P.J. (2012) Consequences of
11 physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and
12 expression of stress response genes in cattle. *J Dairy Sci***95**(6), 3080-91
- 13 Sakatani, M., Yamanaka, K., Kobayashi, S., and Takahashi, M. (2008) Heat shock-
14 derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in in vitro early stage
15 bovine embryos. *J Reprod Dev***54**(6), 496-501
- 16 Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S.A., Guenther, J.N., Parrish, J.J., and
17 Wiltbank, M.C. (2002) Fertilization and early embryonic development in heifers and
18 lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy*
19 *Science***85**(11), 2803-12
- 20 Thompson, J.G., Lane, M., and Gilchrist, R.B. (2007) Metabolism of the bovine
21 cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Soc*
22 *Reprod Fertil Suppl***64**, 179-90
- 23 Torres-Junior, J.R.S., Pires, A.M.F., Sa, W.F., A., F.M., Viana, J.H., Camargo, L.S.,
24 Ramos, A.A., Folhadella, I.M., Polisseni, J., Freitas, C., Clemente, C.A., Sa Filho, M.F.,
25 Paula-Lopes, F.F., and Baruselli, P.S. (2008) Effect of maternal heat-stress on follicular
26 growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology***69**(2), 155-66
- 27 Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins
28 from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
29 1979. *Biotechnology***24**, 145-9
- 30 Van Soom, A., Vandaele, L., Goossens, K., de Kruif, A., and Peelman, L. (2007)
31 Gamete origin in relation to early embryo development. *Theriogenology***68 Suppl 1**,
32 S131-7

- 1 Vasaikar, S.V., Ghosh, S., Narain, P., Basu, A., and Gomes, J. (2015) HSP70 mediates
2 survival in apoptotic cells-Boolean network prediction and experimental validation.
3 *Front Cell Neurosci***9**, 319
- 4 Wang, X., Chen, M., Zhou, J., and Zhang, X. (2014) HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic
5 proteins, in clinical cancer therapy (Review). *Int J Oncol***45**(1), 18-30
- 6 Wolfenson, D., Roth, Z., and Meidan, R. (2000) Impaired reproduction in heat-stressed
7 cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science***60-61**, 535-47
- 8 Zeron, Y., Ocheretny, A., Kedar, O., Borochoy, A., Sklan, D., and Arav, A. (2001)
9 Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes,
10 membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction***121**(3), 447-
11 54
- 12

5.3. ARTIGO 3 - Theriogenology

Oocyte viability and heat shock proteins in oocytes of bovine breeds adapted to the tropics under different conditions of environmental thermal stress

Souza-Cácares, MB^a; Fialho, ALL^b; Silva, WAL^c; Cardoso, JTC^d; Pöhland, R^e; Martins, MIM^a; Melo-Sterza, FA^{b,d*}

^aState University of Londrina, Animal Science, Londrina, Paraná, Brazil

^bState University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brazil.

^cFederal University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

^dFederal University of Mato Grosso do Sul, Veterinary Science, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^eLeibniz Institute for Farm Animal Biology, Institute of Reproductive Biology, Dummerstorf, Germany

*Correspondence: Fabiana de Andrade Melo Sterza, State University of Mato Grosso do Sul (UEMS), Animal Science, Aquidauana, Rodovia Aquidauana - UEMS, Km 12, Mato Grosso do Sul, Brazil, Email: fabiana.sterza@uems.br

Abstract

In order to evaluate the influence of thermal stress on physiological parameters and the oocyte quality of *Crossbred milk cows* (n = 12) and adapted *Bos taurus taurus* (Pantaneira; n = 12) cows, twelve sessions of ultrasound guided follicular aspiration were performed, between January and November/2014. The recovered cumulus-oocyte complexes (COCs) were selected and classified, according to the viability, immediately after OPU. After, the oocytes were stored in 3% PAF until immunofluorescence analysis under confocal microscopy for identification of HSP 70 and 90 proteins. Before each OPU, the rectal temperature (RT) and respiratory frequency (RF) of each animal were measured. The thermal stress was estimated by the black globe humidity index (BGHI), that was calculated on the day of the OPU and 90, 60, 30 and 7 days before each OPU session. Data were submitted to analysis of variance and regression by R program (version 3.3.1). The averages were compared by the Tukey test, with a 5% probability. In twelve OPU routines, 272 oocytes from the Crossbred milk cows and 306 oocytes from the adapted *Bos taurus taurus* cows were collected. The viability of oocytes from Crossbred milk cows, but not from the adapted *Bos taurus taurus* cows, presented a linear effect and inversely proportional to BGHI of 90 days before OPU. Adapted *Bos taurus taurus* breed presented a greater RT than the Crossbred milk cows breed (p=0.0037), however, RT did not exceed normal values for cattle. RF of adapted *Bos taurus taurus* breed showed no effect in relation to the BGHI on OPU day in the regression analysis (p=0.3221). On the other hand, Crossbred milk cows presented a linear increase of RF in relation to BGHI (p=0.0103). The HSP70 of adapted *Bos taurus taurus* cows had an inverse proportional effect to the BGHI of the OPU day, and the opposite was true for the Crossbred milk cows. In conclusion, BGHI>80 for 90 days before OPU session, negatively affect oocyte viability of crossbred milk cows, but not of the adapted *Bos taurus taurus* (Pantaneira). BGHI>80 on the day of the OPU session negatively affect the RF of crossbred milk cows and lead to a recruitment of HSP 70 to protect oocyte maturation. In adapted *Bos taurus taurus* the same occurred when BGHI was <80.

Keywords: Black globe humidity index, Heat shock protein, oocyte viability, respiratory frequency, bovine.

1. Introduction

Bovine are homeothermic animals, maintaining the body temperature constant through the heat flow determined by processes that depend on the temperature and humidity of the environment. When animals are in the thermoneutral zone (TZ), physiological imbalances are minimal and productivity is increased. However, the

1 understanding of the relationship between animals and the environmental interactions
2 becomes difficult to evaluate, due to the intrinsic characteristics of each animal, such as
3 breed, age and sex [1].

4 One way to measure the comfort index of cattle under grazing is the black
5 globe humidity index (BGHI), which considers in a single value the effects of dry bulb
6 temperature, humidity and air movement, and the radiation level [2]. Dependent on the
7 intensity of the stress, the thermal discomfort can be considered alert, dangerous and
8 critical [2].

9 High environmental temperatures are recorded in the transition region
10 between brazilian savanah and wetland during most of the year. High humidity combined
11 with high temperatures lead to changes in the physiological behavior of the animal, which
12 promotes greater energy expenditure to maintain its homeostasis [3], interfering in the
13 food consumption [4-6], weight gain [7], milk production [5,8] and reproductive rates
14 [9,10], influencing folliculogenesis, oogenesis and maintenance of gestation, resulting in
15 the reduction of productive and reproductive indexes.

16 In this way, the deleterious effect caused by thermal stress can promote damage to
17 the oocytes and consequently to the embryos. The defense of the oocyte to stress comprises the
18 performance of proteins called thermal shock proteins (HSPs), representing primary cellular
19 protection responses [11]. In adverse situations, HSP levels are increased, thus helping in
20 the synthesis and maturation of new proteins, which will replace those affected by
21 metabolic stress [12,13].

22 Breeds more adapted to the regions of warm climate has been an alternative
23 to handle the effects of thermal caloric stress (TCS) on animal production. However, it
24 was demonstrated that *Bos taurus indicus*, considered to be more thermotolerant, may also
25 suffer injury in production and reproduction when in TCS [14]. Girolando cows are
26 considered an adapted breed for milk production in the warm regions in Brasil and
27 Pantaneira, an adapted *Bos taurus taurus* breed is a genetic source of the brazilian wetland,
28 that resisted to intense climate changes during hunderts of years and is beeing rescue as
29 an alternative to improve animal production living in critical climate regions. Fialho et al.
30 [15] observed that the respiratory rate of Crossbred milk cows increased linearly as there
31 was an increase in the temperature and humidity index (THI), a fact not observed in the
32 adapted *Bos taurus taurus* breed.

33 A best understanding regarding the response of the oocyte development of
34 adapted cows under different stress conditions may support programs of genetic of these

1 breeds. The present experiment aimed to evaluate the influence of thermal stress on
2 physiological parameters, oocyte viability and the presence of HSP 70 and 90 in oocytes
3 of breeds adapted to the tropics.

4 5 **2. Material and methods**

6 *2.1 Animals*

7 *Bos taurus x Bos indicus* cows (Crossbred milk cows, Holstein 3/4; n = 12)
8 and an adapted *Bos taurus taurus* (Pantaneira; n=12) were selected according to their
9 clinical-reproductive characteristics. The donors were vaccinated against diseases of the
10 mandatory calendar and reproductive diseases (Cattle Master®, vaccination performed at
11 least 60 days before the first session of ultrasound-guided follicular aspiration (OPU),
12 non-pregnant, aged 48 ± 12 months and body score condition between 3 and 3.5 (scale
13 from 1 to 5) [16]. The experiment was carried out at the State Farm, located in lat. 20 °
14 30'S, long. 55 ° 50'W. The animals were maintained under rotational grazing, cultivated
15 with Tanzania grass (*Panicum maximum*), with mineral supplementation and water *ad*
16 *libitum*.

17 Twelve OPU sessions were held, with a minimum interval of seven and a
18 maximum of 54 days, between January and November of 2014. Each animal was
19 submitted to at least one and a maximum of twelve OPU sessions. All OPU procedures
20 were performed with the same number of donors for both breeds, being at least six and
21 most 10 animals per OPU session. All the procedures performed were approved by the
22 Committee on Ethics in the Use of Animals, through Protocol CEUA/UEMS 013/2013.

23 Before each OPU session, the rectal temperature (RT) and respiratory
24 frequency (RF) was measured on each donor. RT was measured with a digital
25 thermometer for veterinary use. The RF was counted according to the movements of the
26 flank in movements per minute. For reduction of peristaltic movements and less
27 discomfort of the animal, 5mL of a combination of lidocaine 2% and acepromazine 1%
28 in the epidural space were injected. For the aspiration of the follicles, disposable
29 hypodermic needles 20G (50mm x 9mm; Terumo®, Bio Brazil) and silicone hose with
30 2mm of internal diameter and 80cm of length were used. The vacuum pressure was 80mm
31 Hg, maintained with a suction pump (Aquila PRO®, Pie Medical, coupled to 8MHz
32 microconvex transducer and vacuum pump BV-003D WTA). The aspiration medium
33 consisted of DPBS plus 20,000 IU / L of sodium heparin, maintained at 30 ° C during
34 aspiration.

1 The recovered complexes oocyte-cumulus (COCs) were screened and
2 classified immediately after OPU. COCs with one or more layers of compact cumulus
3 cells and homogeneous cytoplasm (Grade 1 and 2) were considered viable. Oocytes
4 considered viable were stored in 3% PAF plus 2% sucrose and conditioned at 4 ° C until
5 immunofluorescence analysis.

6 2.2. Analysis of HSPs in oocytes by immunofluorescence

7 For immunofluorescence analysis, most of the cumulus cells were removed
8 from viable COCs by frequent pipetting under stereomicroscopic control. The resulting
9 oocytes (minimum 5 and maximum 10 per group) were washed in PBS and fixed in
10 paraformaldehyde (3%) plus sucrose (2%) at 4 ° C. Oocytes were washed in wash buffer
11 (TBS + 0,5% p/v BSA + 0,05% v/v Triton X100) for 10 minutes at room temperature and
12 permeabilized in specific buffer (HEPES 20 mM, Sacarose 300 mM, NaCl 50 mM , 3
13 mM de MgCl₂, 0,5% v/v Triton X100, pH 7,4, 10 min, 0°C). After the second wash in
14 buffer, nonspecific binding of the antibody was blocked by incubation with Roti Immuno-
15 Block® (Carl Roth, Karlsruhe, Germany; 1:50 in H₂O, 2 hours at room temperature).

16 Immediately thereafter, incubation with the first antibodies diluted in TBS (+
17 0,05% v/v Tween 20, 2% v/v Roti Immuno-Block®; 4°C, overnight). To mark HSP70 the
18 primary antibody rabbit anti-human HSP70 was used (polyclonal; Cell
19 SignalingTechnology® #4872; 1:100), and for HSP90 rabbit anti-human primary
20 antibody HSP90 (polyclonal; Cell Signaling Technology® #4874; 1:100).

21 The oocytes were then washed in wash buffer (4x 10 min, room temperature)
22 and incubated with the second antibody (Alexa-Fluor® 546, Secondary Antibody Anti-
23 rabbit Goat, Invitrogen / Thermo Fischer® # 11035) for 5 hours in the dark, at room
24 temperature. The oocytes were washed again (4x, wash buffer, room temperature) and
25 SYBR-GREEN® counterstained cores (S-7563, Molecular Probes, Thermo Fisher,
26 Dreieich, Germany) at a 1:500 dilution in PBS (1 hour, room temperature). After washing
27 (wash buffer, 4x 10 min, room temperature) and a second fixation (paraformaldehyde at
28 2% v/v in PBS, 4°C, overnight), were mounted on cover slides with glycerinated gelatin
29 and stored at 4°C until analysis under microscopy.

30 The COCs labeled with immunofluorescence was analyzed with a laser
31 scanning confocal microscope (LSM 5 Pascal) attached to an Axiovert 200M inverted
32 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). For the measurement of combinations of red
33 fluorescence (AlexaFluor® 546) and green fluorescence (SYBR GREEN®), a multiple
34

1 lane procedure was used. The images (120 images, $\Delta z = 4 \mu\text{m}$, 1024x1024 pixels) were
2 recorded using a 40x lens (oil immersion) and software provided by Carl Zeiss. The
3 distribution and intensities of fluorescence staining were evaluated in the different
4 compartments of the individual oocytes. Thus, computer aided analyzes were performed
5 using ImageJ for the measurement of the signal strength of HSPs [17].

6 7 *2.3. Control of climatic conditions*

8 The black globe humidity index (BGHI) was calculated based on data
9 obtained by the meteorological station of the State University of Mato Grosso do Sul
10 (UEMS / Inmet) [18]. To estimate Black Globe Temperature (BGT) the followed formula
11 [19] was used:

$$12 \quad \text{BGT} = 0,456 + 1,0335 * \text{DBT},$$

13 at where: BGT = black globe temperature in °C and DBT = Dry bulb
14 temperature in °C.

15 The BGHI was calculated according to BUFFINGTON et al. [2] as followed:

$$16 \quad \text{BGHI} = (\text{BGT} + 0,36 * \text{DP} + 45,5),$$

17 at where: BGT= Black globe temperature (°C) and DP = Dew point.

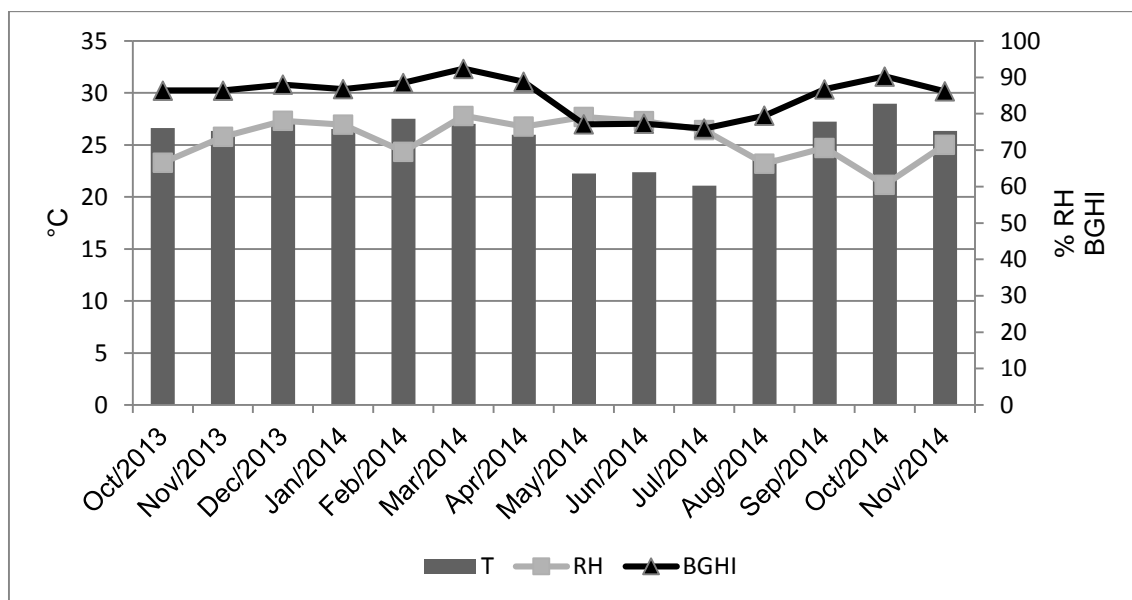
18 The obtained values of BGHI were divided into two groups: BGHI values
19 less than 80, and BGHI values greater than 80. This dividion was done based on the
20 National Weather Service [20] and previou experiments of our group. Mean BGHI
21 measured 90 days before OPU was calculated to assess the effect of stress on viability of
22 recovered oocytes. In addition, the mean BGHI of the OPU day was calculated to observe
23 the effect of stress on the respiratory frequency (RF) and rectal temperature (RT) of cows
24 and the intensity of HSPs in oocytes. The calculation of the average BGHI was performed
25 hourly in the 24 hours of the day and in the 90,60,30 and 7 days before the OPU.

26 27 *2.4. Statistical analysis*

28 For statistical analysis, the data were submitted to ANOVA (oocyte viability
29 rate, rectal temperatura, respiratory frequency and signal intensity of HSP70 and 90) and
30 regression analysis, for which all polynomial decompositions were tested. When
31 necessary, the Tukey test was applied at 5% probability, using the statistical program R
32 (version 3.3.1).

33 34 **3. Results**

1 The present study was carried out in a tropic region recognized by the high air
 2 temperatures. In 2014, only in the months of May to August the average temperatures of
 3 the day were lower than 25°C. The relative air humidity (RH) was, in general, high, but
 4 showed great variation during the warmer months of the period. In the hottest months of
 5 the year BGHI was above 80 (Figure 1).



7
 8 **Figure 1** - Climatic profile from October/2013 to November/2014, in the region of
 9 brazilian high wetland. The temperature data (T, in °C) and relative humidity (RH, in%)
 10 were obtained from the UEMS / Inmet meteorological station. The BGHI was calculated
 11 according to the formula proposed by Buffington et al. [2].

12
 13
 14 At each OPU session it was possible to observe that during the 90 days
 15 preceding the collection there were warmer days and colder days, the weather oscillated
 16 a lot. In the collections that were performed with BGHI above 80 (heat; 1,2,3,4,10,12),
 17 the animals suffered periods of intense heat and some periods of cold during the 90 days
 18 preceding OPU. The opposite was also observed, for example, in the OPU 6, the
 19 collection was performed during the period considered when BGHI <80, however 90 days
 20 before OPU the animals experienced intense heat (Figure 2).

21

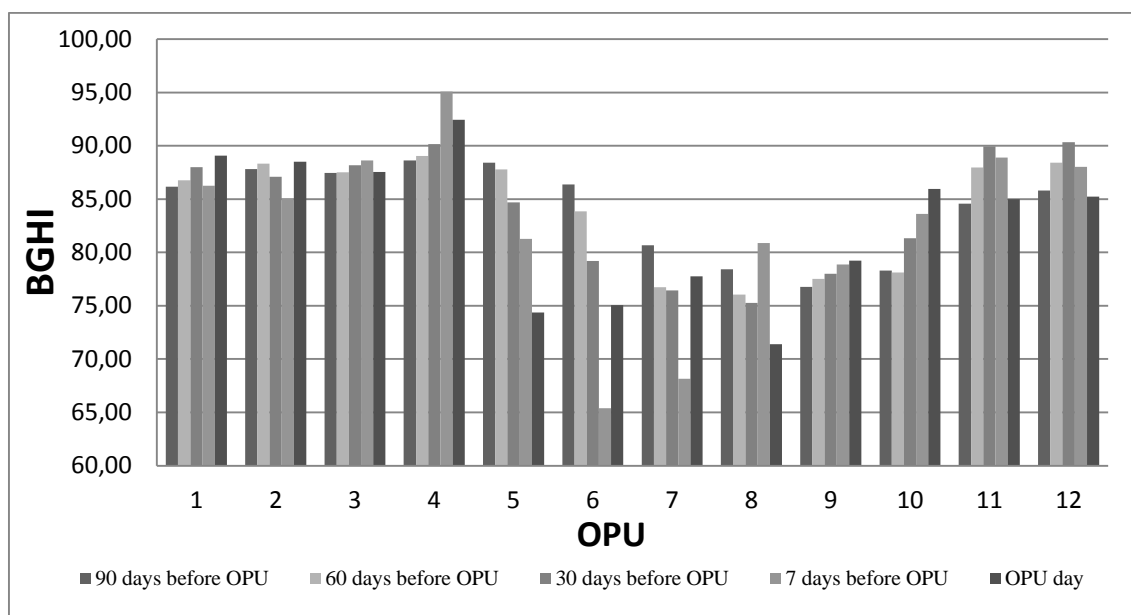


Figure 2 - Profile of BGHI in each OPU session, from October/2013 to November/2014, in the Brazilian high wetland region. 90, 60, 30 and 7 days before the OPU session and the day of the OPU session. The BGHI was calculated according to the formula proposed by Buffington et al. [2].

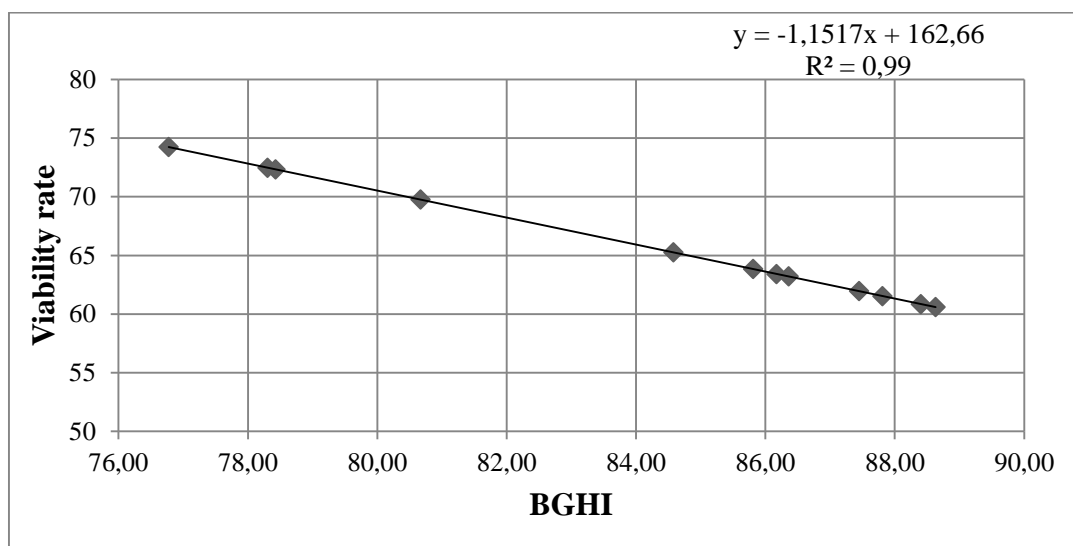
90 days before the OPU the average BGHI was 77.83, in that period the temperature was on average 23°C. When BGHI mean was 86.21, this value corresponds to a mean temperature of 30°C. In this way, when we considered BGHI 90 days before the OPU session, 9 OPU sessions were performed under BGHI > 80 and 3 under BGHI < 80 (Table 1). The viability rate of the adapted *Bos taurus taurus* breed was 52%, which was not influenced by BGHI 90 days before OPU. The Crossbred milk cows presented mean values of viability (51%) close to the adapted *Bos taurus taurus* breed, similarly it was not influenced by the climate of 90 days before collection. Moreover, no difference was found between the breeds and no interaction between the breed and the BGHI of the 90 days before OPU was observed (Table 1).

Table 1 - Oocyte viability rate of Crossbred milk cows and Adapted *Bos taurus Taurus* cows 90 days before OPU, when BGHI was < 80 or > 80.

	Viability rate		Mean	P value
	BGHI > 80 (n=9)	BGHI < 80 (n=3)		
BGHI Mean	86,21 ± 6,10	77,83 ± 4,82	82,02	-
Girolando	53,14 ± 25,78	50,17 ± 6,14	51,65	0,9209
Pantaneira	55,63 ± 27,70	50,20 ± 23,23	52,91	-
Mean	54,38	50,18	-	-
P value	0,9844		-	0,9991

No significant difference or interaction between the factors was observed.

1
2 However, when we looked individually for breeds using a regression analysis,
3 negative effect of the BGHI of 90 days before OPU on the viability rate in the Crossbred
4 milk cows ($p=0.0291$) was observed, the higher the BGHI lower the viability rate (Figure
5 3). The regression analysis was also performed with the adapted Bos taurus taurus breed,
6 although it did not present an BGHI effect of 90 days before OPU ($p = 0.4552$).
7



8
9 **Figure 3** - Regression analysis of the viability rate of Crossbred milk cows ($p=0.0291$) in
10 relation to the BGHI of 90 days before the OPUs were performed.
11

12 Considering the OPU day BGHI, 8 OPU sessions were performed when
13 BGHI was >80 (mean BGHI = 87.67), and 4 sessions when BGHI was <80 (mean BGHI
14 = 75.56) (Table 2). The adapted Bos taurus taurus breed presented a greater RT than the
15 Crossbred milk cows ($p=0.0037$). However, RT did not exceed normal values for cattle,
16 showing particularities of the breeds. There was no effect of OPU day BGHI on RT and
17 there was also no interaction effect among the factors (Table 2). The respiratory frequency
18 also had a breed effect ($p=0.0252$), the Crossbred milk cows had a higher respiratory
19 frequency (Table 2).
20

21 **Table 2** - Rectal temperature (RT) and Respiratory frequency (RF) of adapted Bos taurus
22 taurus and Crossbred milk cows in relation to BGHI of OPU day when BGHI was >80 or
23 <80 .

	RT		Mean	P value
	BGHI >80 (n=8)	BGHI <80 (n=4)		
BGHI Mean	87,67± 7,02	75,56± 6,74	81,61	-

Girolando	38,50± 0,17	38,27±0,33	38,38 b	0,0037*
Pantaneira	38,89± 0,15	38,58± 0,34	38,73 a	
Mean	38,69	38,42	-	-
P value	0,0637			0,4983
RF				
	BGHI >80 (n=8)	BGHI <80 (n=4)	Mean	P value
Girolando	40,28±5,73	31,06±3,59	35,67 a	0,0252*
Pantaneira	31,81±6,90	29,56±6,15	30,68 b	
Mean	72,09	30,31	-	-
P value	0,111			0,0879

*Lowercase letters differ in the column, in the Tukey test at 5% propability.

Similarly, RT also had no significant effect on the regression analysis in relation to the BGHI effect of OPU day (Crossbred milk cows $p=0.4003$; adapted Bos taurus taurus $p=0.6365$). The adapted Bos taurus taurus breed had no RF effect in relation to the OPU day BGHI in the regression analysis ($p=0.3221$). The Crossbred milk cows presented a linear increase parallel to the BGHI increase of the OPU day ($p=0.0103$). That means, the higher the BGHI the greater the respiratory frequency of the animals (Figure 4).

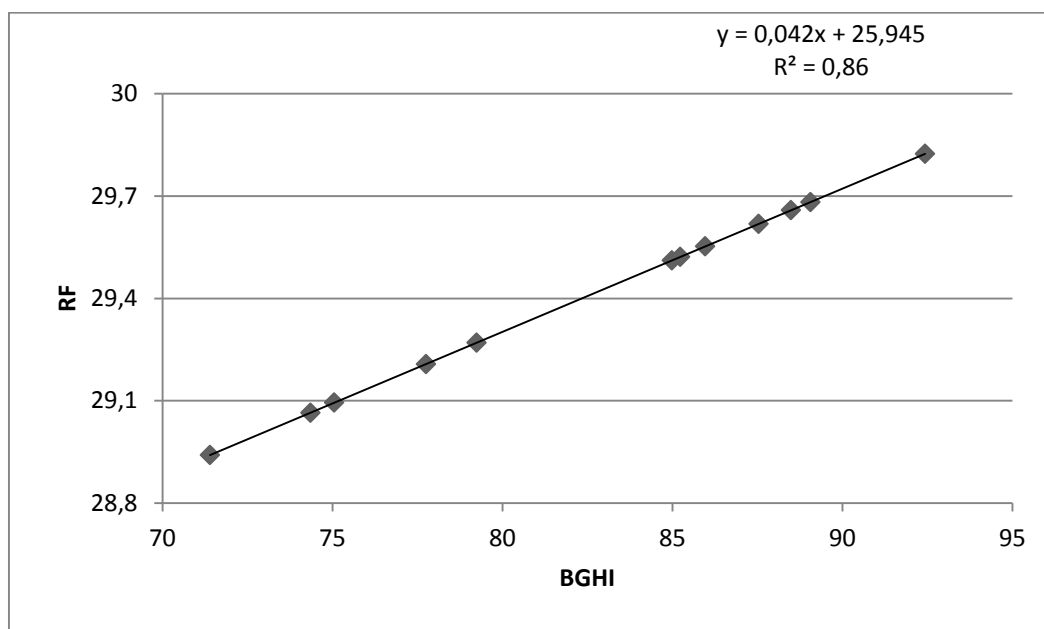
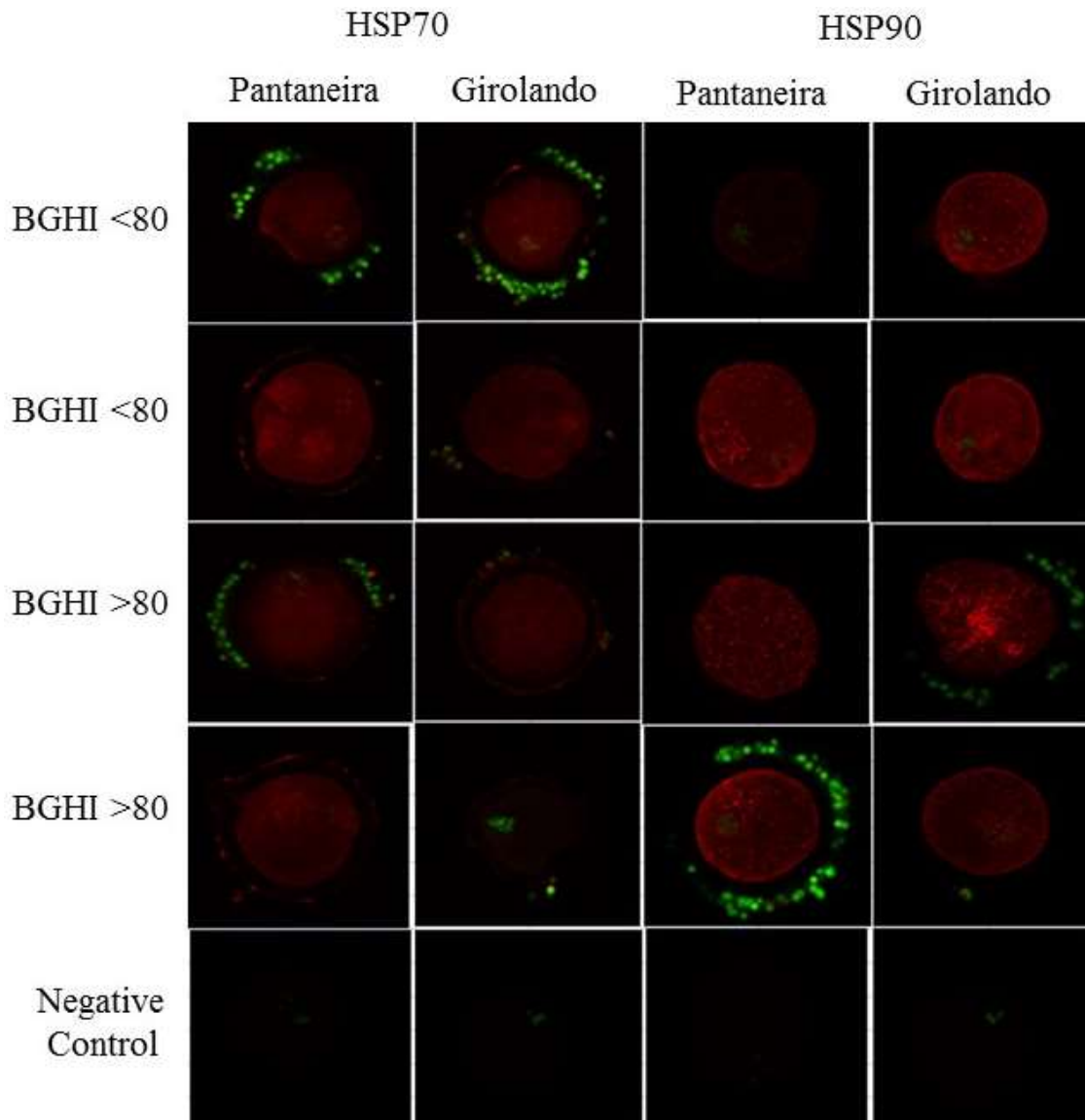


Figure 4 - Regression analysis of the respiratory frequency of Crossbred milk cows ($p=0.0103$) in relation to BGHI of OPU day.



1

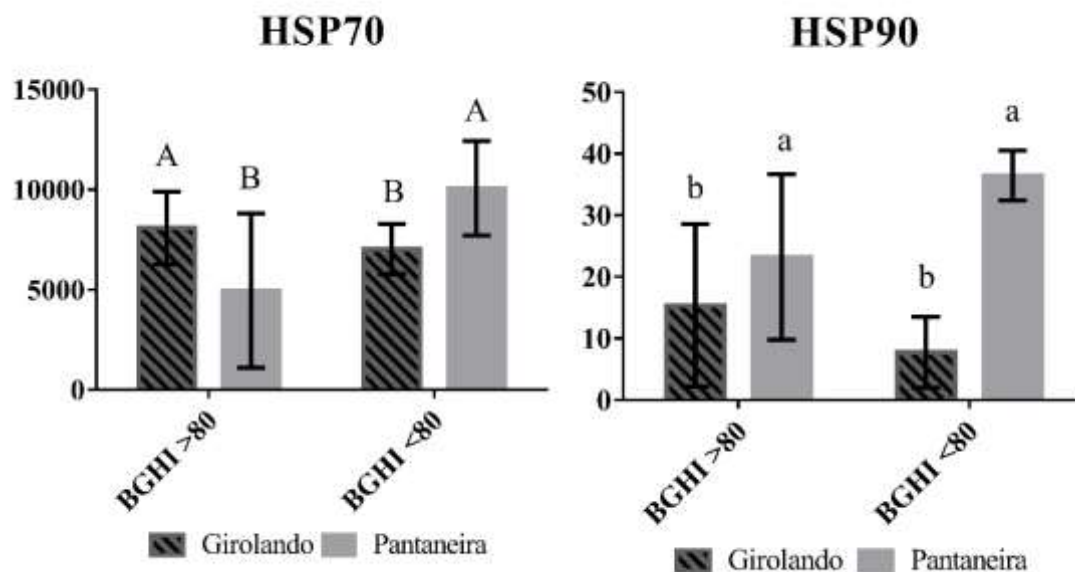
2 **Figure 5-** Confocal microscopic images of COCs of Crossbred milk cows and Adapted
3 *Bos taurus taurus* cows marked by immunofluorescence, according to BGHI, cold
4 (BGHI<80) and heat (BGHI>80). Red stained proteins, HSP70 and HSP90, and DNA
5 marking in green.

6

7

8 Both HSP70 and HSP90 had no interaction effect ($p=0.1492$, $p=0.1570$,
9 respectively). However, it was observed that the adapted *Bos taurus taurus* breed
10 presented higher amount of HSP70 when the OPU was on days in that BGHI<80
11 ($p=0.0346$, Figure 6). The Crossbred milk cows presented higher amounts of HSP70
12 when OPU was performed on days in that BGHI>80 (Figure 6). However, the HSP90 was
13 not influenced by the BGHI and neither by the interaction of the factors (breed and
14 BGHI). Adapted *Bos taurus taurus* breed presented a higher intensity of the HSP90 signal
in relation to the Crossbred milk cows ($p=0.0466$), regardless of the situation (Figure 6).

1



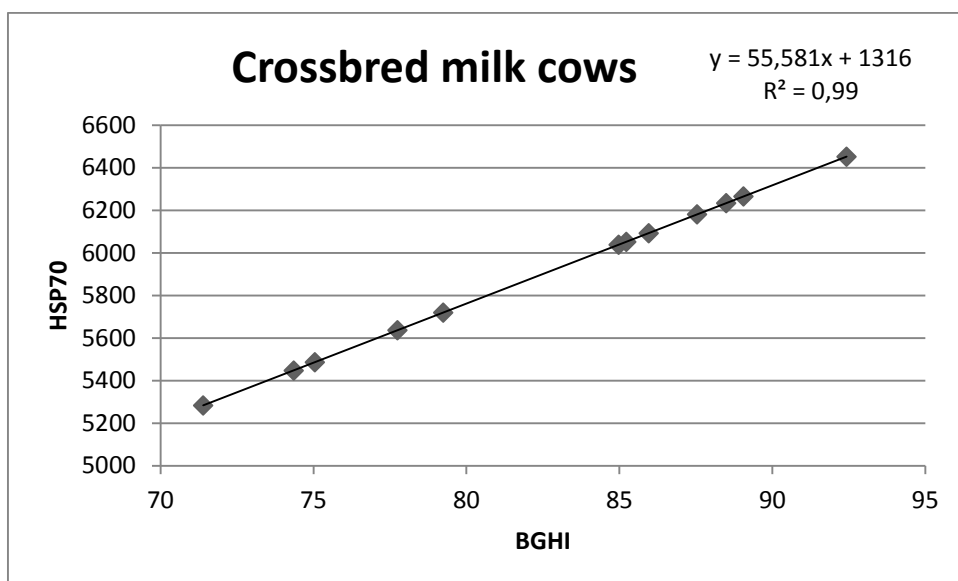
2

3 **Figure 6** - Graphic representation of the signal intensity of HSPs 70 and 90 of oocytes of
 4 adapted *Bos taurus taurus* and Crossbred milk cows when BGHI<80 or BGHI> 80.

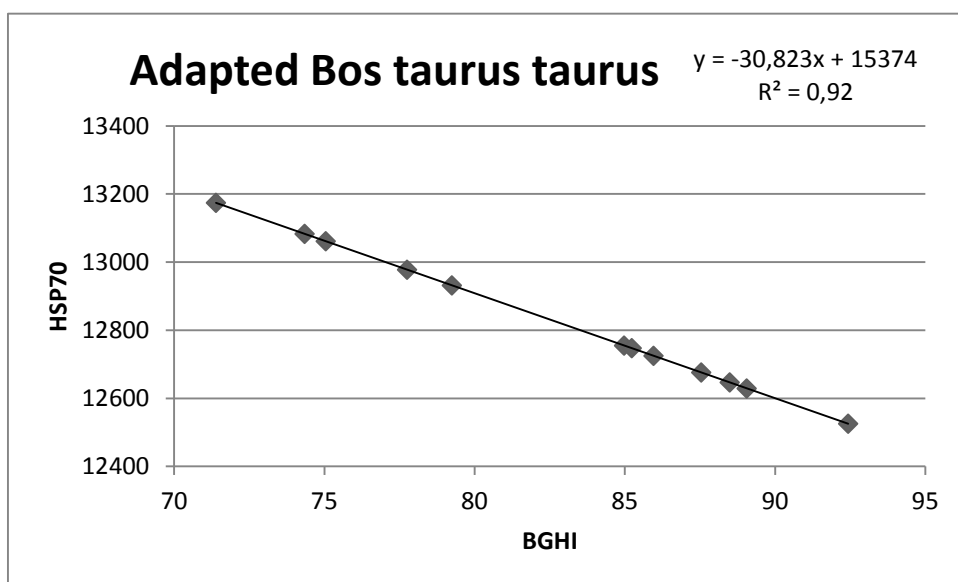
5

6 The HSP90 protein did not present a significant effect in the regression
 7 analysis in relation to the OPU day BGHI in any of the breeds evaluated (Crossbred milk
 8 cows $p=0.4711$; adapted *Bos taurus taurus* $p=0.571$). This analysis showed (Figure 7)
 9 that adapted *Bos taurus taurus* breed produces almost double the HSP70 in relation to the
 10 Crossbred milk cows. And, as an increase in BGHI occurred, a lower amount of HSP70
 11 was found in oocytes of adapted *Bos taurus taurus* cows ($p<0.0001$). In addition, the
 12 Crossbred milk cows linearly increases the amount of HSP70 in oocytes as BGHI
 13 increases ($p=0.048$).

14



1



2

Figure 7 - Regression analysis of the signal intensity of HSP70 from Crossbred milk cows ($p=0.048$) and adapted *Bos taurus taurus* ($p=<.0001$) animals in relation to the BGHI of the OPU day.

3

4. Discussion

4

In all OPU sessions, conditions of comfort and thermal stress were observed, clearly demonstrating the climatic conditions to which animals are subjected for most of the year (Figure 1). The climatic conditions of the Brazilian high wetland are characterized by high temperatures, a few winter days with an average annual temperature of 25°C, with temperatures that can reach up to 42°C [18]. And such characteristics require the use of adapted animals and strategies that allow to obtain their greater productivity without harming the animal welfare. The search for strategies in this sense are evident and necessary when one observes the world temperature increase in 0.17°C every decade [21].

5

1 It was observed that during the 90 days preceding the OPU sessions, the
2 animals underwent different and extreme climatic conditions (Figure 2), passing through
3 intense heat and some periods of cold.

4 In the present experiment BGHI>80 or BGHI<80, 90 days prior to OPU, had
5 no effect on oocyte viability, based on morphological characteristics (Table 1). However
6 when a regression analysis was performed looking the breeds individually, it was
7 possible to observe the negative influence of BGHI of 90 days before OPU on oocyte
8 quality only for Crossbred milk cows (Figure 3). Similarly, the influence of chronic stress
9 over 60 days on the viability of recovered oocytes had been reported by Fialho et al. [15].
10 Torres-Júnior et al. [22] observed reduction of oocyte competence up to 119 days after
11 thermal stress induced in climatic chamber in Crossbred milk cows. Not published results
12 of our group showed no difference on morphological viability of recovered oocytes of
13 Brazilian beef donors managed on areas with sufficient and not sufficient shade amount
14 during Brazilian Summer, however a significant difference could be seen on blastocyst
15 rates. That animals remained in the same shade conditions for around 6 months. This
16 result clearly shows that chronic heat stress affects oocyte competence to develop embryos.

17 It is known that a follicle can take up to 90 days to pass from a primordial to
18 preovulatory follicle [23]. Growing bovine oocytes are sensitive to thermal stress, which
19 may lead to changes in maturity both *in vivo* [24] and *in vitro* [25]. Moreover, that ovarian
20 follicles of preantral follicles are growing, and present intense synthesis of RNA [26],
21 which makes them sensitive to environmental changes. Studies have demonstrated the
22 effects of heat stress on the progress of nuclear maturation (ability to proceed from
23 Prophase I to metaphase II) and cytoplasmic (cytoskeletal changes, organelle
24 reorganization, metabolism alteration, reduction in mRNA levels and changes in profiles
25 of synthetic proteins) of oocytes [27], on the ovulation [28], and on pregnancy
26 maintenance [29]. Thus, raising the temperature during the follicular growth or oocyte
27 maturation phase may induce early aging of the oocytes, thereby reducing their fertile life
28 [30,31].

29 The RT can be considered an index of adaptability for hot environments [32],
30 The increase of RT indicates that the thermoregulatory mechanisms are not being efficient
31 [33]. In the present study, it was found a significant difference of the RT between the
32 breeds, where the Adapted *Bos taurus taurus* breed presented higher values in relation to
33 the Crossbred milk cows breed, however the values did not exceed the normal range for
34 the species in any of the OPU sessions, in which BGHIs reached up to 117. The same

1 result was found by Fialho et al. [15]. Azevedo et al. [34] observed RT 40.29°C in
2 crossbred lactating cows when THI reached a value of 85. They then considered that the
3 animals were in severe stress, since the rectal temperature limit is 39.3°C [35], different
4 from the results found in the present experiment, demonstrating that Crossbred milk cows
5 handled in different environments can develop better adaptability. On the other hand,
6 Sousa Jr. et al. [36] observed that crossbred cows (*B.taurus taurus x B. taurus indicus*)
7 presented rectal temperature of 39,5°C when submitted to BGHI 92, demonstrating that
8 there was adaptation of this breed in the Brazilian semi-arid region.

9 The RF is, in general, the first physiological parameter to be altered in
10 situations of heat stress, acting as an alternative of heat dissipation and control of body
11 temperature [32]. In the present study, the Crossbred milk cows showed an increase in
12 the RF when in heat stress, exceeding the reference values for adult cattle, which vary
13 from 12 to 36 mov/min [37]. Sousa Jr. et al. [36] found high RF (48 mov/min) in crossbred
14 cattle in the semi-arid region of Brazil, when the BGHI was above 90, and suggested
15 increasing the amount of shade for the animals to regulate the stress conditions. Azevedo
16 et al. [34] observed RF above normal when THI was equal to or higher than 60 in lactating
17 crossbred females, a category even more susceptible to heat stress [38]. According
18 Baccari Jr. et al. [39], the smaller the RF the more adapted the animal to heat stress. As
19 the adapted *Bos taurus taurus* breed remained within the normal range for both RT and
20 RF, we can consider this breed adapted to the climatic conditions of tropic regions,
21 brasilian high wetland, as previously reported [15,40].

22 In adverse conditions, such as in situations of temperature rise and/or
23 humidity, denaturation of proteins necessary for cellular metabolism may occur. Thus,
24 HSP levels may be increased, because this proteins are required for the synthesis and
25 maturation of new proteins that will replace those affected by metabolic stress [12].
26 Thermal stress induces apoptosis of oocytes and embryos [41], and thus, HSP70 also
27 plays an important role in modulating pathways of apoptosis [42], working against the
28 stress factors. It has been reported that both, bovine [43] and buffalo [44] COCs respond
29 to stress (>39,5°C) increasing the mRNA expression of HSP70 when subjected to high
30 temperatures during *in vitro* maturation. This demonstrates that thermal shock proteins,
31 besides modulating the pathways of apoptosis, can also be used as a marker of cellular
32 stress and, consequently, influence on oocyte competence [45].

33 HSPs show a rapid response, in hours or minutes, against a stress factor [11].
34 In the present study, the response of the recovered oocytes of Crossbred milk cows and

1 adapted *Bos taurus taurus* breeds to thermal stress on OPU day was evaluated, looking
2 for the presence of HSPs according to OPU day BGHI. The adapted *Bos taurus taurus*
3 showed higher levels of HSP70 in BGHIs<80, and the opposite happened to the Crossbred
4 milk cows that presented higher HSP70 intensities when BGHI>80 (Figure 5). HSP 70
5 appears in an attempt to aid the repair of proteins, important for oocyte maturation [42],
6 and that occurs in a different way for the studied breeds. In addition, this protective
7 process can avoid damages on further embryo development, however the adapted *Bos taurus*
8 *taurus* breed produces almost double the HSP70 in relation to the Crossbred milk cows. We
9 speculate that this higher response can be associated with the better adaptability of this breed to
10 tropic regions.

11 It is evident from the regression analysis (figure 6) that the adapted *Bos taurus*
12 *taurus* breed showed an inversely proportional behavior between the HSP70 and the
13 BGHI of the day of OPU, demonstrating that these protein are needed to trigger
14 mechanisms of protection against stress in an unlikely temperature range, considering the
15 known values for the taurine breeds, whose thermal comfort zone is between -1 and 16°C
16 [46]. When the BGHI was lower than 80 the average temperature was 23 ° C, which seems
17 to be characterized as a stress zone for the adapted *Bos taurus taurus*.

18 HSP90 is an essential protein for cellular viability and integrity and is
19 considered a key mediator of homeostasis, a function that performs as a facilitator of
20 several transient and low affinity protein-protein interactions [47]. The HSP90 was
21 detected in oocytes collected when BGHI was higher or lower than 80, but did not present
22 a significant effect in relation to the BGHI of the OPU day in any of the breeds evaluated.
23 Probably this protein is not involved in the directly response to heat stress in oocytes.

24 The results of this study demonstrated that the mechanisms of
25 thermoregulation of Crossbred milk cows and adapted *Bos taurus taurus* cows are
26 efficient in maintaining the rectal temperature, however, looking for RF and oocyte
27 viability, it is evident the need of alternatives of management that improve the thermal
28 comfort of Crossbred milk cows when the enviroment temperatures are about 30°C
29 (BGHI> 80).

30 On the other hand a higher adaptability of the adapted *Bos taurus taurus* to
31 the swings of the climate in the brazilian wetland could be seen. However, although RT
32 and RF not changed in the different climage situations, a kind of cold stress was observed,
33 since HSP 70 have been recruited when enviroment temperatures were below 23°C
34 (BGHI<80). Therefore, OPU day can be chosen with care so that these animals do not

1 suffer from thermal stress. This information is relevant to the breed conservation nuclei,
 2 which can more systematically program the *in vitro* production of embryos based on the
 3 region's climatic history.

4 In conclusion, chronic heat stress, that means BGHI>80 for 90 days before
 5 OPU session, negatively affects oocyte viability of crossbred milk cows, but not of the
 6 adapted *Bos taurus taurus* (Pantaneira). The acute heat stress, that means BGHI>80 on
 7 the day of OPU session, negatively affect the RF of crossbred milk cows and lead to a
 8 recruitment of HSP 70 to protect oocyte maturation. In adapted *Bos taurus taurus* the
 9 same occurs when BGHI was <80. In addition, the Pantaneira breed produced almost
 10 twice as much as HSP70 when compared to the Girolando breed, showing that this protein
 11 must be involved in the mechanisms of adaptation to heat of pantanal.

12

13 **5. Bibliographic references**

- 14 [1] Silva RG. Introdução à bioclimatologia animal. São Paulo 2000.
 15 [2] Buffington ED, Collazo-Arocho A, Canton HG, Pitt D, Thatcher WW, Collier JR.
 16 Black Globe-Humidity Index (BGHI) as Comfort Equation for Dairy Cows.
 17 Transactions of the ASAE. 1981;24:711.
 18 [3] Silva EMNd, Souza BBd, Silva GdA, Cezar MF, Souza WHd, Benício TMA, et al.
 19 Avaliação da adaptabilidade de caprinos exóticos e nativos no semi-árido paraibano.
 20 Ciência e Agrotecnologia. 2006;30:516-21.
 21 [4] Beede DK, Collier RJ. Potential Nutritional Strategies for Intensively Managed
 22 Cattle during Thermal Stress 1, 2. Journal of animal science. 1986;62:543-54.
 23 [5] Damasceno JC, Baccari Jr F, Targa LA. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas
 24 holandesas com acesso à sombra constante ou limitada. Revista Sociedade Brasileira de
 25 Zootecnia. 1998;27:595-602.
 26 [6] Silanikove N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic
 27 ruminants. Livestock Production Science. 2000;67:1-18.
 28 [7] Santos R. Os cruzamentos na pecuária moderna. Agropecuária tropical. 1999.
 29 [8] Martello LS, Savastano Jr. H, Pinheiro MG. Avaliação do microclima de instalações
 30 para gado de leite com diferentes recursos de climatização. Engenharia Agrícola.
 31 2004;24:263-73.
 32 [9] Bényei B, Barros CCW. Variações fisiológicas de parâmetros reprodutivos em vacas
 33 de raça Holandesa importadas da Hungria para o Nordeste brasileiro. Brazilian Journal
 34 of Veterinary Research. 2000;37:online.
 35 [10] Pires MFA, Ferreira AM, Saturnino HM, Teodoro RL. Taxa de gestação em
 36 fêmeas da raça Holandesa confinadas em free stall, no verão e inverno. Arquivo
 37 Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2002;54:57-63.
 38 [11] Castro SV, Lobo CH, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Proteínas de choque térmico
 39 Hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. Acta Veterinaria Brasilica.
 40 2013;7:261-71.
 41 [12] Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell.
 42 1998;92:351-66.
 43 [13] Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular
 44 mechanism. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2005;62:670-84.

- 1 [14] Paula-Lopes FF, Chase CC, Jr., Al-Katanani YM, Krininger CE, 3rd, Rivera RM,
2 Tekin S, et al. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle:
3 differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of
4 preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased
5 culture temperatures. *Reproduction* (Cambridge, England). 2003;125:285-94.
- 6 [15] Fialho ALL, Souza-Cáceres MB, Silva WAL, Arruda EDS, Kischel H, Ribeiro-
7 Ferreira MGC, et al. Efeito do estresse térmico calórico agudo e crônico sobre a
8 qualidade oocitária de bovinos de raças adaptadas. *Arquivo Brasileiro de Medicina
9 Veterinária e Zootecnia*. 2018;in press.
- 10 [16] Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A Body Condition
11 Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of dairy science*. 1989;72:68-78.
- 12 [17] Poehland R, Tomek W, Becker F, Kurth J, Kanitz W, Bhojwani S. Qualitative and
13 quantitative differences of cytoskeleton proteins in embryos produced in vitro, in vivo,
14 and by somatic nuclear transfer. *Molecular reproduction and development*.
15 2008;75:1109-19.
- 16 [18] Inmet. Instituto Nacional de Meteorologia - Estação Meteorológica de Observação
17 de Superfície Automática. Brasília - DF.
- 18 [19] Abreu PG, Abreu VMN, Franciscon L, Coldebella A, Amaral AG. Estimativa da
19 temperatura de globo negro a partir da temperatura de bulbo seco. *Engenharia na
20 agricultura*. 2011;19:557-63.
- 21 [20] NWSCR. National Weather Service Central Region - Livestock hot weather stress.
22 Regional operations manual letter; 1976.
- 23 [21] PBMC PBdMC-. Temperatura média global cresce 0,17 grau Celsius por década.
24 2017.
- 25 [22] Torres-Junior JRS, Pires AMF, Sa WF, A. FM, Viana JH, Camargo LS, et al.
26 Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos
27 indicus* cattle. *Theriogenology*. 2008;69:155-66.
- 28 [23] Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular growth:
29 Local interactions and nutritional influences. *Journal of animal science*. 2004;82:63-74.
- 30 [24] Gendelman M, Roth Z. Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is
31 further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos
32 associated with reduced developmental competence. *Biology of reproduction*.
33 2012;86:1-9.
- 34 [25] Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. The effects
35 of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental competence, ROS,
36 GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote* (Cambridge,
37 England). 2012;20:249-59.
- 38 [26] Li Q, Wang YL, Xie J, Sun WJ, Zhu M, He L, et al. Characterization and
39 expression of DDX6 during gametogenesis in the Chinese mitten crab *Eriocheir
40 sinensis*. *Genetics and molecular research : GMR*. 2015;14:4420-37.
- 41 [27] Edwards JL, Saxton AM, Lawrence JL, Payton RR, Dunlap JR. Exposure to a
42 physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation in bovine
43 oocytes. *Journal of dairy science*. 2005;88:4326-33.
- 44 [28] Guzeloglu A, Ambrose JD, Kassa T, Diaz T, Thatcher MJ, Thatcher WW. Long-
45 term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy
46 cows subjected to acute heat stress. *Animal reproduction science*. 2001;66:15-34.
- 47 [29] De Rensis F, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in
48 the dairy cow--a review. *Theriogenology*. 2003;60:1139-51.
- 49 [30] Bilby TR, Tatcher WW, Hansen PJ. Estratégias farmacológicas, nutricionais e de
50 manejo para aumentar a fertilidade de vacas leiteiras sob estresse térmico. *Anais do*

- 1 XIII Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos. Uberlândia 2009.
2 p. 59-71.
- 3 [31] Hansen PJ. Manejo da vaca de leite durante o estresse calórico para aumento da
4 eficiência reprodutiva. XI curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos.
5 Uberlândia - MG2007. p. 3-12.
- 6 [32] Du Preez JH. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in
7 dairy cattle in South Africa. The Onderstepoort journal of veterinary research.
8 2000;67:263-71.
- 9 [33] Cruz LV, Angrimani DSR, Rui BR, Silva MA. Efeitos do estresse térmico na
10 produção leiteira: Revisão de literatura. Revista científica eletrônica de medicina
11 veterinária. 2011;IX.
- 12 [34] Azevedo M, Pires MFA, Saturnino HM, Lana AMQ, Sampaio IBM, Monteiro
13 JBN, et al. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade
14 para vacas leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês-Zebu em lactação. Revista Brasileira de
15 Zootecnia. 2005;34:2000-8.
- 16 [35] Cunningham JG. Tratado de fisiologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara
17 Koogan; 2004.
- 18 [36] Sousa Jr. SC, Morais DAEF, Vasconcelos AM, Nery KM, Morais JHG,
19 Guilhermino MM. Características termorreguladoras de caprinos, ovinos e bovinos em
20 diferentes épocas do ano em região semi-árida. Revista Científica de Produção Animal.
21 2008;10:127-37.
- 22 [37] Esmay ML. Principles of animal environment. AVI: Westport; 1979.
- 23 [38] Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E. Heat stress in lactating dairy
24 cows: a review. Livestock Production Science. 2002;77:59-91.
- 25 [39] Baccari Jr F, Polastre R, Fré CA, Assis PS. Um novo índice de tolerância ao calor
26 para bubalinos: correlação com o ganho de peso. Reunião Anual da Sociedade
27 Brasileira de Zootecnia. Campo Grande -MS1986. p. 316.
- 28 [40] Marques Jr. HR, Juliano RS, Abdo y. Bovino pantaneiro: retrospectiva histórica e
29 fomento à raça. . Multitemas. 2012;42:71-86.
- 30 [41] Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and
31 preimplantation embryos to heat shock. Molecular reproduction and development.
32 1997;46:138-45.
- 33 [42] Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes
34 in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane
35 properties and fatty acid composition of follicles. Reproduction (Cambridge, England).
36 2001;121:447-54.
- 37 [43] Payton RR, Rispoli LA, Saxton AM, Edwards JL. Impact of heat stress exposure
38 during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA
39 populations. The Journal of reproduction and development. 2011;57:481-91.
- 40 [44] Yadav A, Singh KP, Singh MK, Saini N, Palta P, Manik RS, et al. Effect of
41 physiologically relevant heat shock on development, apoptosis and expression of some
42 genes in buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced in vitro. Reproduction in
43 domestic animals = Zuchthygiene. 2013;48:858-65.
- 44 [45] Camargo LS, Viana JH, Ramos AA, Serapiao RV, de Sa WF, Ferreira AM, et al.
45 Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained
46 from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. Theriogenology.
47 2007;68:626-32.
- 48 [46] Baêta FC, Souza CF. Ambiência em edificações rurais - conforto animal. Viçosa:
49 Editora da UFV; 1997.

- 1 [47] Pratt WB, Morishima Y, Osawa Y. The Hsp90 Chaperone Machinery Regulates
- 2 Signaling by Modulating Ligand Binding Clefs. *The Journal of biological chemistry*.
- 3 2008;283:22885-9.
- 4

6. DISCUSSÃO GERAL

A raça Pantaneira é de suma importância para o aumento da produção de carne e leite no Pantanal. É uma raça considerada resistente ao calor, com características ideais para se manter produzindo no ambiente quente da região pantaneira. Da mesma forma, a raça Girolando foi criada para produzir mais leite nas intempéries climáticas da região tropical. Essa raça é responsável pela maior parte da produção de leite do Brasil. A raça Nelore é hoje a raça mais utilizada para produção de carne no país, rústica, resistente e adaptada. Mesmo sendo consideradas raças resistentes ao ETC, todas elas apresentam sinais de injúrias quando submetidas a altas temperaturas *in vivo* ou *in vitro*.

A criação bovina no Pantanal é intensa e caracteriza-se por grandes piquetes com árvores baixas e em pequena quantidade. Desta forma, os animais não conseguem abrigo quando em situação de ETC. Diante dos resultados destes experimentos e sabendo que o ETC afeta a produção e reprodução, desde folículos até gestação, é possível sugerir o aumento da área sombreada nos piquetes. Ainda no presente experimento foi possível observar o efeito negativo do ETC na qualidade dos oócitos 90 dias antes da OPU. Mais uma vez, demonstrando a importância da sombra nos piquetes durante todo o ano. Para tentar minimizar os efeitos do ETC, os bovinos realizam uma série de mecanismos. A alteração da FR do animal é um dos primeiros sinais de estresse térmico, assim como a alteração da TR. Sendo assim, foi possível observar que a raça Pantaneira não sofre ETC na região pantaneira, pois não apresentou alteração anormal da FR e da TR.

Foi possível observar que a raça Pantaneira apresentou efeitos negativos em temperaturas mais baixas. Este fato, pode ter acontecido pelos poucos dias de frio no Pantanal. A raça se adaptou ao calor, desta forma os dias de frio provocam estresse térmico nos animais. Já a raça Girolando, mesmo sendo criada para minimizar efeitos do ETC, é sensível ao estresse crônico e demonstra necessidade ainda maior do aumento do número de sombra e manejos para minimizar o estresse.

A PIVE a partir de oócitos obtidos por OPU é cada vez maior no Brasil e é de suma importância conhecer da influência do ambiente em que os animais vivem sobre a produção de blastocistos, ou ainda, para conhecer os mecanismos

1 que podem ajudar no controle do ETC. Desta forma, as temperaturas de 37°C e
2 40°C in vitro, mostra como a temperatura e/ ou ETC afetam a qualidade dos
3 oócitos, e conseqüentemente a taxa de produção de blastocisto. O ETC pode
4 causar redução hormonal nos animais, diminuindo sinais de cio, influenciando a
5 ovulação e a retomada da meiose dos oócitos. O embrião é ainda mais sensível
6 a esse estresse calórico, de forma que, ao sofrerem estresse calórico, aumentam
7 a produção de ROS nas células. Essas espécies reativas provocam danos no
8 DNA e desencadeiam o processo de apoptose celular. Neste momento, as HSPs
9 e sirtuínas, com o intuito de proteger a célula, atuam na reparação do DNA
10 danificado. Neste experimento, foi possível observar uma alteração na
11 expressão das sirtuínas e HSPs diante do grau de estresse sofrido. Apesar de
12 muitas pesquisas serem realizadas para avaliar a ação dessas proteínas, pouco
13 se sabe sobre seus mecanismos contra o estresse térmico, sendo necessário,
14 mais pesquisas para que se possa elucidar esse mecanismos de ação em raças
15 bovinas.

16 Para avaliar o ETC sofrido pelo animais no Pantanal, o ITGU se
17 mostra mais efetivo, pois sua fórmula foi desenvolvida baseada em resultados
18 de campo. Apesar deste fato, o ITGU é classificado para raças europeias, e
19 talvez seja necessário que se faça diferentes classificações para as diferentes
20 raças, já que cada raça reage de maneira específica e diferente ao ETC.

21 Em resumo, a temperatura de maturação do oócito já levemente
22 aumentada (+1,5°C) afeta negativamente a taxa de clivagem e de blastocisto in
23 vitro, porém não afeta a taxa de maturação meiótica dos oócitos. A expressões
24 dos genes da sirtuína são influenciadas em oócitos e células da granulosa,
25 durante a maturação de oócitos em temperaturas alteradas. O aumento da
26 quantidade de HSP70 nas células do cumulus de acordo com o aumento da
27 temperatura de maturação, indica sua função de proteção aos oócitos, enquanto
28 a HSP 90 parece atuar preparando as células para a ação da HSP 70. E que
29 apesar da raça Girolando ser considerada adaptada, claramente sofreu com a
30 alteração climática, mesmo não estando em lactação. a raça Pantaneira,
31 também considerada uma raça adaptada, apresentou um comportamento
32 diferente. Não apresentou alteração fisiológica da TR e FR em nenhuma das
33 condições climáticas estudadas. E diferente do esperado para uma raça taurina,
34 apresentou intensidade elevada de HSP 70 e 90 em ITGU de conforto e alerta e

1 as melhores taxas de viabilidade oocitária observadas foram em ITGUs de perigo
2 e crítico 90 dias antes da OPU.

3 De fato a classificação proposta por Buffigton et al. não se aplica para
4 as raças utilizadas no Brasil, já que a TR não ultrapassou a fisiológica para a
5 espécie mesmo quando alcançou níveis críticos de estresse, ou seja > 84, que
6 no caso de estudo chegou a 94. No entanto, mecanismos fisiológicos precisaram
7 ser acionados para que a homeostase e consequentemente a TR fosse mantida.
8 Nesse estudo, a FR foi superior à fisiológica quando ITGU foi superior a 84 e as
9 HSPs quando ITGU foi 75. E por fim a viabilidade oocitária reduziu linearmente
10 de acordo com o aumento do ITGU 90 dias antes da OPU.

11

7. CONCLUSÕES

Com esses experimentos foi possível concluir:

- O aumento na temperatura de maturação do oócito de bovinos *Bos taurus taurus* a $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas afeta negativamente a taxa de blastocistos após a fertilização in vitro. A maturação a temperaturas alteradas leva a várias alterações bioquímicas celulares, como a expressão dos genes das sirtuínas, BCL11a e p53 em oócitos e células granulosas do BCB + bovinos.

- O estresse térmico de $1,5^{\circ}\text{C}$ menor e maior que a temperatura ideal de maturação do oócito causa efeitos negativos na taxa de clivagem e blastocisto, mas não afeta a taxa de maturação meiótica dos oócitos. O aumento da quantidade de HSP70 nas células do cumulus, de acordo com o aumento da temperatura de maturação, indica a função de proteção do oócito, enquanto a HSP 90 parece agir para preparar as células para a ação da HSP 70. Considerando o nível de HSP no grupo controle ($38,5^{\circ}\text{C}$) o limite, poderíamos dizer que os oócitos se sentiram mais à temperatura de 37°C . Como não houve diferença entre os grupos $38,5^{\circ}\text{C}$ e 40°C , é possível que os oócitos não tenham sido estressados pelo efeito citoprotetor por células do cumulus, no entanto, isso ainda precisa ser melhor estudado. A menor taxa de blastocistos e a ação paralela das HSPs demonstram que as vacas Nelore criadas em ambiente hostil, como o pantanal brasileiro, afetam a produção in vitro de embriões quando ocorre a maturação in vitro em situações de estresse crônico (24 horas de MIV) por temperatura mais baixa (37°C) e calor (40°C).

- O estresse por calor crônico, que significa BGHI > 80 por 90 dias antes da sessão de OPU, afeta negativamente a viabilidade ovocitária de vacas leiteiras mestiças, mas não do *Bos taurus taurus* adaptado (Pantaneira). O estresse térmico agudo, que significa BGHI > 80 no dia da sessão de OPU, afeta negativamente o FR de vacas leiteiras mestiças e leva a um recrutamento de HSP 70 para proteger a maturação do oócito. Em *Bos taurus taurus* adaptado, o mesmo ocorre quando o BGHI era <80. Além disso, a raça Pantaneira produziu quase o dobro da HSP70 quando comparada à raça Girolando, mostrando que esta proteína deve estar envolvida nos mecanismos de adaptação ao calor do pantanal.

1 8. ANEXOS

2

3 Durante a realização deste trabalho, foram gerados os artigos que seguem nos
4 anexos abaixo.

Antral follicles population in heifers and cows of Nelore and Girolando breeds

População de folículos antrais em vacas e novilhas da raça Nelore e Girolando

Jair Sábio de Oliveira Junior¹; Christopher Junior Tavares Cardoso¹; Wilian Aparecido Leite da Silva¹; Henrique Kischel²; Mirela Brochado Souza³; Evelyn Rabelo Andrade⁴; Erikliis Nogueira⁵; Katia Cristina Silva-Santos⁶; Marcelo Marcondes Seneda⁷; Fabiana de Andrade Melo-Sterza^{8*}

Abstract

The aim of this study was to evaluate ovarian antral follicle populations (OAFP) of Nelore and Girolando breed heifers (12–18 months old) and cows (24–60 months old). Animals were assigned to four groups: (1) Nelore cows (n = 18), (2) Girolando cows (n = 20), (3) Nelore heifers (n = 7), and (4) Girolando heifers (n = 7). Cows were treated to synchronize follicular wave emergence by implantation of an intravaginal device containing 1.9 g of progesterone, as well as intramuscular administration of 2 mg of estradiol benzoate and 25 mg of dinoprost. This synchronization treatment was administered at a random day of the estrous cycle of each cow, designated D0. Intravaginal devices were removed on D7, and on D11, OAFP counts were performed by transvaginal ovarian ultrasound. For each cow, all follicles ≥ 3 mm in diameter were counted in both ovaries and counts were performed three times at 35-day intervals. Counts were also obtained from heifers, but these animals were not treated for synchronization of follicular wave emergence. Analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test and Pearson's correlation test were used to compare mean OAFPs between counts as well as mean OAFPs between breed and age groups. No differences were observed in mean OAFPs between Nelore and Girolando cows (30.9 vs. 26.7, respectively; $P > 0.05$) or heifers (16.2 vs. 18.1, respectively; $P > 0.05$). However, within each breed, there were differences in mean OAFPs between heifers and cows (for Nelore cattle: 16.2 and 30.9, respectively; for Girolando cattle: 18.1 and 26.7, respectively; both $P < 0.05$). In conclusion, OAFPs were similar between Nelore and Girolando breeds and were influenced by age. Furthermore, we observed a high correlation for individual animals between the mean numbers of follicles counted in both ovaries and total number of follicles counted in either the right or left ovary, indicating that the evaluation of a single ovary is sufficient to estimate the OAFP of an individual.

Key words: Ovary, ultrasonography, bovine

¹ Discentes do curso de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, UEMS, Aquidauana, MS, Brasil. E-mail: jairvt@uol.com.br; christopherjtc@hotmail.com; wilian.leite@live.com

² Discente do curso de Zootecnia, UEMS, Aquidauana, MS, Brasil. E-mail: kischel.henrique@gmail.com

³ Discente do curso de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil. E-mail: mirela.mbs@gmail.com

⁴ Prof^a Dr^a, curso de graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Rondônia, UNIR, Rolim de Moura, RO, Brasil. E-mail: evelyn_andrade@yahoo.com

⁵ Pesquisador A do Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, CPAP, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Corumbá, MS, Brasil. E-mail: eriklis.nogueira@embrapa.br

⁶ Prof^a Dr^a, Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, PR, Brasil. Email: kati_cris@hotmail.com

⁷ Prof. Dr., Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UEL, PR, Brasil. E-mail: mseneda@uel.br

⁸ Prof^a Dr^a, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UEMS, Aquidauana, MS, Brasil. E-mail: fabiana.sterza@uems.br

* Author for correspondence

Resumo

Este estudo objetivou avaliar a população folicular antral ovariana (PFAO) de novilhas (12 a 18 meses) e vacas (24 a 60 meses) das raças Nelore e Girolando. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) vacas Nelore (n = 18); 2) vacas Girolando (n=20); 3) Novilhas Nelore (n=7) e; 4) Novilhas Girolando (n=7). Nos grupos das vacas, os animais receberam um dispositivo intravaginal com 1.9 g de progesterona, 2 mg de benzoato de estradiol IM e 25 mg de dinoprost IM, em um dia aleatório do ciclo estral (D0). No D7 o dispositivo de progesterona foi retirado. Os animais foram submetidos à ultrassonografia ovariana via transvaginal para contagem da PFAO no D11. Foram contados todos os folículos ≥ 3 mm de diâmetro em ambos os ovários. O procedimento de contagem da PFAO foi repetido três vezes, com intervalos de 35 dias entre as repetições. Para os grupos de novilhas foram adotados os mesmos procedimentos descritos acima, porém estes animais não receberam o tratamento de sincronização da emergência da onda folicular. Para avaliação da PFAO entre as contagens e da média das contagens entre as raças e os grupos, foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey a 5% de probabilidade e correlação de Pearson, através do programa SAS, utilizando o Proc GLIMMIX. Não foi observada diferença significativa ($p>0.05$) entre as médias das contagens da PFAO de vacas Nelore e Girolando (30.9 e 26.7, respectivamente) e das novilhas Nelore e Girolando (16.2 e 18.1, respectivamente). Porém, diferença significativa ($p<0.05$) da PFAO entre as categorias de novilhas e vacas da raça Nelore (16.2 e 30.9, respectivamente) e Girolando (18.1 e 26.7, respectivamente) foi observada. Com base nestes dados, conclui-se que a PFAO em fêmeas bovinas das raças Nelore e Girolando é semelhante e influenciada pela idade. Além disso, considerando a alta correlação observada entre a média de folículos dos dois ovários e a média de folículos dos ovários esquerdo e direito separadamente, sugere-se que a avaliação de um único ovário é suficiente para estimar a PFAO do indivíduo.

Palavras-chave: Bovinos, folículos antrais, ultrassonografia

Introduction

Girolando is a hybrid of Gir and Holstein breeds, combining the hardiness of *Bos taurus indicus* to the high productivity of *Bos taurus taurus*. Girolando was officially recognized as a breed by the Brazilian Agriculture Ministry relatively recently, in 1996, which explains the lack of information on reproductive physiology for this breed (SANTOS FILHO et al., 2001).

There are increasing attempts to improve bovine production through the development and application of reproductive biotechnologies that increase reproductive efficiency. Within the last five decades, a negative association between high production and fertility has been observed mainly in dairy cattle (SARTORI et al., 2010; WALSH et al., 2011), and there have been attempts to better understand and reduce this association. A low population of ovarian antral follicles has been associated with certain characteristics of reduced fertility, including smaller ovaries and low numbers of ovarian antral follicles and oocytes (IRELAND et al., 2008), low

rates of pregnancy at the end of the breeding season (MOSSA et al., 2012), diminished responsiveness to superovulation (SINGH et al., 2004; IRELAND et al., 2007), reduced progesterone and anti-Müllerian hormone concentrations (IRELAND et al., 2008; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009), and diminished endometrial thickness between days 0 and 6 of the estrus cycle (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009). Therefore, the reproductive potential of bovine females can be correlated to the ovarian antral follicle population – OAFP (IRELAND et al., 2008; EVANS et al., 2010; IRELAND et al., 2011; MOSSA et al., 2012) and this parameter could be considered as an auxiliary tool for selection of cattle with high reproductive efficiency.

An easy and reliable method for the selection of animals with high reproductive efficiency would contribute to improved livestock productivity. Considerable information on production performance of *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* animals is available, but little is known about crossbred cattle. Because good milk production can

be achieved at lower cost by using crossbred animals, a better understanding of the physiology and genetic selection of these cross breeds is necessary. This study is a complement to reported data for purebred cattle. Our aim was to evaluate OAFPs in Nelore and Girolando cattle using transvaginal ultrasonography and to compare OAFP values between breeds and age groups. The relationship between OAFP values from the right and left ovary in individual animals was also evaluated.

Materials and Methods

Animals

Healthy, non-pregnant, non-lactating female cattle with an average body condition score between 2.5 and 3.5 (5-point scale) were used. Animals were maintained on pasture (*Brachiaria brizantha* and *Panicum maximum*) and provided with water and mineral salt *ad libitum*. The property where animals were held was located in the Alto Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil (-20° 28' 16" latitude; -55° 47' 14" longitude; 147 m above sea level). For the period of the study, ambient temperature varied between 19°C and 37°C, relative air humidity was between 22% and 95%, and total rainfall was 267 mm (INMET, 2013). Cattle were assigned to four groups: (1) Nelore (*Bos indicus*) cows (n = 18), (2) Girolando (*Bos taurus indicus* ¼ × *Bos taurus taurus* ¾) cows (n = 20), (3) Nelore

heifers (n = 7), and (4) Girolando heifers (n = 7). All cows were between 24 and 60 months old and all heifers, between 12 and 18 months old during the experimental period. All cows were post-pubertal, cyclical, and non-lactating and had no contact with bulls. Heifers were probably pre-pubertal, based on evaluation of ovary characteristics and consideration of animal age.

Experimental protocol

Cows were treated to achieve synchronization of follicular wave emergence (Figure 1) at a random day in the estrus cycle, designated D0 of the study. Cows were implanted with an intravaginal device containing 1.9 g of progesterone (DP4-CIDR®, InterAg, Hamilton, New Zealand) and injected with estradiol benzoate (2 mg; EB-ESTROGIN®, Farmavet, Brazil) and dinoprost (25 mg; LUTALYSE®, Zoetis, São Paulo, Brazil), both intramuscularly. On D7, intravaginal devices were removed and on D11, OAFP counts were performed. Before each OAFP count, feces were removed from the rectum and the perineal area cleaned with tap water and 70% ethanol. The ovaries of each animal were visualized using a 7.5-convex intravaginal array transducer (Aquila PRO®, Pie Medical, Maastricht, The Netherlands), and the total number of antral follicles ≥ 3 mm in diameter was recorded. Counts were recorded from each animal three times at 35 day intervals.

Figure 1. Protocol for synchronization of follicular wave emergence prior to OAFP counting in cows.

D0*	D7*	D11	D46	D81
+DP4 EB Dinoprost	-DP4	1 ^a OAFP 1 st count	2 ^a OAFP 2 nd count	3 ^a OAFP 3 rd count

* Heifers did not receive this treatment; DP4 intravaginal progesterone device implanted (+) and removed (-); EB, estradiol benzoate; OAFP, Ovarian Antral Follicle Population.

Counts were taken from heifers as described above, except that in order to avoid early cycle induction in pre-pubertal animals, synchronization of follicular development was not carried out. The timing of the first count in relation to each animal's stage of ovarian follicular development was therefore random for heifers.

Statistical analysis

Ovarian antral follicle population values between counting events, as well as mean OAFPs between breed and age groups, were compared using an Analysis of variance (ANOVA) test with Tukey's post-hoc test and Pearson's correlation test. Tests were carried out at a level of significance of 5%, using SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) with Proc GLIMMIX software.

Results

Mean OAFP counts for cows and heifers of each breed are presented in Table 2. Counts were performed three times for each individual animal and repeatability in counts was observed, with a positive correlation between counts regardless of cattle breed or age ($P < 0.05$; Table 1).

No influence of breed on OAFPs was observed, with mean OAFP values similar between Nelore and Girolando cattle ($P = 0.632$; Table 2). However, within each breed, differences in the mean OAFPs were observed between heifers and cows ($P < 0.001$ for both breeds; Table 2).

A high correlation was observed between the mean number of follicles counted from both ovaries and the total number of follicles counted in either the right or left ovary of an individual animal (Table 3).

Table 1. Correlation of mean OAFPs between counts, regardless of breed and age.

	FP 1 × FP 2	FP 1 × FP 3	FP 2 × FP 3
Follicles Population Means	27.60 × 26.08	27.60 × 22.96	26.08 × 22.96
Correlation	0.54 (n = 47)	0.55 (n = 51)	0.48 (n = 48)
Significance	<0.0001	<0.0001	0.0005

FP 1, mean OAFP at first count; FP 2, mean OAFP at second count; FP 3, mean OAFP at third count.

Table 2. Adjusted mean OAFPs of cows and heifers (Nelore and Girolando breeds).

Groups	Breed	Adjusted Mean	Standard Error
Cows (n = 20)	Girolando	26.7 a	1.7
Cows (n = 18)	Nelore	30.9 a	1.8
Heifers (n = 7)	Girolando	18.1 b	2.8
Heifers (n = 7)	Nelore	16.2 b	2.8

a,b in the same column differ significantly ($P < 0.05$), Tukey's test.

Table 3. Correlation between the mean antral follicle population of the pair of ovaries and antral follicle population in the left or right ovary at each evaluation.

	LO1	LO2	LO3	RO1	RO2	RO3
Mean OAFP	13.96	12.47	11.69	13.64	13.60	11.26
Correlation	0.85787	0.80757	0.74665	0.79060	0.68977	0.56853
Significance	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

LO1, mean OAFP in the first count of the left ovary (LO); LO2, mean OAFP in the second count of the left ovary; LO3, mean OAFP in the third count of the left ovary; RO1, mean OAFP in the first count of the right ovary; RO2, mean OAFP in the second count of the right ovary; RO3, mean OAFP in the third count of the right ovary; Mean Fol – mean OAFP for the pair of ovaries from all three counts.

Discussion

The evaluation of OAFPs is an excellent tool for assisted reproductive programs (ART) in women and increases the accuracy of predicting high responsiveness of patients undergoing follicle stimulating hormone (FSH) treatment. For cattle, improved success of *in vitro* embryo production has been associated with high numbers of recovered cumulus oophorus complexes (COCs) from bovine females (PONTES et al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2014a, 2014b). However, high individual and between-breed variations in oocyte production have been observed and researchers seek to identify mechanisms underlying such variability.

The estrus cycles of the cows were synchronized prior to the first OAFP count so that the study was initiated with all cows at the same stage of follicular development. Subsequent counts were performed twice at 35-day intervals without synchronization and in accordance with other studies (CUSHMAN et al., 2009; SILVA-SANTOS et al., 2014a), no influence of stage of estrous cycle on OAFPs was observed. However, based on consideration of ovary characteristics as well as the historical age at puberty for Girolando and Nelore breeds in the study region, heifers were considered to be pre-pubertal at the time of the study and were therefore not subjected to the estrus synchronization treatment administered to cows. This was done to avoid early ovarian cycle induction of heifers and resulted in evaluations of OAFPs in heifers at random time points relative to the stage of ovarian development

for each individual animal. We demonstrated a high within-breed correlation between OAFP counts carried out at different time points (Table 1), in accordance with previous reports for Nelore and Braford cattle (SILVA-SANTOS et al., 2014a, 2014b). We therefore conclude that a single count of antral follicles at a random day during the estrus cycle can be used to predict the OAFP of Girolando cattle and to select individuals for breeding based on this characteristic.

Approximately 24 antral follicles emerge at each new follicular wave for *Bos taurus taurus* breeds (GINTHER et al., 1996). In a study that evaluated the first follicular growth wave in *Bos indicus*, a great number of follicles (around 50) was reported (BURATINI JUNIOR et al., 2000); in another study, 30–50 follicles have been recorded in *Bos indicus* (LOUREIRO et al., 2012). A previous study reported higher numbers of small follicles developing during a wave emergence in *Bos taurus indicus* (33.4 ± 3.2 follicles) compared to *Bos taurus taurus* cattle (25.4 ± 2.5 follicles; CARVALHO et al., 2008). Higher OAFPs in *Bos taurus indicus* cattle could be associated with higher plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and free insulin, which are responsible for increased granulosa cell sensitivity to FSH, and the promotion of follicular recruitment (ALVAREZ et al., 2000).

Historically, there is high variation in OAFPs of cattle from different farms and different country regions. This variation is probably related to unintentional bias in selection of animals with high

or low OAFPs in particular studies. In the present study, OAFPs of Nelore (*Bos taurus indicus*) and Girolando (*Bos taurus taurus* $\frac{3}{4}$ \times *Bos taurus indicus* $\frac{1}{4}$) cattle were comparable between the two breeds for both cows and heifers under the same environmental conditions. In a large-scale *in vitro* embryo production program, recovery of 20.4 COCs per ovum pick-up (OPU) for $\frac{3}{4}$ Girolando cattle (*Bos taurus taurus* $\frac{3}{4}$ \times *Bos taurus indicus* $\frac{1}{4}$) and 31.4 COCs per OPU for $\frac{1}{2}$ Girolando females (*Bos taurus taurus* $\frac{1}{2}$ \times *Bos taurus indicus* $\frac{1}{2}$) were reported (PONTES et al., 2010). These same authors also reported an average of 30.8 COCs for Nelore females (PONTES et al., 2011). These values are in agreement with those obtained from our study, considering that OAFP is strictly related to COC production.

The present study evaluated the influence of age on OAFPs for Nelore and Girolando breed cattle. Heifers were 12–18 months old (or 48–72 weeks) during the study period and had significantly different mean OAFPs when compared to cows of the same breed (Table 2). A significant increase in the number of follicles ≥ 3 mm in diameter in cattle of age 6–60 weeks has been described for beef heifers (HONARAMOOZ et al., 2004). Ovarian antral follicles develop in a wave-like fashion in calves as early as 2 weeks of age and this pattern resembles that seen in adult cattle. Serum concentrations of LH and FSH are high in cattle between 2 and 14 weeks of age, when numbers of ovarian follicles and maximum diameters of follicles are also observed to increase (EVANS et al., 1994a). In one study, no dramatic changes in follicle growth or in endocrine mechanisms controlling follicle growth were observed during the late pre-pubertal period, at the time of first ovulation, or in pubertal cattle (EVANS et al., 1994b). Marked growth of the reproductive tract observed in cattle within the first few months of age and prior to first ovulation reflects phases of increased ovarian follicle numbers and size (HONARAMOOZ et al., 2004). For beef heifers and cows, OAFPs have been correlated to birth

weight and to age with an increased number of antral follicles observed until 5 years of age, following which decreasing OAFPs are seen (CUSHMAN et al., 2009). These reports are in accordance with our observation of differences in OAFPs between Nelore heifers (16.2 follicles) and cows (30.9 follicles), and between Girolando heifers (18.1 follicles) and cows (26.7 follicles), confirming an increase in OAFPs in cattle of these breeds between the ages of 12 and 60 months (Table 2). However, different results have been observed in Braford cattle, which show similar OAFPs from weaning to yearling ages in females with either high or low OAFPs, (SILVA-SANTOS et al., 2014a) as well as in Holstein cows and heifers (BURNS et al., 2005). It is known that OAFP is established under the influence of several factors, including concentrations of circulating insulin, insulin-like growth factor I, and anti-Müllerian hormone (ALVAREZ et al., 2000; SATRAPA et al., 2013; BATISTA et al., 2014). Suppression of serum insulin-like growth factor I (IGFI) can be induced by active immunization against growth hormone-releasing factor or by chronic nutritional restriction, with consequential alterations in FSH, LH, and estradiol serum concentrations. This results in changes in numbers and mean diameter of ovarian antral follicles and culminates in delayed puberty in heifers (SCHOPPEE et al., 1996). In consideration of these points endocrine mechanisms, environment conditions, individual variability, or a combination of these factors, could explain discrepancies observed between different studies as outlined above.

In the present study, we observed a high correlation between the mean number of antral follicles based on counts of both ovaries, and the number of antral follicles for each ovary – left or right (Table 3). Estimation of OAFPs using the weight of the ovary contralateral to that bearing the corpus luteum (CL) has been described in heifers (MURASAWA et al., 2005). In our study, although the presence of the CL was not evaluated, the strong positive relationship in the number of antral follicles

between left and right ovaries is in agreement with previous work by Erickson (1966) and Cushman et al. (2009). Based on this, we propose that an OAFP value can be determined for an individual by ultrasound evaluation of a single ovary. This is an important finding for the application of OAFP counts in the field, as single-ovary counts will reduce the time taken for ultrasonography of each animal, improving efficiency and reducing the welfare impact of prolonged restraint on individual animals.

Conclusion

In summary, OAFPs of Nelore and Girolando were found to be positively correlated between counts within each breed, suggesting that one ovarian ultrasound evaluation is adequate to evaluate OAFPs of cattle. Mean OAFPs were similar between Nelore and Girolando cattle and in both breeds were influenced by animal age, with lower OAFPs observed in heifers. Furthermore, the OAFP of a single ovary can be used to determine the OAFP of each individual, improving the practicality of this technique for use in the field.

References

- ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE JUNIOR, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 78, n. 5, p. 1291-1302, may 2000.
- BATISTA, E. O. S.; MACEDO, G. G.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M. D. D. V.; SÁFILHO, M. F.; DEL VALLE, T. A.; JESUS, E. F.; LOPES, R. N. V. R.; RENNÓ, F. P.; BARUSELLI, P. S. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 49, n. 3, p. 448-452, apr. 2014.
- BURATINI JUNIOR, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BO, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, Stoneham, v. 54, n. 3, p. 421-431, aug. 2000.
- BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction*, New York, v. 73, n. 1, p. 54-62, mar. 2005.
- CARVALHO, J. B.; CARVALHO, N. A.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in Bos indicus, Bos indicus x Bos taurus, and Bos taurus heifers. *Theriogenology*, Stoneham, v. 69, n. 2, p. 167-175, 15 jan. 2008.
- CUSHMAN, R. A.; ALLAN, M. F.; KUEHN, L. A.; SNELLING, W. M.; CUPP, A. S.; FREELY, H. C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 87, n. 6, p. 1971-1980, jun. 2009.
- ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, Savoy, v. 25, n. 3, p. 800-805, aug. 1966.
- EVANS, A. C.; MOSSA, F.; FAIR, T.; LONERGAN, P.; BUTLER, S. T.; ZIELAK-STECIWKO, A. E.; SMITH, G. W.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L.; IRELAND, J. J. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *Society for Reproduction and Fertility Supplement*, Colchester, v. 67, n. 1, p. 421-429, 2010.
- EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 100, p. 187-194, mar. 1994a.
- _____. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 102, p. 463-470, jun. 1994b.
- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, New York, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, dec. 1996.

- HONARAMOOZ, A.; ARAVINDAKSHAN, J.; CHANDOLIA, R. K.; BEARD, A. P.; BARTLEWSKI, P. M.; PIERSON, R. A.; RAWLINGS, N. C. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 80, n. 1-2, p. 15-29, jan. 2004.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. Aquidauana: IMET, 2013. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>>. Acesso em: 12 dez. 2013.
- IRELAND, J. J.; SMITH, G. W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, East Melbourne, v. 23, n. 1, p. 1-14, 2011.
- IRELAND, J. J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction*, Oxford, v. 22, n. 6, p. 1687-1695, jun. 2007.
- IRELAND, J. L.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMEN, A. P.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C.; IRELAND, J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction*, New York, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, dec. 2008.
- JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L.; SMITH, G. W.; HOU, X.; DAVIS, J. S.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C.; IRELAND, J. J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biology of Reproduction*, New York, v. 80, n. 6, p. 1272-1281, jun. 2009.
- LOUREIRO, B.; ERENO, R. L.; FAVORETO, M. G.; PUPULIM, A. G.; FONTES, P. K.; TICIANELLI, J. S.; PINTO, R. F. P.; CASTILHO, A. C. S.; BARROS, C. M. Expression of androgen producing enzymes in low and high follicle count Nelore cows. *Animal Reproduction*, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 458-458, jul./sept. 2012.
- MOSSA, F.; WALSH, S. W.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; EVANS, A. C. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 95, n. 5, p. 2355-2361, may 2012.
- MURASAWA, M.; TAKAHASHI, T.; NISHIMOTO, H.; YAMAMOTO, S.; HAMANO, S.; TETSUKA, M. Relationship between ovarian weight and follicular population in heifers. *Journal of Reproduction and Development*, Cambridge, v. 51, n. 5, p. 689-693, oct. 2005.
- PONTES, J. H.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, Stoneham, v. 75, n. 9, p. 1640-1646, jun. 2011.
- PONTES, J. H.; SILVA, K. C.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P.; VIEIRA, P. H.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, Stoneham, v. 74, n. 8, p. 1349-1355, nov. 2010.
- SANTOS FILHO, A.; OLIVEIRA, M. A.; CALDAS, J. G.; LIMA, P. F.; DONATO, I. V. Ovarian follicular dynamics of five-eighths Girolando cows. *Reproduction of Domestic Animals*, Malden, v. 36, n. 3-4, p. 207-210, aug. 2001.
- SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; WILTBANK, M. C. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, Collingwood, v. 22, n. 1, p. 151-158, 2010.
- SATRAPA, R. A.; CASTILHO, A. S.; RAZZA, E. M.; PEGORER, M. F.; PUELKER, R.; BARROS, C. M.; Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 138, n. 3-4, p. 155-158, may 2013.
- SCHOPPEE, P. D.; ARMSTRONG, J. D.; HARVEY, R. W.; WHITACRE, M. D.; FELIX, A.; CAMPBELL, R. M. Immunization against growth hormone releasing factor or chronic feed restriction initiated at 3.5 months of age reduces ovarian response to pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone at 6 months of age and delays onset of puberty in heifers. *Biology of Reproduction*, New York, v. 55, n. 1, p. 87-98, feb. 1996.

- SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C.; SENEDA, M. M. Antral follicle populations and embryo production--in vitro and in vivo--of *Bos indicus-aurus* donors from weaning to yearling ages. *Reproduction of Domestic Animals*, Malden, v. 49, n. 2, p. 228-232, apr. 2014a.
- SILVA-SANTOS, K. C.; SILOTO, L. S.; SANTOS, G. M.; MOROTTI, F.; MARCANTONIO, T. N.; SENEDA, M. M. Comparison of antral and preantral ovarian follicle populations between *Bos indicus* and *Bos indicus-aurus* cows with high or low antral follicles counts. *Reproduction of Domestic Animals*, Malden, v. 49, n. 1, p. 48-51, feb. 2014b.
- SINGH, J.; DOMINGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G. P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, Stoneham, v. 62, n. 1-2, p. 227-243, jul. 2004.
- WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 123, n. 3-4, p. 127-138, feb. 2011.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Trimethylation of histone 3 at lysine 4 in cryopreserved bovine embryos produced *in vivo* with sexed semen



Mirela B. Souza Cáceres^a, Wilian A. Leite da Silva^b, Ana C. Bini de Lima^b,
 Jair S. de Oliveira Jr^c, Christopher J. Tavares Cardoso^b,
 Jonathan V. dos Santos^b, Evelyn R. Andrade^d, Mauricio M. Franco^e,
 Ralf Poehland^f, Fabiana de Andrade Melo Sterza^{b,*}

^a Animal Reproduction Laboratory, Department of Veterinary Clinic, Agrarian Science Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^b Animal Science, State University of Mato Grosso do Sul (UEMS), Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brazil

^c Veterinary Medicine, Biomedical Sciences Faculty de Cacoal, Cacoal, Rondonia, Brazil

^d Veterinary Medicine, Federal University Foundation of Rondonia, Rolim de Moura, Rondonia, Brazil

^e Laboratory of Animal Reproduction, Embrapa-Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Distrito Federal, Brazil

^f Department of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Dummerstorf, Mecklenburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2015

Received in revised form 19 May 2016

Accepted 13 June 2016

Keywords:

Epigenetics

H3K4

semen

Superovulation

Cattle

ABSTRACT

The production rates of viable embryos using sexed semen through the conventional methodologies of multiple ovulation and embryo transfer are generally not satisfactory. However, the cryopreservation of these embryos is considered efficient. Knowledge of epigenetics can provide new tools or allow for adapting new protocols that could enhance the efficiency of reproductive biotechnologies. The aim of this study was to characterize the pattern of trimethylation of histone 3 at lysine 4 (H3K4me3) in bovine embryos produced *in vivo* with sexed semen that were submitted to cryopreservation. *Bos taurus* × *Bos indicus* cows (n = 5) were superovulated and inseminated with sexed (two sessions) or conventional (two sessions) semen. A portion of the embryos collected on Day 7 was immediately stored in paraformaldehyde (3%) and another portion was stored in paraformaldehyde after cryopreservation/thawing. All embryos from the four groups (fresh, conventional semen; fresh, sexed semen; cryopreserved, conventional semen; and cryopreserved, sexed semen; 15 embryos per group) were evaluated by immunofluorescence under confocal microscopy to identify and quantify the H3K4me3 status. In total, 190 embryos were recovered, 100 of which were produced with conventional semen and 90 with sexed semen. The use of conventional semen after superovulation yielded 72% (72 of 100) viable embryos, which were mostly (81%; 59 of 72) in advanced stages of development (blastocysts and expanded blastocysts). Embryos produced with sexed semen had a lower viability rate (36.7%; 33 of 90), and most of them were collected at earlier stages of development (morulae and early blastocysts; P < 0.05). The H3K4me3 signal was similar among groups; however, there was a difference between morulae and blastocysts. A high intensity of H3K4me3 was observed in bovine embryos produced *in vivo*, and this pattern did not vary using sexed semen and the slow cryopreservation process. The lower viability of bovine embryos produced with sexed semen could be not explained by differences in H3K4me. Cryopreservation did not alter the pattern of H3K4me3; in this sense, we suggest that it is a process that exerts minimal damage to the embryos.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +55 67 39042242; fax: +55 67 39042907.

E-mail address: fabiana.sterza@uems.br (F.deA. Melo Sterza).

1. Introduction

The production rates of viable embryos using sexed semen with the conventional methodologies of multiple ovulation and embryo transfer do not yield satisfactory results. Therefore, it is necessary to use a greater number of doses of semen per superovulated cow to obtain high embryo production [1], including a change in the artificial insemination (AI) schedule [2]. Semen sexing does not affect the sperm's ability to fertilize the oocytes, but it can affect the ability of embryos to develop normally after fertilization [3,4].

The progress of reproductive biotechnologies seems to have reached a limit, and its implementation relies on basic knowledge of the biology of gametes and embryos. These limiting factors provide an opportunity for integration of epigenetics knowledge. Gametes and embryos must pass through a broad epigenetic reprogramming process to be able to be fertilized and form a viable embryo [5,6]. However, epigenetic patterns may be susceptible to environmental changes such as temperature stress and/or physical and chemical processes [7].

Epigenetic modifications can occur through different mechanisms by which chromatin is modulated, including DNA methylation, that is, covalent modifications on histones and chromatin remodeling factors. The regulation of transcription can be accomplished through modifications in the amino terminal regions of histones, such as methylation, phosphorylation, acetylation, and ubiquitination [8]. DNA methylation involves the addition of a methyl group to the cytosine base in the DNA strand, which promotes transcriptional repression and is especially prevalent in mammals [9].

The high number of residues that can be modified on the tails of histones and the correlation of individual changes with various nuclear processes and specific combinations of histone modifications characterize the “histone code,” which determines specific functions for each cell [10]. In this sense, the histone code has an important relationship with the chromatin structure [11].

The start and end points of the epigenetic reprogramming have not been well studied in many mammalian species. Certain modifications of histones are known to be essential for the establishment of meiotic maturation and development of the oocyte [12].

In general, methylation of histones is associated with transcriptional silencing, except in some cases such as methylation of histone 3 at lysine 4 (H3K4me), which is mainly associated with transcriptionally active chromatin, in forms mono-, di-, or trimethylated. The dynamic alteration of lysine methylation contributes to reversible and plastic regulation of gene expression in varieties of the cellular process, which contrasts with stable gene inactivation by DNA methylation [13]. The importance of H3K4me has been described for amphibian oogenesis [14], swine folliculogenesis [15], and mouse embryogenesis [16,17]. However, little is known about this epigenetic target with respect to bovine reproduction.

Although the general rate of transcription decreases during oocyte growth, histone acetylation and methylation of H3K4, which are associated with transcriptional

activation, increase [12]. The need for increased transcription in this period is justified by the need for formation of an mRNA reserve for early embryo development [18]. However, the heterogeneous presence of histone modifications (H3K4me1, H3K9me2, H3K4me3, H3K79me2, and H3K36me3) was reported in human sperm, and a potential association of this pattern with sperm quality was proposed [19].

In the mouse male pronucleus, there is a rapid replacement of protamines by acetylated histones after fertilization, which subsequently become methylated at the H3K4 position [20,21]. H3K4 trimethylation (H3K4me3) is associated with critical events such as differentiation and activation of the embryonic genome, which has been demonstrated in swine [22], human [23], and bovine [24] embryos. Environmental factors and reproduction biotechnologies such as *in vitro* culture, nuclear transfer, and cryopreservation can modify the epigenetic profile of gametes and embryos [25]. According to this background, we hypothesized that H3K4me3 would be less frequent in cryopreserved bovine embryos produced *in vivo* with sexed semen, owing to stress, with a consequent negative influence on their quality.

The knowledge generated from studies on the epigenetic patterns of embryos can be used to support the development of new tools or to adapt new protocols that enhance the efficiency of reproductive biotechnologies. Thus, the aim of this study was to characterize the pattern of H3K4me3 of bovine embryos produced *in vivo* with sexed or conventional semen before and after cryopreservation.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

The production of *in vivo* embryos was carried out at the Dairy Cattle Department and the Laboratory for Biotechnology of Animal Reproduction of the State University of Mato Grosso do Sul—Aquidauana University Unit (UEMS/UUAQ). All procedures were approved by the Committee of Ethic and Animal Use of the State University of Mato Grosso do Sul, Aquidauana—MS (protocol CEUA-UEMS 012–2013).

Nonpregnant, nonlactating, cyclic *Bos indicus* × *Bos taurus* cows (n = 5) were used. The mean age of the animals was 7 years with an average body condition score of 3 (scale of 1–5). The animals were maintained on a rotational grazing system with Mombasa (*Panicum maximum* cv. Mombasa) and Tanzania grass (*P maximum* cv. Tanzania), with mineral supplementation *ad libitum*.

The animals were held for four sessions of superovulation and insemination, including two sessions with sexed semen and two with conventional semen. All animals were subjected to AI with sexed (n = 2) and conventional (n = 2) semen to minimize individual effects. The mean interval between sessions was 60 days. Before this study, the animals were never submitted to superovulation procedures.

In each superovulation session, the collected embryos were divided into four groups: fresh/conventional semen, fresh/sexed semen, cryopreserved/conventional semen, and cryopreserved/sexed semen. The embryos were also

separated according to their stage of development. Morulae and early blastocysts were considered as earlier stages of development, and the blastocysts and expanded blastocysts were considered as advanced stages of development.

Epigenetic analyses were conducted with 15 embryos per group. Therefore, the number of thawed embryos was established to be sufficient to achieve 15 viable embryos after thawing.

2.2. Embryo production

The hormonal synchronization began at Day 0 (random day, in the morning) of the estrous cycle using the intra-vaginal device containing 1.9 g progesterone-P4 (Eazi Breed CIDR; Zoetis) and an intramuscular injection of 2 mg of estradiol benzoate (Estrogin; Biofarm). Starting 5 days later, the animals received a total amount of 200 IU porcine pituitary extract of FSH (Foltropin; Tecnopec) intramuscularly in eight decreasing doses every 12 hours (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10, and 10 IU); 48 hours after the first FSH injection (Day 6), animals received 25 mg of dinoprost tromethamine (Lutalyse; Zoetis) intramuscularly. On Day 7, two doses of 200 IU eCG (Novormon; Zoetis) were applied with a 12-hour interval. The progesterone devices were removed at the same period as the second injection of eCG on Day 7. Application of 12.5 mg LH (Lutropin; Tecnopec) took place 24 hours after withdrawal of the P4 device. Two AIs, at 12 and 24 hours after LH injection, were carried out with conventional or sexed semen from a single *Bos indicus* × *B taurus* bull of proved fertility. Semen of a single ejaculate was used in all procedures. Semen collection, sexing, and cryopreservation were conducted in a commercial AI Center (Semex Brazil). The experimental design and schedule are summarized in Figure 1.

The uterine flushing was performed 7 days after the first AI through nonsurgical transcervical uterine flushing. The collection medium used was Dulbecco's PBS (Cultilab) plus 5% fetal bovine serum (Sigma–Aldrich) previously heat treated at 37 °C. After flushing, each donor was treated with 25 mg of a prostaglandin F2 α analogue (Lutalyse; Zoetis). The uterine content was transferred to sterile Petri dishes (100 × 20 mm), and the embryo handling was performed using a binocular stereomicroscope at fivefold magnification. The embryos found were classified as unfeasible (degenerate, not fertilized), morula, early blastocyst, blastocyst, and expanded blastocyst, according to the

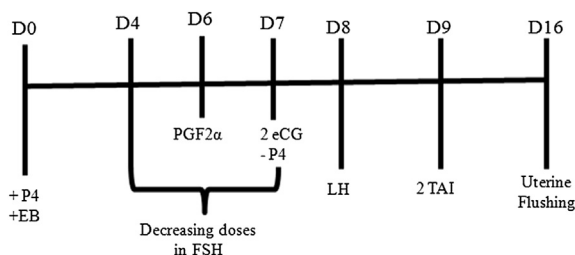


Fig. 1. Experimental design: superovulation protocol, TAI (twice on Day 9), and uterine flushing. EB, estradiol benzoate; P4, progesterone-P4 intra-vaginal device; PGF2 α , prostaglandin F2 α ; TAI, time-fixed artificial insemination.

specifications of the International Embryo Technology Society [26]. Qualities 1 to 3 of Morulae and blastocysts were considered to be viable. The embryos were randomized among groups to reduce the effect of the individual animal on the results. An aliquot of embryos was stored at 4 °C in 3% paraformaldehyde (Sigma–Aldrich) in water containing 2% sucrose (Sigma–Aldrich) for further analysis. The other part was cryopreserved by a slow freezing method. In brief, the embryos were exposed to the cryoprotectant solution (1.5 M ethylene glycol; Vigro) for 10 minutes. During this period, the embryos were loaded into 0.25-mL straws, with a central column containing the embryo and adjacent columns containing Holding (Vigro). The straws were placed in a freezing machine (Beltron Instruments, EFT-3002 embryo freezer) at a cooling rate of 2 °C/min until reaching –6 °C, when seeding was performed. Thereafter, the cooling rate was maintained at 0.6 °C/min until reaching –30 °C. The embryos were then stored in liquid nitrogen at –196 °C. The thawing was performed in a water bath (35 °C) and then the embryos were reclassified [15] and stored in groups of 15 embryos in 3% paraformaldehyde plus 2% sucrose at 4 °C for further analysis.

2.3. Immunofluorescence staining of H3K4me3

The evaluations of H3K4me3 status were performed at the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN, Dummerstorf, Germany); 15 embryos per group were used, including five for the negative control and 10 for investigation of H3K4me3.

After washing (100 mL PBS, 0.5 g bovine serum albumin, and 50 μ L Triton X-100) at room temperature (RT), the embryos were permeabilized (20 mM HEPES, 300 mM saccharose, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl $_2$, 0.5% Triton X-100, pH 7.4) at 0 °C for 15 minutes. After washing three times for 5 minutes each at RT (as mentioned earlier), the embryos were blocked (Roti ImmunoBlock 1:50 in H $_2$ O; Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 2 hours at RT. Subsequently, they were exposed to a polyclonal antibody against methylated H3K4 (Cell Signaling; 1:1000 in Roti ImmunoBlock 1:100 in PBS + 0.02% Tween 20) overnight at 4 °C. After washing five times for 10 minutes each at RT (as mentioned earlier), the embryos were incubated with the secondary antibody (anti-rabbit-Alexa647; Invitrogen A21245, 1:200 in Roti ImmunoBlock (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) 1:100 in PBS + 0.02% Tween 20) for 5 hours at RT. After washing five times for 10 minutes each at RT (as mentioned earlier), the nucleus was counterstained (SYBR Green; Thermo Fischer, Waltham, Massachusetts, USA; 1:500) and the embryos were incubated at 4 °C for 15 minutes. Finally, after washing four times for 10 minutes each at RT (as mentioned earlier), the embryos were individually mounted on coverslips.

2.4. Microscopic analysis of H3K4me3

For analysis of stained embryos, a confocal laser-scanning microscope (Pascal 5; Zeiss, Oberkochen, Germany) was used. Image stacks of individual embryos with a distance of 1 μ m between images in the z-direction were recovered in dual tracks (40-fold oil lens): track 1:

Table 1

Viability of embryos produced *in vivo* with conventional or sexed semen before and after cryopreservation.

Semen	Viable (viable/total)	Cryopreserved embryos	Viability after thawing (viable/total of thawed embryos) ^c
Conventional	72% ^a (72/100)	57	88.2% ^a (15/17)
Sexed	37.70% ^b (34/90)	19	78.9% ^a (15/19)

Different lowercase letters indicate significant differences within the column ($P < 0.05$).

^c The number of thawed embryos was sufficient to achieve 15 viable embryos after thawing for epigenetic analyses.

Laser: Argon 30 mW (458/488/514 nm) 488 nm/12%; HFT/NFT: 488/545 nm; filter: BP 505- to 530-nm channel 1 (channel 2 closed); track 2: Laser: HeNe 1 mW (543 nm) 543 nm/60%; HFT/NFT: 543/545 nm; filter: LP 560-nm channel 2 (channel 1 closed); pinhole: 1 AU, gain constant, averaging: 2; resolution: 1024 × 1024.

For localization and quantification of H3K4me3, the intensities of the fluorescence signals were analyzed by three-dimensional densitometry (ImageJ) evaluating at least 10 cells per embryo. Regions of interest (ROIs) were defined around the relevant nuclei in the stack. For background correction, an additional ROI was set outside the nuclei but inside the embryo. The measured intensities in these ROIs were subtracted from the intensities of the measurements in the ROIs around the nuclei. The fluorescence intensity depends on the location in the z-direction in the stack. Nevertheless, the intensity of nuclear staining (green channel, track 1) should be constant. Therefore, the incident intensity of nuclear staining (green channel) in the z-direction was used to calculate the fluorescence fading in the z-direction. The fading correction of the fluorophore (red channel) intensity in the z-direction was calculated using this result. The data were normalized to the controls (without the first antibody). For blastocysts, only cells from the inner cell mass (embryoblast, determined morphologically) were analyzed.

2.5. Statistical analyses

The experimental design was completely randomized and arranged in a factorial 2 × 2 structure (two treatments [semen and conservation] by two embryo development stages [morula and blastocyst]). First, the normality of the data was checked by the Shapiro–Wilks test. Then, ANOVA was performed, and when a significant difference was found, the post hoc Tukey test was carried out at a 5% probability (R Program).

Table 2

Stages of development of embryos obtained after uterine flushing 7 days after artificial insemination (Day 7), with sexed or conventional semen.

Semen	D7			
	Mo	Bi	Bl	Bx
Conventional	4.16% ^b (3/72)	13.88% ^b (10/72)	29.16% ^a (21/72)	52.77% ^a (38/72)
Sexed	21.21% ^a (7/33)	21.21% ^a (7/33)	24.24% ^a (8/33)	33.33% ^b (11/33)

Different superscript letters indicate significant differences within the column ($P < 0.05$).

Abbreviations: Bi, early blastocyst; Bl, blastocyst; Bx, expanded blastocyst; Mo, morula.

3. Results

After all procedures ($n = 4$), 190 embryos (7.8 ± 6.6 embryos per cow per session) were obtained, comprising 100 embryos from groups produced with conventional semen and 90 produced with sexed semen. Thus, the production of viable embryos with conventional semen was superior to that of embryos produced with sexed semen (72% [72 of 100] vs. 37.7% [33 of 90], respectively; $P < 0.05$; Table 1). Fifty-seven viable embryos from the conventional semen group and 19 from the sexed semen group were cryopreserved. There were a sufficient number of thawed embryos to achieve 15 viable embryos per group for further analyses. The viability rate of embryos (qualities 1–3) after thawing was 78.9% for embryos produced with sexed semen and was 88.2% for embryos produced with conventional semen ($P > 0.05$; Table 1).

Considering that flushing was always conducted on Day 7 in the morning, the procedures performed with sexed semen generated more ($P < 0.05$) embryos at the early stages of development (21.21% morulae and 21.21% early blastocysts) compared with those produced with conventional semen (4.16% morulae and 13.88% early blastocysts; Table 2).

H3K4me3 was detected in both morulae (Fig. 2) and blastocysts (Fig. 3). A higher H3K4me3 signal intensity was observed in morulae compared with blastocysts for all groups, and there was no influence of cryopreservation or the use of sexed semen on H3K4me3 levels ($P > 0.05$). In addition, there was no interaction between treatments ($P > 0.05$; Table 3).

4. Discussion

For many years, the superiority of conventional semen for a higher embryonic viability rate has been observed, regardless of the animal breed or category [27–29]. However, in spite of the smaller number of embryos produced using sexed semen, the production of the desired sex of calves makes this a feasible biotechnology [30,31]. In this study, the number and viability of embryos were reduced when sexed semen was used (Table 1), and in general, the recovered embryos were at later stages of development (blastocysts and expanded blastocysts; Table 2). It has been reported that embryos of *B taurus* cattle obtained after superovulation and AI with conventional semen are generally in the early stages of development such as morulae, compact morulae, and early blastocysts [32,33]. In contrast, in zebu, it was observed that 80% of the collected embryos were in advanced stages of development [34]. This difference may be related to some endocrine

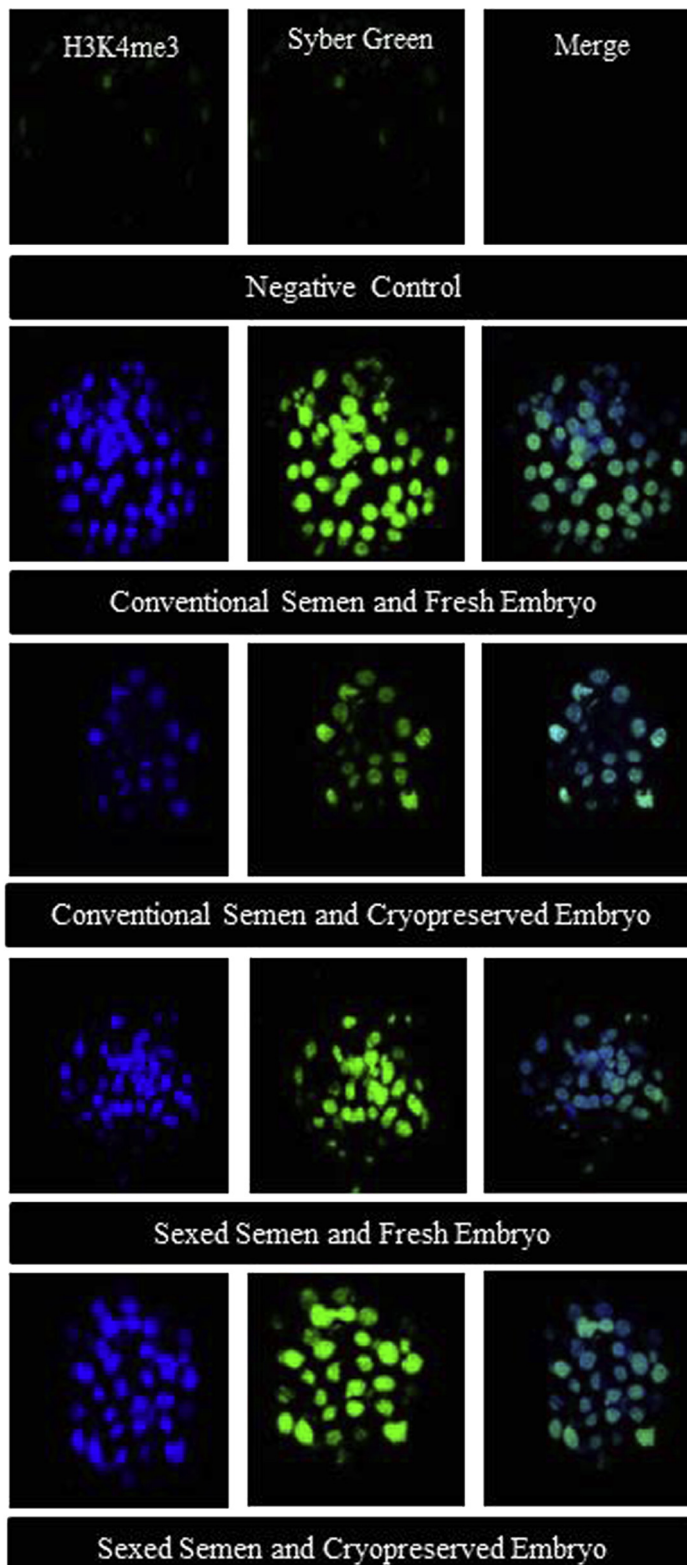


Fig. 2. Identification of H3K4me3 in morulae obtained after uterine flushing 7 days after artificial insemination with conventional or sexed semen. Immunofluorescence analysis by confocal microscopy. Blue: anti-H3K4me3 antibody, green: SYBR Green, merge: anti-H3K4me3 + SYBR Green. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

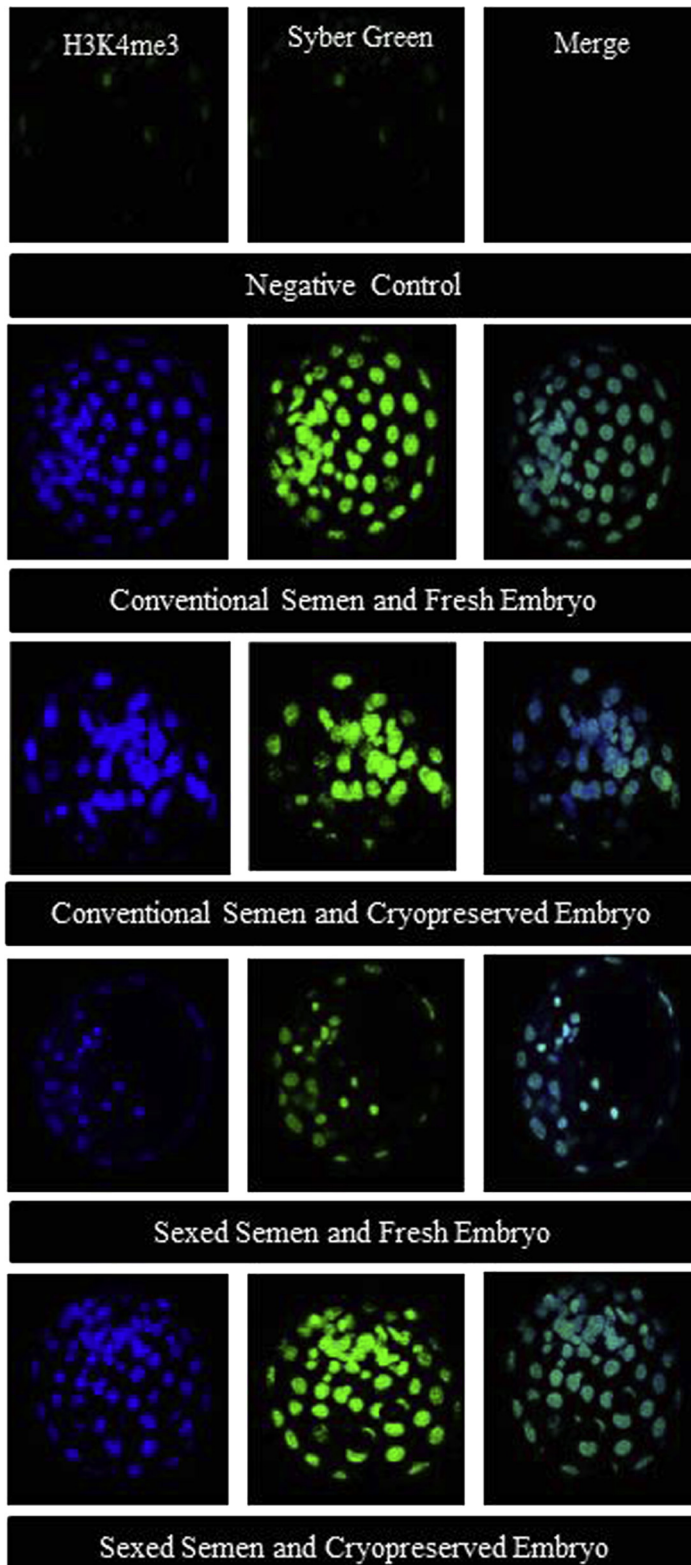


Fig. 3. Identification of H3K4me3 in blastocysts obtained after uterine flushing 7 days after artificial insemination with conventional or sexed semen. Immunofluorescence analysis by confocal microscopy. Blue: anti-H3K4me3 antibody, green: SYBR Green, merge: anti-H3K4me3 + SYBR Green. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 3

Mean \pm SD of the intensity of H3K4me3 signals in morulae and blastocysts (embryoblasts) produced *in vivo* using sexed and conventional semen before and after cryopreservation.

Semen	Signal intensity	P value
Sexed	178.51 \pm 32.89	0.4321
Conventional	191.10 \pm 25.26	
Conservation		
Fresh	180.67 \pm 25.95	0.6049
Cryopreserved	188.94 \pm 33.26	
Stage		
Morulae	209.26 \pm 10.95	0.0041 ^a
Blastocysts (embryoblasts)	160.35 \pm 10.52	
Interaction		
Semen \times conservation	—	0.7637
Semen \times stage	—	0.7285
Conservation \times stage	—	0.6370
Semen \times conservation \times stage	—	0.8522

^a Significant at 5% probability.

differences because zebu have a pre-ovulatory LH surge closer to ovulation [35] than taurine females [36]. Consequently, fertilization occurs earlier, allowing more time and favorable conditions for embryos to develop [35].

In this study, the number of morulae and early blastocysts was significantly higher when sexed semen was used (Table 2). Higher pregnancy rates have been demonstrated in crossbred cows when embryos were transferred at more advanced stages of development (blastocysts and expanded blastocysts) [37]. The different steps required for the sperm sexing technique with flow cytometry may generate some morphologic damage, including exposure to the laser, the pressure during the passage through the cytometer, the fall at high speed within the collection tube, and holding for a few hours at RT before processing [38,39]. We speculate that changes in sperm chromatin because of the sexing procedures could reduce the ability of embryos to reach advanced stages of development or cause their degeneration. This would explain the observed lower pregnancy rates when sexed semen is used and the higher rate of nonviable embryos found in the present study and reported previously [27,40].

Some modifications of histones are essential for establishment of oocyte competence and development [12], spermatogenesis, and embryogenesis [5]. During spermatogenesis in mammals, histones are replaced in part or completely by specific nucleoproteins of spermatozoa known as protamines, which have a structural character [41]. Furthermore, after fertilization, protamines and almost all paternal histones are degraded and replaced by histones of the oocyte [42]. The presence of H3 was described in both human spermatozoa and in the male pronucleus of the zygote [43]. This pattern suggests the possible importance of paternal histone in the embryo. However, the presence of histone modification marks, including H3K4me3, was found to be higher in poor functional quality sperm, suggesting that defects in the process of spermatogenesis may alter the correct epigenetic programming in mature sperm [19]. Nevertheless, it is unknown whether this feature has a specific function during early embryonic development [19], and information in this regard is particularly lacking for cattle. Considering

the small amount of histones identified in the spermatozoa of humans and mice [44,45], little influence of paternal histones in embryonic development is expected. However, this does not rule out the possibility that the small amount of histones present in the sperm might have a significant function.

The results of this study reported no different pattern of H3K4me3 among embryos produced with sexed and conventional semen (Table 3), suggesting that this epigenetic mark is not related to the stress experienced by the spermatozoa from the sexing procedure and its impact on embryonic development. However, it is possible that other epigenetic marks may be involved in the development of embryos produced with sexed semen.

Cryopreservation favors the storage of embryos for prolonged periods with little loss of the capacity of development, allowing for the genetic material of interest to be used as needed and at the most appropriate time for efficient embryo transfer.

The classic freezing method is used worldwide for the cryopreservation of embryos produced *in vivo*. This method has the advantage of using low concentrations of cryoprotectants; however, it also permits the formation of ice crystals to a greater or lesser extent, resulting in injury to the membranes and organelles [46]. Despite this potential for damage, the cryopreservation of embryos produced *in vivo* is a well-established strategy and can yield embryo survival, pregnancy, and birth rates similar to those achieved with fresh embryos [47,48]. However, basic research is important to determine the metabolic pathways, molecular mechanisms, and epigenetic events most affected by cryopreservation that could help to improve other reproduction biotechniques. In this study, a high signal of H3K4me3 was detected in morula and blastocysts obtained 7 days after AI. Our results reported no significant difference in the signal intensity of H3K4me3 from blastocysts and morulae, regardless of cryopreservation (Table 3, Figs. 1 and 2). It has been reported that there is no change in pattern of H3K4me3, H3K9ac, and H3K9me3 in mouse embryos, produced *in vitro* and *in vivo*, and cryopreserved or not [48]. These authors concluded that cryopreservation did not seem to have any additional effect on epigenetic changes (histone, H3K4me3) and that it could be considered as a process that exerts minimal damage to the embryos. The results of the present study corroborate these previous findings because the process of cryopreservation of the bovine embryos produced *in vivo* did not alter the pattern of H3K4me3.

In vitro bovine blastocysts subjected to slow freezing reported a reduction in the permissive mark of gene transcription, H3K4me3, and an increase in the repressive mark of gene transcription, H3K27me3, in comparison with fresh embryos [49]. However, in mouse, contradictory results were observed. After thawing and culturing to the blastocyst stage, there was an increase in the permissive mark H3K9ac and a decrease in the repressive mark, H3K9me2, associated with an increase in expression of H19 and MEST genes, important for embryo development, fetal growth, placental function, and postnatal behavior [48].

In this study, the signal intensity of H3K4me3 was higher in morulae than in the inner cell mass of blastocysts

(Table 3, Figs. 2 and 3). These results differ from those reported previously for mice, in which the H3K4me3 signal intensity was highest in zygotes at the pronuclear stage and two-cell embryos but significantly decreased at the eight-cell stage and gradually increased from the morula to blastocyst stages [50,51]. However, a higher signal intensity of H3K4me3 in the inner cell mass from thawed hatched blastocysts of mice in comparison with fresh hatched blastocysts was reported [47]. The differences between the present study and these mouse data may be because of species-specific differences, but further studies are required to elucidate the cause.

4.1. Conclusions

A high-intensity H3K4me3 signal was observed in bovine embryos produced *in vivo*, and this pattern did not vary depending on the use of sexed semen and the slow cryopreservation process.

The production of viable embryos with conventional semen was higher to that of embryos produced with sexed semen, which were mostly in early stages of development. This fact could be not explained by differences in H3K4me3.

Cryopreservation did not alter the pattern of H3K4me3, and in this sense, we suggest that it is a process that exerts minimal damage to the embryos.

Acknowledgments

This research was supported by CNPq (grant 564396/2010–9), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect, grant 23/200.141/2011) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (grant 88881.068117/2014–01). M.B. Souza Cáceres, W.A. Leite da Silva, J.S. de Oliveira Jr., E.R. Andrade, and C.J. Tavares Cardoso have scholarships funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] Dell'Aqua Jr JA, Papa FO, Araújo Jr JP, Freitas CP, Ponchirolli CB, Figueiredo AS, et al. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. *Acta Sci Vet* 2006;34(Suppl 1):205–12.
- [2] Baruselli PS, Ayres H, Souza AH, Martins CM, Gimenes LU, Torres Jr JRS, Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: BARUSELLI PS, SENEDA MM. *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2*, Londrina PR, Anais Vol. 1, 2006, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Sao Paulo SP, Brazil, 113–132.
- [3] Morton KM, Herrmann D, Sieg B, Struckmann C, Maxwell WM, Rath D, et al. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Mol Reprod Dev* 2007;74:931–40.
- [4] Underwood SL, Bathgate R, Ebsworth M, Maxwell WM, Evans G. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, refrozen-thawed dairy bull sperm. *Anim Reprod Sci* 2010;118:7–12.
- [5] Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007;24:425–32.
- [6] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089–93.
- [7] Ferreira AR, Franco MM. Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos. *Rev Brasileira Reprodução Anim* 2012;36:3–9.
- [8] Mellor J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet* 2006;22:320–9.
- [9] Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007;7:396–8.
- [10] Jasencakova Z, Soppe WJ, Meister A, Gernand D, Turner BM, Schubert I. Histone modifications in Arabidopsis—high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J* 2003;33:471–80.
- [11] Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* 2000;5:905–15.
- [12] Kageyama A, Takahashi Y, Ômura S. *Humihabitans oryzae gen. nov., sp. nov.* *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:2163–6.
- [13] Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J* 2009;50:455–63.
- [14] Murata K, Kouzarides T, Bannister AJ, Gurdon JB. Histone H3 lysine 4 methylation is associated with the transcriptional reprogramming efficiency of somatic nuclei by oocytes. *Epigenetics Chromatin* 2010;3:4.
- [15] Seneda MM, Silva KCF, Santos GMG, Max MC, Gomes RG, Lisboa LA, et al. Foliculogênese em bovinos. In: BARUSELLI PS, SENEDA MM. *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3*, Londrina, PR, Anais Vol.1, 2008, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Sao Paulo, Brasil, 6–14.
- [16] Wu FR, Liu Y, Shang MB, Yang XX, Ding B, Gao JG, et al. Differences in H3K4 trimethylation in *in vivo* and *in vitro* fertilization mouse preimplantation embryos. *Gen Mol Res* 2012;11:1099–108.
- [17] Huang JC, Lei ZL, Shi LH, Yang JW, Ouyang YC, Sun QY, et al. Comparison of histone modifications in *in vivo* and *in vitro* fertilization mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:77–83.
- [18] Andreu-Vieyra CV, Chen R, Agno JE, Glaser S, Anastassiadis K, Stewart AF, et al. MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing. *PLoS Biol* 2010;8:e1000453.
- [19] La Spina FA, Romanato M, Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Julianelli V, Rivera RM, et al. Heterogeneous distribution of histone methylation in mature human sperm. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:45–9.
- [20] Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2002;241:172–82.
- [21] Lepikhov K, Walter J. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. *BMC Dev Biol* 2004;4:12.
- [22] Gao Y, Hyttel P, Hall VJ. Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during early porcine embryonic development. *Mol Reprod Dev* 2010;77:540–9.
- [23] Zhang A, Xu B, Sun Y, Lu X, Gu R, Wu L, et al. Dynamic changes of histone H3 trimethylated at positions K4 and K27 in human oocytes and preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2012;98:1009–16.
- [24] Ross PJ, Ragina NP, Rodriguez RM, Lager AE, Siripattarapravat K, Lopez-Corrales N, et al. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction* 2008;136:777–85.
- [25] Jouneau A, Renard JP. Reprogramming in nuclear transfer. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:486–91.
- [26] International Embryo Technology Society (IETS). Embryo Transfer Newsletter. 1998. <http://www.iets.org.out/2014> [accessed xx.xx.xx].
- [27] Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, et al. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod* 2004;1:86–90.
- [28] Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 2009;71:68–73.
- [29] Sá Filho MF, Nichi M, Soares GG, Vieira LM, Melo LF, Ojeda A, et al. Sex-sorted sperm for artificial insemination and embryo transfer programs in cattle. *Anim Reprod* 2014;11:217–24.
- [30] Baruselli OS, Souza AH, Martins CM, Gimenes LU, Sales JNS, Ayres H, et al. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. *Revista Brasileira de Reprodução Anim* 2007;31:374–81.
- [31] Baruselli OS, Jacomini JO, Sales JNS. G.A. Crepaldi Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: BARUSELLI PS and SENEDA MM. *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3*, 2008, Londrina, PR, Anais... São Paulo, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 2008, v.1, p.146–167.
- [32] Callesen H, Lovendahl P, Bak A, Greve T. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J Anim Sci* 1995;73:1539–43.

- [33] Nagano AY, Weiss RR, Büchele JM, Muradas PR, Granemann LC. Bovine somatotropin–rbST—on female bovine superovulation. *Arch Vet Sci* 2004;9:101–6.
- [34] Fonseca JF, Silva Filho JM, Pinto Neto A, Palhares MS. Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. *Arq Bras Med Vet Zoo* 2001;53:671–6.
- [35] Henricks DM, Dickey JF, Niswender GD. Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle in early pregnancy in cows. *Biol Reprod* 1970;2:346–51.
- [36] Cavalieri J, Rubio I, Kinder JE, Entwistle KL. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 1997;47:801–14.
- [37] Scanavez AL, Campos CC, Santos RM. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. *Arq Bras Med Vet Zoo* 2013;65:722–8.
- [38] Peippo J, Vartia K, Kananen–Anttila K, Rätty M, Korhonen K, Hurme T, et al. Embryo production from superovulated Holstein–Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen–thawed sex–sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Anim Reprod Sci* 2009;111:80–92.
- [39] Chastant–Maillard S, Druat X. Sexagem de espermatozoide bovino. *Hora Vet* 2005;143:43–8.
- [40] Lu KH, Cran DG, Seidel Jr GE. In vitro fertilization with flow cytometrically–sorted bovine sperm. *Theriogenology* 1999;52:1393–405.
- [41] Bloch DP. A catalog of sperm histones. *Genetics* 1969;61:93–111.
- [42] Beletti ME. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. *Rev Brasil Reprod Anim* 2013;37:92–6.
- [43] van der Heijden GW, Ramos L, Baart EB, van den Berg IM, Derijck AA, van der Vlag J, et al. Sperm–derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* 2008;8:34.
- [44] Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction* 2011;141:21–36.
- [45] Carrel DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril* 2012;97:267–74.
- [46] Dode MAN, Leme LO, Sprícigo JFW. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Rev Brasil Reprod Anim* 2013;37:145–50.
- [47] Dalcin L, Lucci CM. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Rev Brasil Reprod Anim* 2010;34:14959.
- [48] Jahangir M, Shahhoseini M, Movaghar B. H19 and MEST gene expression and histone modification in blastocysts cultured from vitrified and fresh two–cell mouse embryos. *Reprod Biomed Online* 2014;29:559–66.
- [49] Maldonado MBC, Penteadó JCT, Faccio BMC, Lopes FL, Arnold DR. Changes in tri–methylation profile of lysines 4 and 27 of histone H3 in bovine blastocysts after cryopreservation. *Cryobiology* 2015;71:481–5.
- [50] Bakhtari A, Rahmani HR, Bonakdar E, Jafarpour F, Asgari V, Hosseini SM, et al. The interfering effects of superovulation and vitrification upon some important epigenetic biomarkers in mouse blastocyst. *Cryobiology* 2014;69:419–27.
- [51] Hasler JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003;79:245–64.



Metilação de histonas em oócitos e embriões mamíferos

Methylation of histones in mammalian oocytes and embryos

Mirela Brochado Souza-Cáceres¹, Fabiana de Andrade Melo-Sterza^{2,3,4}

¹Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

²Pós-Graduação em Zootecnia - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil.

³Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil.

⁴Correspondência: fabiana.sterza@uem.br

Resumo

A epigenética consiste no estudo de mudanças na função gênica que não dependem de mudanças na estrutura primária do DNA e que podem ser hereditárias. As mudanças epigenéticas desempenham um importante papel no processo de diferenciação celular, permitindo que as células mantenham características estáveis diferentes, apesar de conterem o mesmo material genético. As histonas possuem uma importante função na estrutura do DNA, e alterações bioquímicas em sua cauda aminoterminal, alteram a estrutura da cromatina e suas funções. Dessa forma são fundamentais para o controle da expressão gênica, ativação do genoma embrionário, metilação do DNA e inativação do cromossomo X. O desenvolvimento oocitário e embrionário envolvem uma série de modificações epigenéticas importantes, incluindo as modificações pós-traducionais das histonas, que são imprescindíveis para o desenvolvimento normal do embrião. O melhor entendimento a respeito do epigenoma e sua influência sobre a oogênese e embriogênese podem permitir a otimização das biotecnologias da reprodução.

Palavras-chave: epigenética, gametas, embriogênese, modificações pós-traducionais.

Abstract

Epigenetic is the study of changes in genetic function which do not depend on change in the primary structure of DNA, and can be heritable. Epigenetic changes play an important role in cellular differentiation process, allowing the cells to keep different stable characteristics, though they contain the same genomic material. Histones are not only structural proteins, but are also critical to the control of gene expression, embryonic genome activation, DNA methylation and inactivation of the X chromosome. The histones have an important function in the structure of the DNA, consequently histone methylation can alter its structure and its functions. The oocyte and embryo development involve several important epigenetic modifications, including post-translation modifications of histones, which are essential for normal development of the embryo. The best understanding of the epigenome and its influence on oogenesis and embryogenesis may allow the optimization of reproduction biotechnologies.

Keywords: epigenetics, gametes, embryogenesis, post-translation modifications.

Introdução

O nucleossomo é a unidade fundamental da cromatina, o qual é composto de 147 pares de base de DNA super-helicoidal, enrolado em 1,75 voltas em torno de um octâmero composto por duas moléculas de quatro diferentes proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) (Kronberg et al., 1999; Mellor, 2006).

Há diferentes mecanismos que podem modular a cromatina e consequentemente a função gênica, tais como: metilação do DNA, modificações covalentes nas histonas e fatores remodeladores da cromatina.

A metilação do DNA consiste na adição de um radical metil à base citosina na fita de DNA, fato que geralmente promove a repressão da transcrição (Bird, 2007).

A regulação da transcrição também pode ser realizada por meio de modificações nas regiões amino terminais das histonas, tais como metilação, fosforilação, acetilação e ubiquitinação (Mellor, 2006; Strahl e Allis, 2000). Essas modificações pós-traducionais das histonas, que estão relacionadas a alterações na conformação da cromatina, formam uma verdadeira linguagem molecular, conhecida como “Código das Histonas” (Ferreira e Franco, 2012).

A metilação do DNA é a mais bem estabelecida marca epigenética envolvida na determinação da expressão alelo-específica dos genes *imprinted* (Weaver et al, 2004) e sua relação com a reprodução foi revisada por Ferreira e Franco (2012).

As proteínas histonas desempenham papéis importantes na estrutura da cromatina (Huang et al., 2007). As metilações dessas proteínas são consideradas marcas epigenéticas, as quais são caracterizadas pela ligação de um, dois ou três radicais metil à cauda amino terminal da histona. Essas marcas podem ter significado biológico

diferente (Bottomley, 2004), e estão associadas a uma maior compactação dos nucleossomos, a heterocromatina, ou a sua menor compactação, eucromatina. Quando as alterações pós-traducionais das histonas favorecem a uma maior compactação da cromatina, deixam inacessíveis os sítios de ligação dos fatores de transcrição. Dessa forma, os genes são geralmente silenciados na heterocromatina e ativos na eucromatina (Mellor, 2006; Mistelli, 2007).

Considerando o impacto que as modificações epigenéticas podem exercer sobre a gametogênese e a embriogênese, o melhor entendimento dessa ciência pode nos auxiliar na busca da melhor eficiência das biotecnologias da reprodução de mamíferos.

O objetivo dessa revisão é descrever o perfil da metilação de histonas em oócitos e embriões de mamíferos.

Metilação de histonas

A metilação covalente das histonas ocorre nos resíduos de arginina e lisina. Resíduos de lisina podem estar mono-, di- ou trimetilados, enquanto os de arginina podem estar monometilados (Bottomley, 2004). As duas modificações da H3 mais associadas com metilação do DNA são a metilação da lisina 4 e a da lisina 9 (H3K4me e H3K9me). Estes dois sítios de modificações da histona parecem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento e na diferenciação celular em mamíferos. Especificamente, a metilação do DNA está associada com a ausência de metilação da H3K4 e a presença de metilação na H3K9 (Eissenberg et al., 2010).

Em geral, a metilação de H3K9, H3K27 e H4K20, são associadas a condensação da cromatina e repressão da transcrição, enquanto a metilação de H3K4, H3K36 e H3K79, são correlacionadas com a descondensação e o estímulo da transcrição (Ciccone e Chen, 2009). As regiões da cromatina ativamente transcritas são ricas em H3K4 mono-, di- ou trimetilada e em H3K36 trimetilada, sendo a distribuição destas marcas ao longo das regiões dos genes transcritos, desigual, com a extremidade 5' destes, enriquecida em H3K4 trimetilada, enquanto a extremidade 3' é rica em H3K36 metilada (Jeppesen e Tuner, 1993).

As modificações covalentes nas histonas são mediadas por enzimas e consistem na adição ou remoção de grupos químicos (Waggoner, 2007; Weidman et al., 2007) capazes de interferir na coesão do DNA com as histonas, basicamente por modificações de cargas elétricas (Seneda e Bordignon, 2007).

Histonas acetiltransferases (HATs) e histonas metiltransferases (HMTs) adicionam grupos acetil e metil, respectivamente. Já as histonas desacetilases (HDACs) e as histonas desmetilases (HDMs) atuam removendo esses grupos (Shi, 2007; Haberland et al., 2009). Apesar de não ser foco dessa revisão, é importante enfatizar que acetilação de histonas é uma marca epigenética associada a permissão da transcrição, e portanto participa ativamente na regulação da transcrição gênica (Costa e Pacheco, 2013).

Existem fortes evidências de que as modificações de histonas são herdadas durante as divisões celulares, porém essa transmissão é muito mais complexa que a vista para a metilação do DNA, principalmente devido à replicação independente das moléculas de histonas. Já foi demonstrado que grupos proteicos importantes para a transmissão de estados de cromatina silenciada (grupo Polycomb) ou ativa (grupo Trithorax), durante o desenvolvimento embrionário, podem estar relacionados com a manutenção das modificações em H3K27 e H3K4. Porém pouco se sabe sobre os mecanismos de herança das modificações de histonas (Schuettengruber et al., 2009; Kim et al., 2009).

A literatura sugere três modelos da interdependência entre a metilação das histonas e a metilação do DNA. O primeiro modelo relata que as DNMTs ao metilarem o DNA, recrutam proteínas ligantes à metil-CpG, e logo as histonas são desacetiladas por enzimas histonas desacetilases (HDAC), e podem ser metiladas por histonas metiltransferases (HMT). O segundo modelo sugere que a metilação das histonas (metilação na lisina 9 da histona H3) ligadas a proteínas de heterocromatina podem recrutar DNMTs e metilar o DNA (Jackson et al., 2002; Bannister e Kouzarides, 2011). O terceiro modelo sugere que as proteínas remodeladoras de cromatina dependentes de ATP e da atividade de DNA helicase aumentem o acesso da estrutura do nucleossomo e facilitem a metilação do DNA e as modificações das histonas por ação das DNMTs, HDACs e HMTs (Li, 2002; Allis et al., 2007).

Metilação das histonas em oócitos de mamíferos

Durante a oogênese os oócitos aumentam significativamente de volume, passando de aproximadamente 20 µm de diâmetro no folículo primordial para 120 µm no folículo pré-ovulatório (Salha et al., 1998), esse crescimento está associado a um intenso acúmulo de macromoléculas, como RNAs e proteínas, essenciais para que o oócito possa adquirir competência (Crozet, 1989, Fair et al., 2007) e para estabelecer uma reserva de componentes maternos necessários para o desenvolvimento embrionário precoce (Andreu-Vieyra et al, 2010). Nesse sentido, a transcrição gênica específica para a demanda de cada etapa de desenvolvimento do oócito é essencial.

Desde o nascimento até o momento em que o oócito de uma fêmea púbere é submetido ao pico pré-

ovulatório de LH, este permanece estacionado em diplóteno da profase I (VG) e é caracterizado por apresentar cromatina de aspecto difuso e um padrão relativamente constante de expressão gênica (Brown, 1999). Como apenas 0,01% dos oócitos chegam a ovulação durante a vida útil de mamíferos e portanto sofrem a maturação final após o pico de LH, a grande maioria dos oócitos da fêmea permanecem a vida toda nesse estágio de desenvolvimento meiótico (Griffiths, 1998).

Fair et al. (2007) relataram que genes de efeito materno são de extrema importância para a precisa coordenação de processos que ocorrem durante as primeiras divisões celulares do embrião. Como exemplo cita-se o gene *MATER*, cujo nocaute em camundongos inviabilizou o desenvolvimento embrionário a partir de 2 células, período de ativação do genoma embrionário nessa espécie mamífera (Tong et al., 2000). Corroborando com esse fato, a metilação da H3K4 e a acetilação global de histonas, relacionadas a permissão da transcrição, são encontradas em grande quantidade nas fases iniciais da oogênese bovina (Fig. 1). Confirmando a sugestão de Schultz (2002) de que as modificações epigenéticas estão associadas com a aquisição de competência para o desenvolvimento do oócito.

O desenvolvimento do oócito VG até a metáfase II (MII), período denominado maturação oocitária final, é caracterizado pela capacidade de reinício da divisão meiótica, de garantir a fecundação monoespérmica, de descondensar a cabeça do espermatozóide, de transpor a transição materno-zigótica (MZT) e prosseguir o seu desenvolvimento (Coticchio et al., 2004). No período pré-ovulatório, a transcrição dos oócitos MII praticamente cessa (Wrenzycki et al., 2007), fenômeno acompanhado por alteração das MPT's (De La Fuente et al., 2004; Bouniol-Baly et al., 1999), como a metilação da H3K9 (Chen et al., 2016) e uma queda considerável no grau de metilação da H3K4 e acetilação de histonas (Fig. 1).

As alterações citadas acima são acompanhadas por alteração da configuração da cromatina ao longo da oogênese. Já foi descrito que quando o complexo de DNA está altamente condensado e concentrado ao redor do nucléolo (configuração SN), há geralmente o silenciamento da transcrição. Ao passo que quando a cromatina está menos condensada e distante do nucléolo (configuração NSN), a transcrição é ativada. Inicialmente, todos os oócitos têm a configuração de tipo NSN (Mattson e Albertini 1990; Debey et al., 1993) e a alteração da configuração altera de acordo com o crescimento dos oócitos (Wickramasinghe et al., 1991; Debey et al., 1993; Zuccotti et al., 1995).

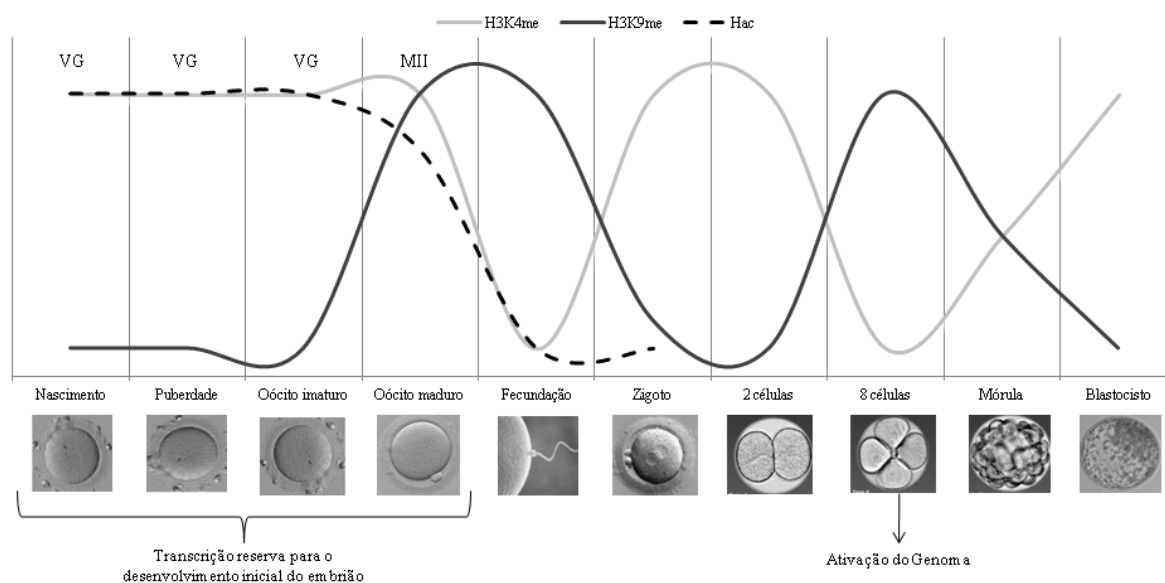


Figura 1. Representação esquemática da metilação global da H3K4 e H3K9, e acetilação global de histonas em oócitos e embriões bovinos de diferentes fases de desenvolvimento (Adaptado de Chen et al., 2016; Gaspar et al., 2015; Heras et al., 2016; Kang et al., 2002; Lepikhov et al., 2008; Maalouf et al., 2008; Maldonado et al., 2015; Racedo et al., 2009; Ross et al., 2008).

No período de maturação oocitária os mRNA maternos e as proteínas são direcionados para os processos que culminarão com a finalização da maturação, fertilização e clivagens iniciais até a ativação do genoma embrionário (Wrenzycki et al., 2007). Acredita-se que a queda acentuada da transcrição em oócitos de MII até o momento da fecundação (Fig. 1) seja necessária para que a meiose seja reiniciada e finalizada após a fecundação. O silenciamento da transcrição ocorre paralelamente a condensação da cromatina em larga escala e o seu rearranjo ao redor do nucléolo (De La Fuente et al., 2004; Bouniol-Baly et al., 1999). Em bovinos foi observado um processo de remodelamento gradual da cromatina em oócitos VG. Análise do transcriptoma permitiu identificar uma modulação dinâmica do conteúdo de mRNA, de modo que à medida que aumentava a

compactação da cromatina, ocorria redução do número de transcritos. Muitos transcritos acumulados nesse período codificaram histonas. Acredita-se que presença constante de SBPL2 no período de menor transcrição (maior compactação da cromatina), é necessária para proteção dos mRNAs de histonas de passarem por translação precoce ou degradação, permitindo assim sua utilização quando necessário durante as primeiras divisões embrionárias (Labrecque et al., 2015).

Murata et al. (2010) injetaram núcleo de células somáticas em oócitos em fase de VG com o objetivo de avaliar a reprogramação nuclear. Algumas modificações, como o aumento da fosforilação e a redução da acetilação de histonas, demonstraram estar relacionadas com características de ativação geral da transcrição de oócitos em VG.

Está claro que a mudança na estrutura da cromatina desempenha um papel essencial na alteração da expressão gênica durante o crescimento do oócito e parece estar envolvida na remodelação do genoma global, no entanto o controle das modificações epigenéticas nessa fase ainda precisa ser melhor elucidado (Kageyama et al., 2007).

Metilação das histonas em embriões de mamíferos

Durante todo o desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos produzidos *in vivo* observa-se expressão gênica (Jiang et al., 2014), o que indica que em nenhum momento ocorre um silenciamento global da transcrição, como acreditava-se anteriormente (Kageyama et al., 2007). Foi demonstrado, no entanto, que alguns momentos do desenvolvimento embrionário se destacam pelo número de genes transcritos identificados por RNA-Seq, momentos caracterizados em 4 ondas de mudanças transcricionais, assim caracterizadas: até a fase de duas células, os genes expressos (166 down-regulated + 158 up-regulated) foram correlacionados com a degradação do RNA materno; entre 4 e 8 células, o grande número de genes expressos (1086 down-regulated + 945 up-regulated) foi correlacionado com a ativação do genoma do zigoto (AGZ); entre 16 células e mórula inicial, os genes expressos (325 down-regulated + 88 up-regulated) foram correlacionados com o fenômeno de compactação dos blastômeros e entre mórula compacta e blastocisto, os genes expressos (354 down-regulated + 475 up-regulated) foram correlacionados com a blastulação, ou seja, a diferenciação dos blastômeros em embrioblasto e trofoblasto (Jiang et al., 2014). A forma dinâmica em que os genes são expressos durante o desenvolvimento embrionário, é controlada por modificações epigenéticas importantes, porém ainda pouco conhecidas. Sabe-se no entanto, que o remodelamento das histonas é imprescindível para o desenvolvimento normal do embrião.

O genoma materno e paterno de zigotos de camundongo exibe distribuições assimétricas das formas di e tri-metiladas de H3K9, H3K4, H3K27 e H3K20 (Andreu-Vieyra et al, 2010). Alguns autores sugerem que antes da ativação do genoma não existe transcrição, sendo a mesma bloqueada pelas metilações na histona 3 em diferentes lisinas (K9, K27, K20) (Eissenberg et al., 2010). Por outro lado, a presença de metilações na H3K4 já indicava a possibilidade de transcrição basal nessa fase (Andreu-Vieyra et al, 2010).

Já foi demonstrada uma íntima associação da metilação do DNA e a metilação da H3K9 em embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIVE), marcas essas relacionadas ao potencial de desenvolvimento do embrião clone (Santos et al., 2003). Em embriões PIVE a H3K9me reduziu entre os estádios embrionários de 2 e 4 células e uma metilação de novo foi observada no estágio de 8 células (Fig. 1). No estágio de blastocisto foi identificada maior metilação de H3K9 e DNA nas células da massa celular interna e menor metilação das mesmas no trofoblasto (Santos et al., 2003).

Uma queda acentuada da metilação da H3K4 no estágio de 8 células combinado com a subida nos próximos estágios de desenvolvimento (Fig. 1), pode estar relacionada com a ativação do genoma do zigoto (AGZ), que ocorre precocemente nos mamíferos (Schultz, 2002). Existem relatos de que AGZ ocorra entre o desenvolvimento embrionário de 1 a 2 células em camundongos (Schultz, 2002) e entre 4 a 8 em humanos (Niakan e Eggan, 2013). Em bovinos, por muito tempo foi aceita a afirmação de que AGZ ocorreria entre 8 a 16 células (Memili e First, 2000; Maalouf et al., 2008). No entanto, estudos mais recentes demonstraram que AGZ ocorre entre 4 a 8 células em embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (Jiang et al, 2014; Graf et al, 2014).

A finalização da AGZ é essencial para que cada blastômero assumira sua característica de totipotência, perfil indispensável para continuação do desenvolvimento do embrião, em especial da organogênese (Bultman et al., 2006). A partir de oito células foi observado um aumento linear no sinal da metilação da H3K4 e queda linear da metilação da H3K9, sendo este fato correlacionado com a ativação principal do genoma embrionário e aumento da atividade transcricional do embrião bovino (Fig.1).

A tri-metilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3) ocorre em grande quantidade em zigotos no estágio pró-nuclear e em embriões de 2 células, mas diminui significativamente no estágio de 8 células, voltando a aumentar gradativamente nos estádios de mórula e blastocisto em camundongos (Wu et al., 2012). A dimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me2), uma modificação associada a repressão da transcrição, é baixa em zigotos no estágio pró-nuclear e em embriões de 2 células, e começa a aumentar no estágio de 8-16 células em bovinos (Fig. 1; Santos et al., 2003).

Em embriões de oito células de camundongos, ocorre a hipometilação de H3K4 e a hipoacetilação de H3K9, enquanto a metilação da histona H3K27 e a associação da macro-histona H2A aparecem posteriormente, entre os estádios de 16 células e mórula inicial (Okamoto et al., 2004). A metilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9) ocorre mais tarde, entre o estágio de 32 células e a fase de blastocisto (Okamoto et al., 2004).

Segundo Ciccone e Chen (2009), os genes *imprinted* integram o mecanismo de regulação da expressão gênica que permite apenas a expressão de um dos alelos parentais. Embora esses genes representem um pequeno conjunto no genoma mamífero, eles são essenciais para o desenvolvimento normal do indivíduo, pois estão envolvidos no desenvolvimento e no crescimento fetal (Delaval e Feil, 2004; Bressan et al., 2009).

No gene IGF2 o alelo expresso é o paterno, o qual codifica um fator de crescimento semelhante à insulina (Insulin Like Growth Factor II), um dos principais reguladores do crescimento fetal e pós-natal (Delaval e Feil, 2004). Outro exemplo é o gene H19, no qual apenas o alelo materno é ativo, por isso desmetilado (Sasaki et al., 2000). O H19, que produz um RNA não codificante, é fortemente expresso em tecidos embrionários e extraembrionários durante o desenvolvimento, e sua transcrição é expressamente diminuída após o nascimento (Ideraabdullah et al., 2008).

Atualmente, cerca de 200 genes são conhecidamente *imprinted* no genoma dos mamíferos. É possível dizer que aproximadamente 100 genes são *imprinted* em humanos, 120 em camundongos e 20 em bovinos. No entanto, ainda o número exato de genes *imprinted* está sendo discutido ([www.geneimprint.org](http://igc.otago.ac.nz); <http://igc.otago.ac.nz>) (Martucci et al., 2015).

Os mecanismos regulatórios que promovem o *imprinting* são complexos e tem sido objetos de muitas investigações. A maioria, se não todos, os genes *imprinted* estão associados com uma ou mais regiões diferentemente metiladas nas histonas em alelos maternos ou paternos. Em embriões em fase de pró-núcleo, o genoma materno e o paterno sofrem uma onda de desmetilações, o que apaga a maioria das marcas de metilação herdadas dos pais (Kageyama et al., 2007). Essas informações demonstram a importante relação da metilação de histonas com processos de estabelecimento e manutenção do *imprinting* genômico.

Estudos têm demonstrado que modificações de histonas são afetadas pela manipulação dos embriões e pelo cultivo *in vitro* (Santos et al., 2003). Os referidos autores demonstraram que embriões bovinos produzidos por transferência nuclear de célula somática (TNCS) apresentam hipermetilação de H3K9. Outro estudo relatou que a acetilação da lisina 5 na histona H4 (H4K5ac) parece ser alterada dramaticamente durante o desenvolvimento inicial de embriões produzidos *in vitro*, mas permanece constantemente elevada em embriões bovinos produzidos por TNCS (Kang et al., 2002). Estas alterações poderiam contribuir para a explicação a respeito da expressão alterada de genes vitais ao desenvolvimento. Células bovinas cultivadas também apresentam padrão epigenético alterado, como a elevação da metilação de histonas (H3K9me2) e da acetilação de H3K9 no trofotoderma (Enright et al., 2003; Santos et al., 2003).

A trimetilação de H3K4 está associada com situações críticas, tais como a diferenciação e ativação do genoma embrionário e isto foi demonstrado em suínos (Gao et al., 2010), humanos (Zhang et al., 2012) e bovinos (Ross et al., 2008).

Foram observadas diferenças nos padrões globais de H3K27 durante o desenvolvimento do embrião. A acetilação da H3K27 foi identificada na fase de VG e MII em oócitos, assim como em embriões nos estágios de 2 e 4 células. Houve marcada redução desta marca no estágio de 8 células, voltando a ser observada em blastocistos de suínos produzidos *in vitro*. H3K27 mono-, di- e trimetilada foram identificadas nas fases de VG, MII e em um dos pró-núcleos (PN), porém não foram identificadas em embriões em estágios de 2, 4 e 8 células, voltando a ser observada em blastocistos de suínos produzidos *in vitro* (Marinho et al., 2015a).

Marinho et al. (2015b) utilizaram um inibidor da trimetilação da H3K27 (DZNep - degrada a proteína PRC2), durante a cultivo de embriões bovinos *in vitro* por 3 a 8 dias. Os autores observaram diminuição da taxa de blastocistos, do número de células e atraso do desenvolvimento embrionário. Tais resultados demonstram a importância de PRC2 e H3K27me3 no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos.

Lepikhov et al. (2008) observaram grande desmetilação do DNA em pró-núcleo paterno durante a maturação pronuclear de coelhos. Os mesmos autores, observaram que a dinâmica das modificações da cromatina são conservadas em zigotos de camundongos, bovinos e coelhos.

Souza-Cáceres et al. (2016), observaram alta intensidade de H3K4me3 em embriões bovinos produzidos *in vivo*, sendo esta maior em mórula do que em blastocisto. Acredita-se que essa marca epigenética esteja relacionada com o fenômeno de compactação dos blastômeros e preparação para a diferenciação celular. Esse resultado corrobora com a maior expressão gênica observada em mórulas em relação a blastocistos bovinos produzidos *in vivo* (Jiang et al., 2014).

Já foi demonstrado que o padrão da H3K4me3 não varia em função da utilização de sêmen sexado e o processo de criopreservação lenta tradicional, demonstrando que os embriões que sobreviveram ao estresse dessas técnicas mantiveram o padrão de metilação esperado (Souza-Cáceres et al., 2016). Por outro lado, Maldonado et al. (2015) observaram que blastocistos bovinos produzidos *in vitro* e submetidos a congelamento lento apresentam uma redução nos níveis de H3K4me3 e um aumento nos níveis de H3K27me3 quando comparados aos embriões frescos. A diferença do estado de metilação da H3K4 entre embriões bovinos



produzidos *in vivo* (Souza-Cáceres et al., 2016) e *in vitro* submetidos a criopreservação (Maldonado et al., 2015), nos permite especular que o cultivo de embriões *in vitro* altere a conformação da cromatina, mediada por alteração das histonas e isso pode estar relacionado com as diferenças entre a criotolerância desses embriões. No entanto, essa hipótese ainda precisa ser estudada.

Considerações Finais

Eventos importantes da oogênese e do desenvolvimento embrionário pré-implantacional são mediados pela metilação de histonas. Essa importância é revelada pelo comportamento dinâmico da transcrição gênica nas diferentes etapas de desenvolvimento oocitário e embrionário, as quais exigem uma modulação também dinâmica da cromatina. Novos estudos são necessários para esclarecer melhor como as modificações nas caudas terminais das histonas, podem afetar o desenvolvimento embrionário, e também sobre a possibilidade de manipular tais variações, de forma a melhorar a eficiência das biotecnologias da reprodução de mamíferos.

Agradecimentos

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/MS) pela Bolsa concedida.

Referências

- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros MLE. Epigenetics. New York: Cold Spring Harbor, 2007. 502p.
- Andreu-Vieyra CV, Chen R., Agno JE, Glaser S, Anastassiadis K, Stewart AF, Matzuk MM. MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing. Plos Biol, DOI: 10.1371/journal.pbio.1000453, 2010.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res, v.21, n.3, p.381-395, 2011.
- Bird A. Perceptions of epigenetics. Nature, v.7, p.396-398, 2007.
- Bottomley MJ. Structures of protein domains that create or recognize histones modifications. EMBO Rep, v.5, p.464-469, 2004.
- Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szöllösi MS, Debey P. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. Biol Reprod, v.60, p.580-587, 1999.
- Bressan FF, De Bem THC, Perecin F, Lopes FL, Ambrosio CE, Meirelles FV, Miglino MA. Unearthing the roles of imprinted genes in the placenta. Placenta, v.30, p.823-834, 2009.
- Brown TA. Genética: um enfoque molecular. 3 ed. Rio de Janeiro: G. Koogan, 1999. 336 p.
- Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. Genes Dev, v.20, p.1744-1754, 2006.
- Chen H, Zhang L, Deng T, Zou P, Wang Y, Quan F, Zhang Y. Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. Theriogenology, v.86, p.868-878, 2016.
- Ciccone DN, Chen T. Histone lysine methylation in genomic imprinting. Epigenetics, v.4, p.216-220, 2009.
- Costa EBO, Pacheco C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v.34, n.2, p.125-136, 2013.
- Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality. Ann N Y Acad Sci, v.1034, p.132-44, 2004.
- Crozet N. Nuclear structure and RNA synthesis in mammalian oocytes. Reprod Fertil Suppl, v.38, p.9-16, 1989.
- De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM, Eppig JJ. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. Dev Biol, v.275, p.447-458, 2004.
- Debey P, Szöllösi MS, Szöllösi D, Vautier D, Grousse A, Besombes D. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. Mol Reprod Dev, v.36, p.59-74, 1993.
- Delaval K, Feil R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. Curr Opin Genet Dev, v.14, p.188-195, 2004.
- Eissenberg JC, Shilatfard A. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. Dev Biol, v.339, p.240-249, 2010.
- Enright BP, Jeong BS, Yang X, Tian XC. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: Levels of histone acetylation. Biol Reprod, v.69, n.5, p.1525-30, 2003.
- Fair T, Carter F, Park S, Evans ACO, Lonergan P. Global genes expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. Theriogenology, v.68, p.91-97, 2007.



- Ferreira AR, Franco MM.** Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.36, n.1, p.3-9, 2012.
- Gao Y, Hyttel P, Hall VJ.** Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during early porcine embryonic development. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.540-549, 2010.
- Gaspar RC, Arnold DR, Corrêa CAP, Rocha Jr CV, Penteado JCT, Collado M, Vantini R, Garcia JM, Lopes FL.** Oxygen tension affects histone remodeling of in vitro-produced embryos in a bovine model. *Theriogenology*, v.83, p.1408-1415, 2015.
- Graf A, Krebs S, Zakhartchenko V, Schwalb B, Blum H, Wolf E.** Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *PNAS*, v.111, n.11, p.4139-4144, 2014.
- Griffiths AJF.** Introdução à genética. 6. ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 856p.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN.** The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*, v.10, p.32-42, 2009.
- Heras S, Vandenberghe L, Soom AV.** Determination of the parental pronuclear origin in bovine zygotes: H3K9me3 versus H3K27me2-3. *Anal Biochem*, v.510, p.76-78, 2016.
- Huang JC, Lei ZL, Shi LH, Miao YL, Yang JW, Ouyang YC, Sun QY, Chen DY.** Comparison of histone modifications in in vivo and in vitro fertilization mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, v.354, p.77-83, 2007.
- Ideraabdullah FY, Vigneau S, Bartolomei MS.** Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat Res*, v.647, p.77-85, 2008.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE.** Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, v.416, p.556-560, 2002.
- Jeppesen P, Turner B.** The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, v.74, p.281-289, 1993.
- Jiang Z, Sun J, Dong H, Luo O, Zheng X, Oberfell C, Tang Y, Bi J, O'neil R, Ruan Y, Chen J, Tian X.** Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. *BMC Genomics*, v.15, p.756, 2014.
- Kageyama S, Liu H, Kaneko N, Ooga M, Nagata M, Aoki F.** Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction*, v.133, p.85-94, 2007.
- Kang YK, Park JS, Koo DB, Choi YH, Kim SU, Lee KK, Han YM.** Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J*, v.21, n.5, p.1092-100, 2002.
- Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S.** Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci*, v.66, n.4, p.596-612, 2009.
- Kronenberg MF, Menzel HJ, Ebersbach G, Wenning GK, Luginer E, Gollner M, Ransmayr G, Utermann G, Poewe W, Kronenberg F.** Dopamine D4 receptor polymorphism and idiopathic Parkinson's disease. *Nature*, v. 7, p.397-400. 1999.
- Labrecque R, Lodde V, Dieci C, Tessaro I, Luciano AM, Sirard MA.** Chromatin Remodelling and Histone mRNA Accumulation in Bovine Germinal Vesicle Oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.82, p.450-462, 2015.
- Lepikhov K, Zakhartchenko V, Hao R, Yang F, Wrenzycki C, Niemann H, Wolf E, Walter J.** Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. *Epigenetics Chromatin*, p.1-8, 2008.
- Li E.** Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, v.3, p.662-673, 2002.
- Maalouf WE, Alberio R, Campbell KH.** Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics*, v.3, p.199-209, 2008.
- Maldonado MBC, Penteado JCT, Faccio BMC, Lopes FL, Arnold DR.** Changes in tri-methylation profile of lysines 4 and 27 of histone H3 in bovine blastocysts after cryopreservation. *Cryobiology*, v.71, p.481-485, 2015.
- Marinho LSR, Rissi VB, Seneda MM, Bordignon V.** Acetylation and methylation profiles of H3K27 during IVP porcine embryo development. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Programa de Ciência Animal, Londrina, PR, 147p, 2015a.
- Marinho LSR, Rissi VB, Seneda MM, Bordignon V.** Pharmacological disruption of H3K27 trimethylation by DZNepalters mRNA expression of Polycomb enzymes and impairs development of IVP bovine embryos. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Programa de Ciência Animal, Londrina, PR, 147p, 2015b.
- Martucci MF, Bressan FF, Sangalli JR, Silveira JC, Meirelles FV, Smith LC, Perecin F.** Impactos das técnicas reprodutivas no controle epigenético de genes imprintados. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, n.2, p.255-262, 2015.
- Mattson BA, Albertini DF.** Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev*, v.25, p.374-383, 1990.
- Mellor, J.** Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends in Genetics*, v.22, p.320-329, 2006.
- Memili E, First NL.** Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression compared with other species. *Zygote*, v.8, p.87-96, 2000.



- Misteli T.** Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*, v.128, p.787-800, 2007.
- Murata K, Kouzarides T, Bannister AJ, Gurdon JB.** Histone H3 lysine 4 methylation is associated with the transcriptional reprogramming efficiency of somatic nuclei by oocytes. *Epigenetics Chromatin*, v.3, n.4, 2010.
- Niakan KK, Eggan K.** Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Devel Biol*, v.375, n.1, p.54-64, 2013.
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E.** Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, v.303, p.644-649, 2004
- Racedo SE, Wrenzycki C, Lepikhov K, Salamone D, Walter J, Niemann H.** Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.738-48, 2009.
- Ross PJ, Ragina NP, Rodriguez RM, et al.** Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction*, v.136, p.777-785, 2008.
- Salha O, Abusheika N, Sharma V.** Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Hum Reprod Update*, v.4, p.816-832, 1998.
- Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W.** Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Current Biology*, v.13, p.1116-1121, 2003.
- Sasaki H, Ishihara K, Kato R.** Mechanisms of Igf2/H19 imprinting: DNA methylation, chromatin and longdistance gene regulation. *J Biochem*, v.127, p.711-715, 2000.
- Schuettenruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G.** Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell*, v.128, p.735-745, 2007.
- Schultz RM.** The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update*, v.8, p.323-331, 2002.
- Seneda MM, Bordignon V.** Novos conceitos em foliculogênese. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.857-868, 2007.
- Shi Y.** Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat Rev Genet*, v.8, p.829-833, 2007.
- Souza-Cáceres MB, Silva WAL, Lima ACB, Oliveira Junior JS, Cardoso CJT, Santos JV, Andrade ER, Franco MM, Poehland R, Melo-Sterza FA.** Trimethylation of histone 3 at lysine 4 in cryopreserved bovine embryos produced in vivo with sexed semen. *Theriogenology*, v.86, p.1944-1952, 2016.
- Strahl B, Allis CD.** The language of covalent histone modification. *Nature*, v.403, p.41-45, 2000.
- Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA, Dean J, Nelson LM.** Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet*, v.26, p.267-268, 2000.
- Waggoner, D.** Mechanisms of disease: epigenesis. *Semin Pediatr Neurol*, v.14, p.7-14, 2007.
- Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney M.J.** Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, v.7, n.8, p.847-854, 2004.
- Weidman JR, Dolinoy DC, Murphy SK, Jirtle RL.** Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. *Cancer J*, v.13, n.1, p.9-16, 2007.
- Wickramasinghe D, Ebert KM, Albertini DF.** Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Dev Biol*, v.143, p.162-172, 1991.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H.** Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, v.68S, p.77-83, 2007.
- Wu FR, Liu Y, Shang MB, Yang XX, Ding B, Gao JG, Wang R, Li WY.** Differences in H3K4 trimethylation in in vivo and in vitro fertilization mouse preimplantation embryos. *Genet Mol Res*, v.11, n.2, p.1099-1108, 2012.
- Zhang A, Xu B, Sun Y, et al.** Dynamic changes of histone H3 trimethylated at positions K4 and K27 in human oocytes and preimplantation embryos. *Fertil Steril*, v.98, p.1009-1016, 2012.
- Zuccotti M, Piccinelli A, Giorgi Rossi P, Garagna S, Redi CA.** Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Mol Reprod Dev*, v.41, p.479-485, 1995.



Short Communication

Follicular dynamics of induced estrus of females from the Pantaneira breed

Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira¹, Mirela Brochado Souza-Cáceres², Níkolos Cáceres de Oliveira-Brochado¹, Jair Sábio Oliveira Júnior³, Marcus Vinicius Moraes de Oliveira¹, Fabiana de Andrade Melo-Sterza^{1*}

¹Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, UEMS, Aquidauana, MS, Brasil.

²Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil.

³Faculdade de Ciências Biomédicas de Cacoal, FACIMED, Cacoal, RO, Brasil.

ARTICLE INFO

Article history

Received 06 October 2016

Received in revised form 26 April 2017

Accepted 02 May 2017

Keywords:

Adapted breed

Conservation

Estrous cycle

Reproduction

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the performance of heifers from the Pantaneira breed in FTAI programs and characterize follicular dynamics after induced estrus synchronization programs. The pregnancy rate observed in an FTAI program (36,4%) followed by the AI of estrus return was 45.5%. The study of follicular dynamics revealed that females from this breed, on average, show ovulation 77 hours after the withdrawal of the progesterone device, being therefore later than in other bovine breeds. The results suggest that the late ovulation of the females submitted to estrus synchronization programs may negatively influence their pregnancy rates.

INTRODUCTION

Pantaneira cattle are at risk of extinction, with less than 1000 animals in the effective herd. The loss of a single breed irreversibly prevents access to their genes in breeding programs and future industrial crosses (EGITO; MARINANTE; ALBUQUERQUE, 2002).

The Pantaneira breed has high ability to survive and reproduce in rudimentary environments (SANTOS et al., 2005). There are records that such animals are resistant to trypanosomiasis, myiasis, worms and ticks, being able to survive in extreme ecological conditions, in a region where climatic conditions range from floods to drought throughout the year (DANI; OLIVEIRA, 2013).

Reproductive biotechnologies are essential tools for effective breed multiplication and conservation

programs. However, preliminary results of the use of Fixed Time Artificial Insemination (FTAI) and Multiple Ovulation and Embryo Transfer (personal communication) were below expectations when compared to other bovine breeds. Based on this information, it is believed that differences in the reproductive physiology of these animals may justify the lower efficiency of such biotechniques.

It is known that animals from different bovine breeds have different physiological characteristics, including the duration of estrus which is 18 hours for *Bos taurus* (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004) and 12 hours for *Bos indicus* (PIRES et al., 2003). Such differences directly influence biotechnologies such as FTAI and ETFT (embryo transfer at fixed time), since the time required for the animals to respond to hormonal protocols will

* Corresponding author: fabiana.sterza@gmail.com

also be different (FERREIRA et al., 2012; SALES et al., 2015; SOUZA, 2012).

According to our research this was the first scientific study that characterized the ovarian dynamics and progesterone concentrations in bovine females from the Pantaneira breed submitted to hormonal treatment. So far, there were only data from books whose reports had been obtained from the pantaneiro population (MAZZA et al., 1994).

The aim of this study was to report the reproductive performance of the Pantaneira cattle in the FTAI program and to characterize the follicular dynamics induced by estrus synchronization programs.

MATERIAL AND METHODS

Eleven heifers from the Pantaneira breed, from a contemporary 24-month-old, cyclical, single and with a mean body score of 3.5 batch, were submitted to a standard FTAI protocol for bovines, where: on day zero (D0) the introduction of the progesterone implant (CIDR®) with 1.9 mg of progesterone and the intramuscular application of 2 mg of estradiol benzoate (BE) was carried out. On day eight (D8) the CIDR® was withdrawn and 400UI of Equine Chorionic Gonadotrophin (eCG; Novormon®, MSD Animal Health) and 0.15 mg of d-cloprostenol were applied. On day nine (D9) 1 mg of EB was administered intramuscularly and 48-54 hours after the withdrawal of the progesterone implant, the FTAI was done. The inseminations of return were initiated 18 days after the procedure. In order for this to be carried out, estrus was observed for 7 days, and after 12 hours of their detection, the animals were inseminated again. The inseminations were performed with doses of semen coming from a single bull belonging to one of the conservation groups of the breed. The semen was evaluated according to CBRA standards (1998).

In order to evaluate the follicular dynamics, fifteen cyclic and with a body score of 3.5 (scale 1 - 5) Pantaneira heifers were used, they underwent estrus hormonal induction twice at a 28-day interval; thus obtaining 30 experimental units. The following synchronization protocol was used: In the D0 the ultrasound evaluation of the ovaries was made, followed by the introduction of CIDR® and the application of 2 mg EB and 25 mg of dinoprost tromethamine (Lutalyse®, Zoetis) by intramuscular injection. On day 7 (D7) CIDR® was withdrawn, then we began the ultrasonographic evaluation and the blood collection every 24 hours. From day 9 (D9) the evaluations and collections of blood began to be performed every 12 hours until the moment of ovulation or until the D12, the last evaluation day.

Each ultrasonographic evaluation was performed counting the follicles present and measuring the diameter of the largest follicle present in each ovary. The measurements were made with the aid of the resources from the ultrasound equipment itself. The presence of corpus luteum was also recorded. The following parameters were evaluated: Daily follicular growth rate, ovulatory follicle diameter, the interval between the withdrawal of the progesterone device and ovulation and serum progesterone levels (P4). The daily growth rate (mm / day) was calculated by the formula: $(M_{fol} - m_{fol})/N_d$, being M_{fol} : Diameter of the largest follicle found; m_{fol} , Diameter of the smallest follicle found; N_d : Number of observation days (COUTINHO et al., 2007; URIBE-VELÁSQUEZ; SOUZA; OSORIO, 2011). The evaluation of serum P4 concentrations was done by Radioimmunoassay, using the P4 Kit (TKP Genese®).

All the procedures performed in order for this study to be carried out were approved by the Animal Ethics Committee under the protocol 015/2014.

The results are expressed as means followed by standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

The pregnancy rate obtained with the FTAI management was 36.4% (4/11). At the end of the program, 45.5% (5/11) of pregnancy was obtained after the inseminations of the return estrus.

The FTAI protocol used was the standard for beef cattle and for which an average of 50% (43,2% a 67%) pregnancy rate is expected (HILL et al., 2014; SALES et al., 2015). In the present study, the pregnancy rate of FTAI and return insemination (Table 1) was below desired, as observed for other cattle breed. In general, pregnancy rates above 70% are expected when FTAI and AI are associated (CAMPOS et al., 2013; ESCALANTE et al., 2013). Similar results to the ones of this study have been reported by researchers and collaborators of other conservation groups of the breed (unpublished data).

We attempted to explain the low conception rates obtained in FTAI programs by studying the follicular dynamics of two induced estrus from Pantaneira females. The P4 profile over the experimental period is shown in figure 1, and it clearly indicates that when concentrations of P4 reached concentrations less than or equals to 1 ng / ml, the dominant follicle grew to its maximum size (9.95 ± 0.34), considered the pre-ovulation size.

Figure 1. Mean of dominant follicle size and progesterone concentration from Pantaneira females submitted to the estrus synchronization protocol.

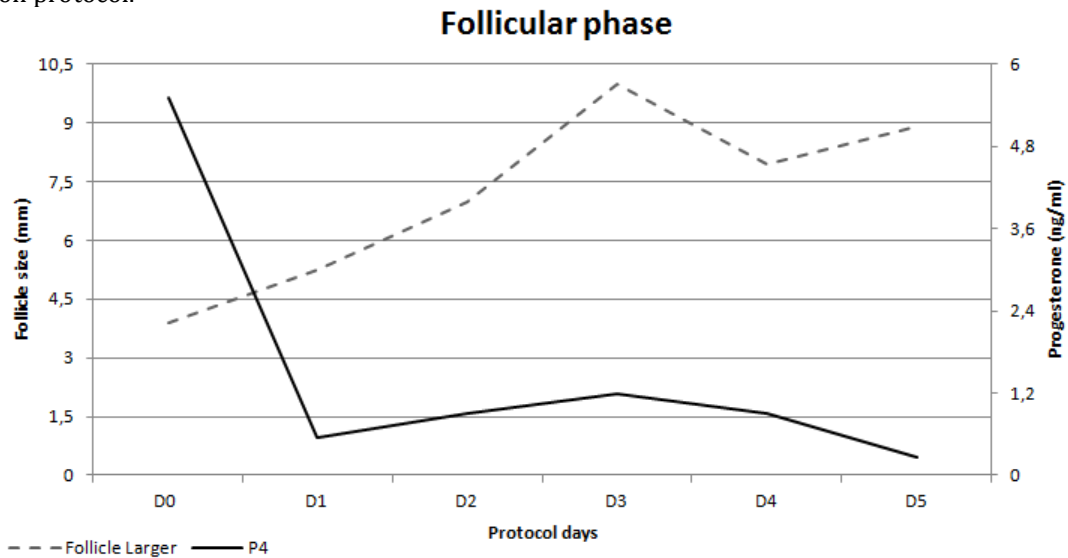


Table 1 shows the parameters of the follicular dynamics (Daily follicular growth rate, ovulatory follicle diameter and the interval between the withdrawal of the progesterone device and ovulation) of an induced follicular wave in Pantaneira heifers.

Table 1. Parameters of follicular dynamics of an induced follicular growth wave in Pantaneira heifers.

Parameters	Results
Ovulation after withdrawal of P4 (hours)	77±13,2
Daily growth rate (mm / day)	2,19 ±0,25
Preovulatory follicle diameter (mm)	9,95±0,34

The result of the interval between the withdrawal of the progesterone implant and the ovulation was the most expressive of this study (77 hours), because it is longer than those described in the literature for other breed: 73 hours for the Nelore breed (SALES et al., 2015) and 72.2 for Holstein (FERREIRA et al., 2012). Souza (2012) reported that, under the same environmental conditions and management of this study, Girolando cows ovulated 63 hours after the withdrawal of P4.

Considering that the greatest fertility period of bovine oocytes has an average of six hours after ovulation (RIVIEIRA, 2009) and that the spermatozooids require approximately 8 hours for their capacitation (RIVIEIRA, 2009) having a mean viability of 24 hours and their maximum fertility being in the first hours, an average delay of 5 hours in ovulation, as observed in this breed, can significantly interfere the pregnancy rates. An ovulation delay of 6 to 12 hours in regularly cyclical females, is considered a pathology because oocytes from these ovulations are considered incapable of being fertilized (FISCHER et al., 2002). In the case of the

Pantaneira breed, it is believed that the upper interval between the withdrawal of the progesterone implant and the ovulation is not a pathology but a characteristic of the breed in response to hormonal treatments. It is noteworthy that the herd in this study were ex sito, and there are reports that females of this breed were submitted to natural mating, the birth rate (above 70%) was satisfactory for animals raised in Pantanal (MAZZA et al., 1989).

It is notable, on the other hand, that the standard deviation of this variable demonstrates great individual variability (60 and 108 hours), which may be related to the fact that the above mentioned breed was not subjected to genetic selection over the years. Despite this, the result cannot be disregarded since the difficulty to obtain satisfactory results with the artificial insemination has been shared between the nuclei of conservation of the breed.

CONCLUSION

The evaluation of the follicular dynamics of an estrus hormonal induced from Pantaneira breed demonstrated that the interval between the withdrawal of the progesterone device and the ovulation (77 hours) is superior to that of other breeds, which may have influenced negatively the pregnancy rates of females submitted to the FTAI programs.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Research Support Foundations: Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP), Fundect, CAPES and CNPq.

REFERENCES

- CAMPOS, J. T. et al. Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in lactating *Bos indicus* cows. **Theriogenology**. v.80, p.619-623, 2013.
- COUTINHO, G. T. R. M. et al. Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. **Arquivos brasileiros de medicina veterinária e zootecnia**. v.59, p.1089-1096, 2007.
- DANI, S. U.; OLIVEIRA M. V. M. Cattle, cheese and conservation. **Nature**. v.502, p.448, 2013.
- EGITO, A. A.; MARINANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos Genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**. v.51, p.39-52, 2002.
- ESCALANTE, R. C. et al. Reproduction in grazing dairy cows treated with 14-day controlled internal drug release for presynchronization before timed artificial insemination compared with artificial insemination after observed estrus. **Jornal Dairy Science**. v.96, p.300-306, 2013.
- FERREIRA, M. C. N. et al. Avaliação da taxa de gestação em vacas nelore Multíparas submetidas à inseminação artificial E inseminação artificial em tempo fixo. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** v.34, p.152-156, 2012.
- FISCHER, A. R. et al. Zyklus-Störungen und Krankhafte Veränderungen. In: Rinderbesamung mit Erfolg. Landwirtschaftsverlag GmbH. Münster-Germany, 2002. p.39.
- HILL, S. L. et al. Altered progesterone concentrations by hormonal manipulations before a fixed-time artificial insemination CO-Synch þ CIDR program in suckled beef cows. **Theriogenology**. v.82, p.103-104, 2014.
- LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.209-223, 2004
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA. 1998.
- MAZZA, M. C. M. et al. Conservação do bovino pantaneiro. In: Mazza, M. C. M.; Mazza, C. A. S.; Sereno, J. R. B.; Santos, S. A.; Pellegrin, A. O. **Etnobiologia e conservação do bovino pantaneiro**. Corumbá: EMBRAPA. 45-54 1994.
- MAZZA, M. C. et al. **Desempenho de bovinos pantaneiros no núcleo de conservação da fazenda Nhumirim, Nhecolândia, Pantanal: avaliação preliminar**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 1989.
- PIRES, M. F. A.; et al. Comportamento de vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*) em estro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.187-196, 2003.
- RIVIEIRA, H. M. Tiempo para hacer la inseminacion artificial en vacas lecheras. **Dairy Cattle Reproduction Conference**. 2009.
- SALES, J. N. et al. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Theriogenology**. v.83, p.1093-1100, 2015.
- SANTOS, S. A. et al. Desempenho de bezerros pantaneiros, nelore cruzados criados no pantanal, Brasil. **Archivos de Zootecnia**. v.54, p.501-508, 2005.
- SOUZA, M. B. **Dinâmica folicular de novilhas da raça Pantaneirapara avaliação e caracterização dos parâmetros reprodutivos da raça**. 2012, 36f. (Trabalho de Conclusão do Curso de Zootecnia) Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul.
- URIBE-VELÁSQUEZ, L.F., SOUZA, M. I. L.; OSORIO, J. H. Efeito do tempo da aplicação de prostaglandina na resposta folicular em ovelhas durante o ciclo estral. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.40, p.985-991, 2011.

Efeito do estresse térmico calórico agudo e crônico sobre a qualidade oocitária de bovinos de raças adaptadas

[Effect of acute and chronic caloric heat stress on oocyte quality of adapted breeds cattle]

A.L.L. Fialho¹, M.B.Souza-Cáceres², W.A.L. Silva³, E.D.S. Arruda⁴, H. Kischel⁴,
M.G.C. Ribeiro-Ferreira¹, C.F. Medeiros⁴, J.R. Silva⁴, M.V.M. Oliveira⁵,
A.L.J. Ferraz⁵, F.A. Melo-Sterza^{5,6*}

¹Aluno de pós-graduação – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - Aquidauana, MS

²Aluno de pós-graduação – Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR

³Aluno de pós-graduação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Campo Grande, MS

⁴Aluno de graduação – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - Aquidauana, MS

⁵Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - Aquidauana,

⁶Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS

RESUMO

Nos trópicos, o uso de raças adaptadas tem sido uma estratégia para minimizar o efeito do estresse térmico calórico (ETC). No entanto, faltam informações que quantifiquem o estresse e o seu efeito sobre a reprodução dessas raças. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do oócito recuperado e alguns parâmetros fisiológicos indicadores de ETC em bovinos de raças adaptadas. Animais *Bos taurus x Bos indicus* (n=6) e *Bos taurus* (raça Pantaneira; n=12), localizados na região de transição entre o Cerrado e o Pantanal brasileiro, foram submetidos à aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) em diferentes condições climáticas. Foram realizadas oito sessões de OPU, com intervalo mínimo de sete dias e máximo de 54 dias entre as coletas. Para caracterização climática, foi realizado o cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU). Foram quantificados os ITUs do dia da OPU, sete dias antes e 60 dias antes de cada sessão. Os parâmetros fisiológicos e a viabilidade oocitária de fêmeas das raças Girolando e Pantaneira não foram afetados negativamente por ITUs entre 72 e 78. O ETC crônico (60 dias) parece afetar a viabilidade oocitária de doadoras na raça Pantaneira quando ITU é superior a 75.

Palavras-chave: ambiente, bovinos, ITU, oócito

ABSTRACT

In tropical regions, the use of adapted breeds has been a strategy to minimize the effect of heat stress (HS) in cattle. However, information quantifying stress and its effect on reproduction of these breeds is lacking. The aim of this study was to evaluate the quality of the recovered oocyte and some physiological parameters that indicate HS in adapted breed. Bos taurus x Bos indicus (n=6) and Pantaneira (n=12) cows, located in the transition region between Cerrado and Brazilian Pantanal, underwent follicular aspiration guided by ultrasound (OPU) in different weather conditions. Eight sessions of OPU were carried out, with a minimum interval of 7 days and maximum 54 days between sessions. For weather characterization, the temperature and humidity index (THI) was calculated. THI of the day of OPU, 7 days before and 60 days before each session were calculated. The physiological parameters and oocyte viability of Girolando and Pantaneira cows were not negatively influenced under ITU between 72 and 78. The chronic HS (60 days) may affect the oocyte viability of Pantaneira donors when ITU is over 75.

Keywords: bovine, environment, THI, oocytes

Recebido em 21 de outubro de 2016

Aceito em 10 de fevereiro de 2017

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: fabiana.sterza@uems.br

INTRODUÇÃO

A maior parte do rebanho bovino brasileiro encontra-se em região tropical, com temperaturas médias acima da zona de termoneutralidade (Pires e Campos, 2008), onde os animais permanecem longos períodos sob estresse térmico calórico (ETC). Independentemente da origem genética, o estresse térmico por calor prejudica a homeostase, o que leva a alterações endócrinas e a efeitos negativos sobre eventos reprodutivos na fêmea bovina (Macedo *et al.*, 2014). O ETC provoca alteração do desenvolvimento folicular, diminuição ou atraso da expressão do comportamento do estro, comprometimento da competência oocitária (Gendelman *et al.*, 2010) e pode também atrasar ou mesmo inibir o desenvolvimento embrionário (Ferreira *et al.*, 2011). O desenvolvimento embrionário é prejudicado quando as fêmeas sofrem de estresse por calor no dia da IA até sete dias após esse procedimento, o que acarreta menor viabilidade embrionária (Macedo *et al.*, 2014).

As regiões tropicais têm problemas a serem estudados e superados com pesquisas que propiciem soluções adequadas para uma perfeita interação animal-ambiente, com vistas à maior produtividade (Faria, 1999). Assim, a utilização de animais adaptados aos trópicos é indicada para melhorar a produtividade nessas regiões.

Os animais Pantaneiros possuem ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial essencialmente taurino, herdado de seus ancestrais ibéricos (Issa *et al.*, 2006), sendo atualmente considerada uma raça *Bos taurus taurus* genuinamente brasileira e localmente adaptada ao bioma do Pantanal (Rufino Júnior *et al.*, 2014). Por outro lado, o Girolando é uma raça sintética, resultante do cruzamento entre bovinos Holandeses (*Bos taurus taurus*) com animais da raça Gir (*Bos taurus indicus*), cujo objetivo é buscar a complementaridade entre essas raças, de modo a aliar a produtividade das vacas Holandesas à maior resistência do gado Gir às condições climáticas dos trópicos.

A produção *in vitro* de embriões pode ser considerada uma alternativa para manejar os efeitos do ETC, pois etapas essenciais da reprodução, tais como a maturação oocitária e o desenvolvimento inicial dos embriões, ocorrem em ambiente controlado. No entanto, não está

claro o efeito do ETC sobre a foliculogênese e a oogênese, bem como o seu impacto sobre a qualidade dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs) obtidos por OPU. Quedas na qualidade dos COCs têm sido associadas a alterações das condições fisiológicas dos animais (Bilby *et al.*, 2014), fato que estimula o estudo mais apurado dessa questão.

Armstrong (1994) definiu níveis de estresse (ameno a severo) para bovinos, de acordo com os valores de ITU. No entanto, a aplicabilidade desses valores para bovinos de raças adaptadas aos trópicos e a influência do estresse agudo e crônico sobre parâmetros reprodutivos ainda precisam ser avaliados.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do ETC agudo e crônico sobre os parâmetros fisiológicos e o número e a viabilidade dos COCs aspirados de fêmeas das raças Pantaneira e Girolando.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais das raças mestiças *Bos taurus* x *Bos indicus* (Girolando livro aberto; n=6) e Pantaneira (n=12) foram selecionados de acordo com suas características clínico-reprodutivas. As doadoras eram vacinadas contra doenças infecciosas e reprodutivas (vacinação realizada pelo menos 60 dias antes da primeira OPU), não gestantes, com idade média de 48 meses e escore corporal entre 3 e 3.5 (escala de 1 a 5).

O experimento foi realizado na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, situada em lat. 20°30'S, long. 55°50'W. Os animais estavam em regime de pastejo rotacionado, cultivado com capim-tanzânia (*Panicum maximum*), com suplementação mineral e água *ad libitum*.

Foram realizadas oito sessões de OPU, com intervalo mínimo de sete dias e máximo de 54 dias entre as coletas, durante os meses de maio a novembro de 2014. Cada animal foi submetido a, no mínimo, uma sessão e a, no máximo, oito sessões de OPU. Todos os procedimentos de OPU foram realizados com o mesmo número de doadoras para as duas raças, sendo no mínimo seis e no máximo 10 animais por coleta. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, por meio do Protocolo Ceua/UEMS 013/2013.

Para redução dos movimentos peristálticos e menor desconforto do animal, foram injetados 5mL de uma combinação de lidocaína 2% e acepromazina 1% no espaço epidural. Para a aspiração dos folículos, foram utilizadas agulhas hipodérmicas descartáveis 20G (50mm x 9mm; Terumo®, Bio Brasil) e mangueira de silicone com 2mm de diâmetro interno e 80cm de comprimento. A pressão de vácuo foi de 80mm de Hg, mantida com uma bomba de aspiração (Aquila PRO®, Pie Medical, acoplado a transdutor microconvexo 8MHZ e bomba à vácuo BV-003D WTA). O meio de aspiração era constituído por DPBS acrescido de 20.000UI/L de heparina sódica, mantido a 30°C durante a aspiração. Os COCs recuperados foram rastreados e classificados imediatamente após a OPU. Foram considerados como viáveis os COCs com uma ou mais camadas de células do *cumulus* compactas e citoplasma homogêneo.

Antes da realização de cada OPU, foi aferida a temperatura retal, com termômetro digital de uso veterinário. A frequência respiratória de cada animal manejado era contada de acordo com os movimentos do flanco em movimentos por minuto. Tais procedimentos foram realizados em todos os animais, em todas as coletas.

Para o cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU), foram utilizados os dados de temperatura do ar (T) e umidade relativa (UR), provindos da estação meteorológica da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). O cálculo do ITU foi feito de acordo com Thom (1959), sendo: $ITU = (0,8 \times T + (UR(\%)/100) \times (T - 14,4) + 46,4)$, em que: T= temperatura (°C) e UR = umidade relativa do ar. Os valores obtidos a partir da equação foram classificados no modelo definido por Armstrong (1994) em ameno ou brando (72 a 78), moderado (79 a 88) e severo (89 a 98). ITU abaixo de 72 caracterizaria um ambiente sem estresse por calor. Foram calculados ITU de sete e 60 dias antes da OPU, e no dia da OPU, com o objetivo de caracterizar o ETC crônico (60 dias) e agudo (sete a zero dias). O ITU foi calculado de hora em hora, durante todos os dias do período experimental. Foram, assim, considerados o ITU da manhã (cálculo médio entre oito e 11 horas da manhã), da tarde (cálculo médio entre às 13 e 16 horas) e do dia todo (cálculo da média do ITU de cada hora das 24 horas do dia).

Para a análise estatística, os dados foram submetidos à regressão linear e à análise de variância pelo programa R (versão 3.3.1). Quando encontradas diferenças, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região de transição entre o Cerrado e o Pantanal brasileiro é conhecida pelas altas temperaturas ambientais registradas em grande parte do ano. O perfil climático do período experimental demonstrou que apenas nos meses de maio, junho e julho as temperaturas do dia foram inferiores a 25°C. A UR foi, em geral, alta, mas apresentou grande variação nos meses mais quentes do período (Fig. 1). Segundo Barros *et al.* (2010), a alta umidade do ar, combinada com elevadas temperaturas, acarreta mudanças no comportamento fisiológico do animal, o que promove maior gasto de energia para manutenção de sua homeostase. Nesses casos, ocorre redução dos índices produtivos e reprodutivos do animal.

A grande variação climática que ocorre ao longo do dia pode subestimar o ETC ao qual os animais são submetidos. Navarini *et al.* (2009), Fialho (2015) e Kischel (2016) relataram esse fato e concluíram sobre a baixa eficiência da utilização do ITU médio do dia para determinar o ETC. No presente estudo, o ETC da manhã e da tarde foram significativamente superiores ao ITU do dia todo, e não foi verificada diferença estatística entre o ITU do período da manhã e o da tarde (Fig. 2).

Na Fig. 2, pode ser observada a variação do ITU 60 e sete dias antes da OPU e no dia da OPU nas oito sessões de OPU.

Considerando-se o ITU médio do dia da OPU, seria possível afirmar que, nas coletas 1, 2, 4 e 5, os animais encontravam-se em conforto térmico, no entanto o mesmo fato não foi observado para os ITUs médios do dia da OPU nos períodos da manhã e da tarde, o que confirma a necessidade de considerar os horários mais quentes do dia para determinar o ETC. Considerando-se o ITU dos sete dias anteriores a cada OPU e do dia da OPU, somente em uma das coletas o ITU da tarde foi inferior a 72. Observou-se, no entanto, variação importante desse índice entre as sessões de aspiração folicular.

Efeito do estresse...

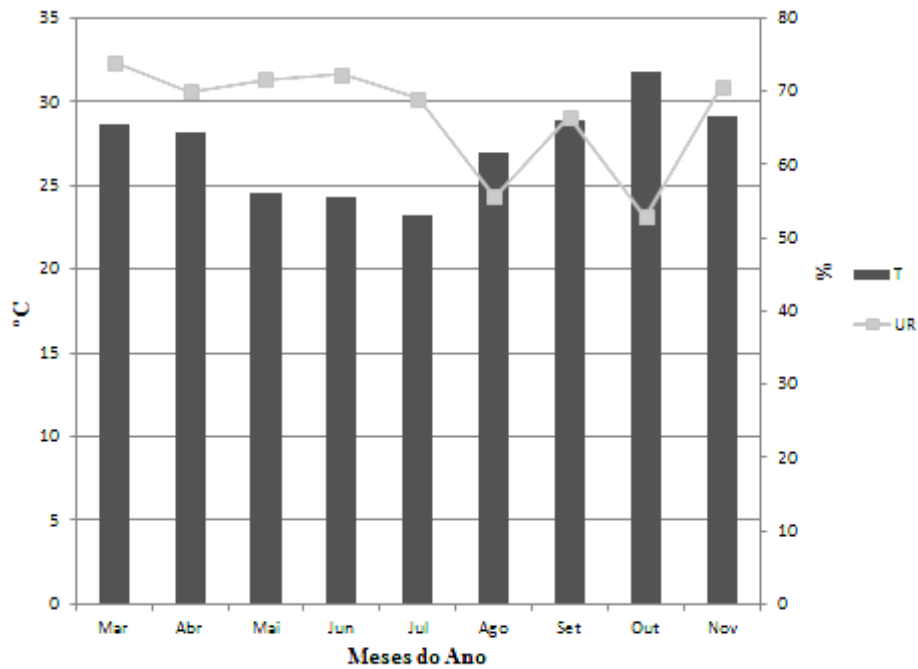


Figura 1. Perfil climático do período experimental - março a novembro/2014. Os dados de temperatura (T, em °C) e umidade relativa do ar (UR, em %) foram obtidos da estação metereológica da UEMS. Foram considerados nesse gráfico os períodos das oito às 11 horas e das 13 às 16 horas.

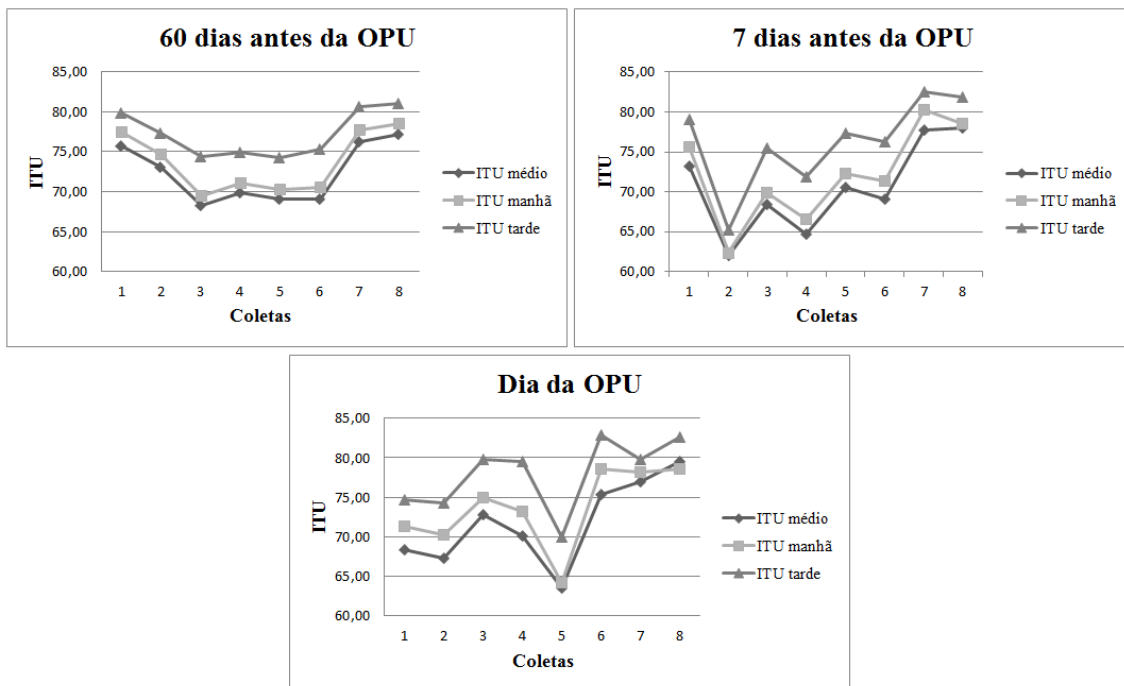


Figura 2. Índice de temperatura e umidade (ITU) 60 e sete dias antes da OPU e no dia da OPU de vacas das raças Pantaneira e Girolando.

A grande variação climática observada demonstra que a caracterização do conforto térmico baseada apenas nas estações do ano também é muito frágil (coleta 1 e 2: maio; coleta 3 e 4: julho; coleta 5 e 6: agosto; coleta 7: outubro; coleta 8: novembro).

Ao observar o ITU médio dos 60 dias anteriores à OPU, constata-se que, nas sessões de OPU 1, 2, 7 e 8, os animais estavam em estresse crônico, ou seja, foram submetidos a ITUs superiores a 72, em média, durante 60 dias. Quando apenas o ITU da tarde é considerado, observa-se que, em todas as sessões de aspiração, o ITU estava acima de 72.

A escolha de raças mais adaptadas às regiões de clima quente tem sido uma alternativa para

manejar os efeitos de ETC sobre a produção animal. As raças Girolando e Pantaneira se enquadram nessa categoria.

Não foi observada diferença estatística da temperatura retal, frequência respiratória e frequência cardíaca entre as sessões de OPU, o que indica que, provavelmente, animais das raças estudadas não sofrem de ETC em ITUs entre 72 e 78 (ITU máximo observado no momento da OPU). Os dados apresentados na Tab. 1 são oriundos das médias de todas as coletas e aferições no período experimental, independentemente do ITU, sendo considerado apenas o efeito da raça, já que nenhum efeito do ETC agudo foi observado sobre os parâmetros avaliados.

Tabela 1. Parâmetros fisiológicos e qualidade de complexos oócitos - *cumulus* (COCs) obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassonografia das raças Girolando e Pantaneira

Raça	Temperatura retal	Frequência respiratória	Total de COCs	COCs viáveis
Girolando	38,31±0,07 ^a	32,1±1,4 ^a	6,7±0,8 ^a	3,1±0,4 ^a
Pantaneira	38,64±0,07 ^b	28,6±1,4 ^a	7,4±0,8 ^a	3,7±0,4 ^a

*Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

A temperatura retal é usada, frequentemente, como parâmetro de definição de adaptação fisiológica ao ambiente quente, pois seu aumento indica que os mecanismos de liberação de calor tornaram-se insuficientes para manter a homeotermia (DuPreez, 2000). Apesar de ter sido constatada diferença na TR entre as raças, essa distinção não superou a faixa de normalidade para a espécie, em nenhum dos dias em que a OPU foi realizada, o que confirma que os animais conseguiram manter a homeotermia em ITUs de até 78. Em estudos anteriores, foi relatado que bovinos que estão em situação de ETC apresentam TR com valores acima de 39°C (Pires e Campos, 2008; Vasconcelos e Demétrio, 2011), situação não observada neste estudo.

O fato de os parâmetros fisiológicos (TR e FR) e reprodutivos (viabilidade de COCs) da raça Pantaneira (taurina) serem semelhantes aos animais Girolando, uma raça mestiça (*Bos taurus* x *Bos indicus*) e moldada sinteticamente para as condições tropicais, confirma a adaptação dos animais Pantaneiros às condições climáticas da

região do Alto Pantanal Sul-Matogrossense, já relatada anteriormente (Marques Jr et al., 2012).

A frequência respiratória é, em geral, o primeiro parâmetro fisiológico a ser alterado em situações de estresse pelo calor, atuando como alternativa de dissipação de calor e controle da temperatura corporal (Costa et al., 2015). Azevedo et al. (2005), ao avaliarem vacas mestiças, observaram que a frequência respiratória evidenciou ser um indicador de estresse térmico melhor que a temperatura retal, assim como no presente experimento. Neste ensaio, a frequência respiratória em doadoras da raça Girolando foi aumentando linearmente à medida que houve aumento de ITU, fato não observado na raça Pantaneira (Fig. 3).

De acordo com Moraes (2010), quanto menor a FR mais adaptado é o animal ao ETC. Apesar de as doadoras da raça Girolando demonstrarem a referida variação de FR, até ITU 79,5, a FR manteve-se dentro da normalidade.

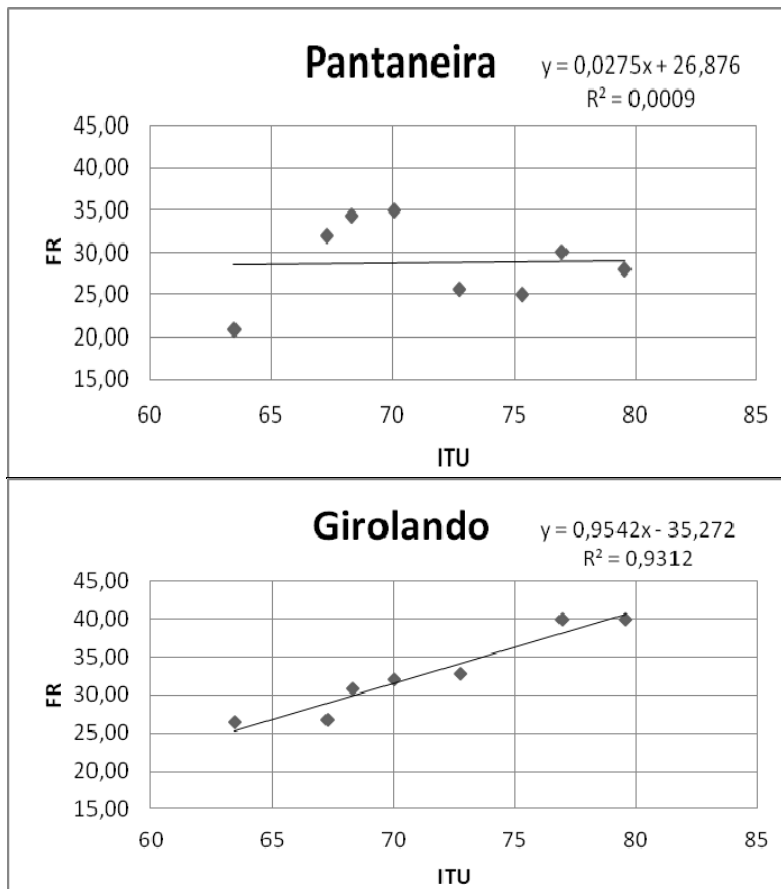


Figura 3. Análise de regressão da frequência respiratória (FR) de animais da raça Girolando ($P=0,02841$) e Pantaneira ($P=0,1278$) em relação ao ITU do período em que foram realizadas as OPUs.

Avaliações empíricas normalmente associam as condições climáticas aos resultados de OPU e da múltipla ovulação e transferência de embriões. No entanto, são escassas as informações científicas a esse respeito. Considerando-se que um folículo antral de 0,13mm de diâmetro leva aproximadamente 42 dias, ou seja, aproximadamente dois ciclos estrais para atingir o tamanho pré-ovulatório em uma vaca (Lussier *et al.*, 1987), acredita-se que o ETC crônico possa impactar, de maneira significativa, sobre a eficiência reprodutiva.

Chebel (2014) relatou que o estresse crônico ou múltiplos estresses agudos podem acarretar alterações hormonais, o que prejudica a qualidade do oócito e o desenvolvimento inicial embrionário. Roth *et al.* (2001) relataram que folículos que se desenvolvem sobre condições de estresse térmico possuem uma deficiência na esteroidogênese das células da teca e granulosa,

e, como consequência, ocorre uma redução nas concentrações de estradiol no fluido folicular. Essa redução pode afetar a secreção de gonadotrofinas que estejam envolvidas na aquisição de competência meiótica dos oócitos.

O número de COCs obtidos neste experimento foi semelhante entre as raças nas condições do Cerrado-Pantanal. Todavia, o número de COCs totais e viáveis obtidos da raça Girolando, no presente experimento, foram inferiores aos verificados por Pontes *et al.* (2010), que obtiveram média de 15 COCs viáveis/doadora. Vale ressaltar que a grande variação individual de COCs aspirados da raça Girolando já havia sido relatada (Prado *et al.*, 2007) e está relacionada à idade, à categoria, às condições ambientais, ao *status* nutricional e até mesmo àquelas inerentes à genética do próprio animal. Sobre a raça Pantaneira, ainda não existem relatos a esse respeito.

Como esperado, não foi observada interferência do ITU sobre a viabilidade oocitária, quando avaliados os dados de sete dias anteriores à OPU e no dia da OPU. Porém, quando se avaliou o estresse crônico (60 dias antes da OPU), pôde-se ver uma evidente queda na qualidade dos COCs das doadoras da raça Pantaneira à medida que houve o aumento do ITU (Fig. 4). As doadoras

da raça Pantaneira também produziram mais COCs viáveis em períodos sem ETC. Esses resultados corroboram os de Torres-Júnior *et al.* (2008), que observaram alteração da dinâmica folicular e redução da competência oocitária até 119 dias depois do ETC de 28 dias induzido em vacas Gir, em câmara climática.

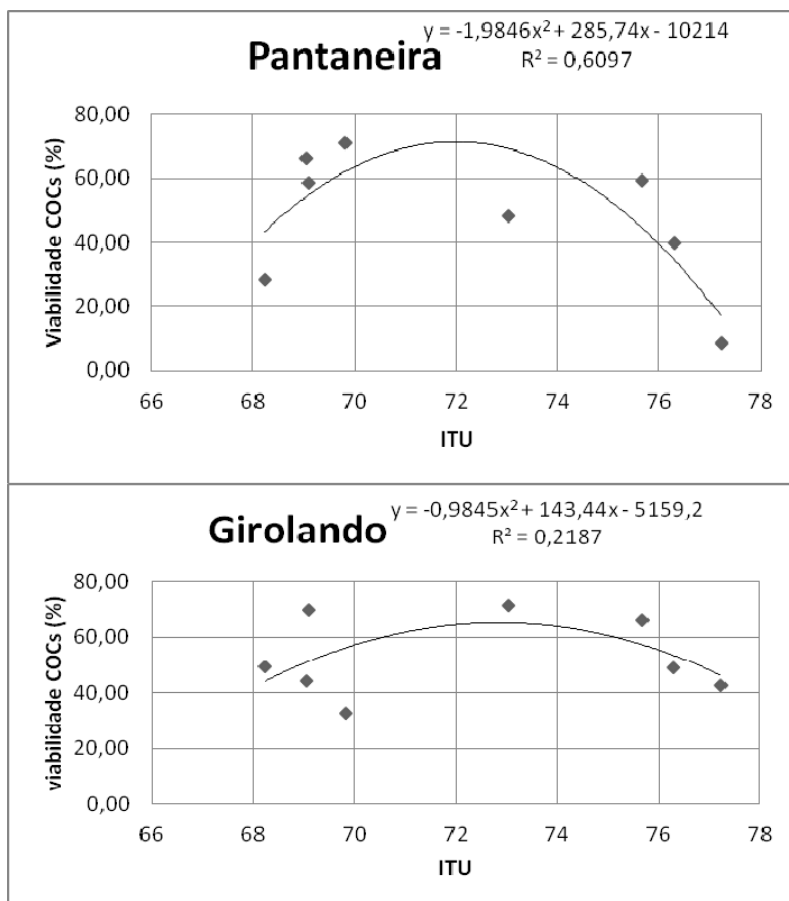


Figura 4. Análise de regressão da viabilidade de COCs de doadoras da raça Pantaneira ($P=0,01405$) e Girolando ($P=0,8383$) em relação aos valores de ITU, dos 60 dias antes da OPU.

O fato de a viabilidade oocitária das fêmeas Girolando não ter sofrido influência significativa de ETC crônico pode estar relacionado ao aumento da FR (observado nessa raça quando houve aumento de ITU) associado a mecanismos de regulação da temperatura do estroma ovariano (Hunter e Einer-Jensen, 2005), o que auxilia na termorregulação desses animais, de forma suficiente a não interferir na qualidade do oócito.

O valor do índice de temperatura e umidade a partir do qual vacas Holandesas iniciam o declínio na produção de leite é igual a 72 (Silva *et al.*, 2002). Entretanto, na literatura nacional e na estrangeira, há poucas informações a respeito dos níveis críticos desse índice para vacas mestiças (Azevedo *et al.*, 2005). Azevedo *et al.* (2005) relataram que a temperatura retal de animais mestiços só ultrapassou os parâmetros fisiológicos normais quando valores de ITU foram iguais a 80, 77 e 75 para os animais dos

grupos genéticos $1/2$, $3/4$ e $7/8$ HZ, respectivamente. A frequência respiratória só foi alterada quando os valores de ITU foram iguais a 79, 77 e 76 para os animais dos grupos genéticos $1/2$, $3/4$ e $7/8$ HZ, respectivamente.

Os resultados obtidos neste ensaio permitem sugerir que a classificação de ETC sugerida por Armstrong (1994) não pode ser aplicada para animais de raças adaptadas aos trópicos. Neste estudo, a TR e a FR não alcançaram valores acima do padrão de referência com ITU de 77 e 79 para as vacas Girolando e Pantaneira, respectivamente. A viabilidade oocitária só esteve abaixo de 60% quando ITU foi superior a 75 nos 60 dias anteriores à OPU, para as duas raças. Dessa forma, esta pesquisa sugere que as equações de ETC já existentes para outras raças, dependem de ajustes, assim como já sugerido por Lopes (2009).

Considerando-se as alterações climáticas frequentes, assim como o fato de que os meses de dezembro, janeiro e fevereiro, classicamente de altas temperaturas e umidades, não foram avaliados neste estudo e que, mesmo assim, o efeito do estresse crônico foi observado sobre a viabilidade oocitária da raça Pantaneira, acredita-se que o manejo do ambiente seja necessário para raças adaptadas para evitar o ETC crônico e garantir melhores resultados na produção *in vitro* de embriões.

CONCLUSÃO

Os parâmetros fisiológicos e a viabilidade oocitária de fêmeas das raças Girolando e Pantaneira não foram afetados negativamente por ITUs entre 72 e 78. O ETC agudo não interferiu na viabilidade oocitária de fêmeas das raças estudadas. O ETC crônico (60 dias) afetou a viabilidade oocitária de doadoras na raça Pantaneira quando ITU foi superior a 75.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect/MS), ao Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP), à Rede Pró-Centro-Oeste, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida e pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, D.V. Heat stress interaction with shade and cooling. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.2044-2050, 1994.

AZEVEDO, M.; PIRES, M.F.A.; SATURNINO, H.M. *et al.* estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras $1/2$, $3/4$ e $7/8$ Holandês-Zebu em Lactação. *Rev. Bras. Zootec.*, v.34, p.2000-2008, 2005.

BARROS, P.C.; OLIVEIRA, V.; CHAMBÓ, E.D.; SOUZA, L.C. Aspectos práticos da termorregulação em suínos. *Rev. Eletron. Nutritime*, v.7, p.1248-1253, 2010.

BILBY, T.R.; TATCHER, W.W.; HANSEN, P.J. Estratégias farmacológicas, nutricionais e de manejo para aumentar a fertilidade de vacas leiteiras sob estresse térmico. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 18., 2014, Uberlândia. *Anais...* Uberlândia, MG: [UNESP], 2014, p.59-71.

CHEBEL, R.C. Consequências do estresse sobre imunidade, metabolismo e desempenho de vacas peri-parto. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 18., 2014, Uberlândia. *Anais...* Uberlândia, MG: [UNESP], 2014, p.82-105.

COSTA, D.F.; SOUTO, D.V.O.; ROCHA, E.F. *et al.* Influência do estresse calórico na fisiologia hormonal de bovinos. *Rev. Agropecu. Cient. Semiárido*, v.11, p.33-38, 2015.

DUPREEZ, J.H. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. *J. Vet. Res.*, v.67, p.263-271, 2000.

FARIA, V.P. Produção de bovinos nos trópicos. In: FARIA, V.P.; MOURA, J.C.; PEIXOTO, A.M. Bovinocultura de corte: fundamentos da exploração racional. 3.ed. Piracicaba: FEALQ, 1999. p.23-41.

FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M.R. *et al.* The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J. Dairy Sci.*, v.94, p.2383-2392, 2011

FIALHO, A.L.L. *Influência das condições climáticas sobre a qualidade oocitária das raças girolando e pantaneira situadas no Cerrado-Pantanal.* 2015. 61f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Unidade Universitária Aquidauana, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS.

- GENDELMAN, M.; AROYO, A.; YAVIN, S.; ROTH, Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, v.140, p.73-82, 2010.
- HUNTER, R.H.; EINER-JENSEN, N. Pre-ovulatory temperature gradients within mammalian ovaries: a review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, v.89, p.240-243, 2005.
- ISSA, E.C.; JORGE, W.; SERENO, J.R.B. Cytogenetic and molecular analysis of the Pantaneiro cattle breed. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.41, p.1609-1615, 2006.
- KISCHEL, H. *Taxa de prenhez e parâmetros fisiológicos de vacas nelore mantidas sob diferentes condições de sombreamento natural*. 2016. 22f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Zootecnia) - Unidade Universitária de Aquidauana, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS.
- LOPES, A.C.R. *Ganho de peso e rendimento de carcaça de bovinos de corte confinados com acesso a sombra*. 2009. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.
- LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fert.*, v.81, p.301-307, 1987.
- MACEDO, G.G.; COSTA E SILVA, E.V.; PINHO, R.O. *et al.* O estresse por calor diminui a fertilidade de fêmeas bovinas por afetar o desenvolvimento oocitário e o embrionário. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.38, p.80-85, 2014.
- MARQUES JÚNIOR, H.R.; JULIANO, R.S.; ABDO, Y. Bovino pantaneiro: retrospectiva histórica e fomento à raça. Experiência da parceria entre Embrapa Pantanal, Agropecuária Preservação da Fauna e Universidade Católica Dom Bosco. *Multitemas*, n.42, p.71-86, 2012.
- MORAES, J.B. *Termorregulação e adaptabilidade climática de caprinos no semiárido piauiense*. 2010. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.
- NAVARINI, F.C.; KLOSOWSKI, E.S.; CAMPOS, A.T. *et al.* Conforto térmico de bovinos da raça nelore a pasto sob diferentes condições de sombreamento e a pleno sol. *Eng. Agríc.*, v.29, p.508-517, 2009.
- PIRES, M.F.A.; CAMPOS, A.T. *Conforto animal para maior produção de leite*. Vicosa: Centro de produções técnicas, 2008. 252p.
- PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C. *et al.* Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bostaurus*, *Bosindicus* and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, v.74, p.1349-1355, 2010.
- PRADO, F.R.A.; TONIOLLO, G.H.; OLIVEIRA, J.A. Superestimulação ovariana em vacas da raça Gir leiteiro com uso de diferentes concentrações de FSH. *Arq. Vet.*, v.23, p.172-177, 2007.
- ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A. *et al.* Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*, v.122, p.737-744, 2001.
- RUFINO JUNIOR, J.; OLIVEIRA, M.V.M.; CARVALHO, D.M.G. *et al.* Potencial produtivo de novilhas da raça "Pantaneira" alimentadas com feno de baixa qualidade. *Semina*, v.35, Supl.1, p.2605-2616, 2014.
- SILVA, I.J.O.; PANDORTH, H.; ACARARO JR., E. *et al.* Efeitos da climatização do curral de espera na produção de leite de vacas Holandesas. *Rev. Bras. Zootec.*, v.31, p.2036-2042, 2002.
- THOM, E.C. The discomfort index. *Weatherwise*, v.12, p.57-60, 1959.
- TORRES-JÚNIOR, J.D.S.; DE FA PIRES, M.; DE SA, W.F. *et al.* Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.69, p.155-166, 2008.
- VASCONCELOS, J.L.M.; DEMÉTRIO, D.G.B. Manejo reprodutivo de vacas sob estresse calórico. *Rev. Bras. Zootec.*, v.40, p.396-401, 2011.

Comunicação

[Communication]

Potencial leiteiro de animais da raça Pantaneira na região do Alto Pantanal do Mato Grosso do Sul

[Dairy potential of pantaneira breed upper region of pantanal of Mato Grosso Sul]

N.C.O. Brochado¹, M.S. Chiodi¹, M.B.S. Cáceres², U.G.P. Abreu³, D.F. Luz¹,
L.E. Salla¹, M.V.M. Oliveira¹

¹Universidade Estadual de Mato Grosso Sul - Aquidauana, MS

²Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR

³Embrapa Pantanal - Corumbá, MS

O Estado de Mato Grosso do Sul possui grande potencial para a produção leiteira em sistema de pastejo. Porém, a atividade ainda é incipiente: 70% do leite produzido são provenientes de rebanhos não especializados e conduzidos principalmente de maneira extensiva (Banco..., 2015).

Segundo Egito *et al.* (2002), a raça Pantaneira teve pequena interferência do homem e foi moldada pelas condições ambientais inóspitas do Pantanal, gerando animais altamente resistentes a temperaturas elevadas, condições de seca e alagamento intermitentes e aptos a sobreviver com pastagens de baixo nível nutricional e a precárias condições sanitárias. Todavia, hoje se encontram em vias da extinção, com menos de 500 indivíduos puros (Dani e Oliveira, 2013).

Nesse contexto, informações acerca da produção de leite da raça fazem-se necessárias, sobretudo no que diz respeito à curva de lactação e à persistência lactacional dela. Dessa forma, objetivou-se determinar a persistência lactacional e a composição físico-química do leite de vacas da raça Pantaneira.

O experimento foi desenvolvido no Núcleo de Conservação de Bovinos Pantaneiros de Aquidauana/MS (Nubopan), pertencente à Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) / Unidade Universitária de Aquidauana, região do Alto Pantanal Sul-Mato-Grossense. Foram utilizadas seis vacas da raça Pantaneira,

com 4,5 anos de idade, peso corpóreo médio de 419,52±3kg e, na segunda ordem de lactação, pesadas a cada 14 dias. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da UEMS (017/2013).

Os animais foram manejados em sistema de pastoreio rotacionado em capim-mombaça (*Panicum maximum*), suplementados individualmente com concentrado (3,8kg/dia), ofertado em duas porções equitativas, após as ordenhas, e água *ad libitum*.

Após o nascimento, os bezerros foram pesados, para a determinação do peso ao nascer. Os bezerros foram acondicionados nas proximidades dos piquetes em baias metálicas e teladas lateralmente, de modo a manterem o vínculo afetivo com a mãe, porém sem que pudessem ter acesso à glândula mamária. Além de água, esses animais também receberam livremente ração concentrada e capim fresco após 15 e 21 dias de idade, respectivamente.

A coleta de dados iniciou-se logo após o parto e durou até o encerramento natural da lactogênese. A mungidura foi realizada por meio de ordenhadeira mecânica, duas vezes por dia, às cinco e às 17 horas, sem a presença do bezerro, e a pesagem do leite foi efetuada diariamente. Para facilitar a ejeção do leite, foi realizada aplicação de 0,3mL de ocitocina na veia mamária, utilizando-se agulha hipodérmica com 2,5mm de diâmetro.

Recebido em 2 de fevereiro de 2017

Aceito em 29 de agosto de 2017

E-mail: nikolascaceres.zoo@gmail.com

Após a ordenha, os bezerros foram colocados com suas respectivas mães por um período equivalente a 30 minutos, para que pudessem consumir o leite residual, sendo o leite ingerido estimado por meio de pesagens do bezerro antes e após a amamentação. Posteriormente, os bezerros receberam uma suplementação com leite integral em mamadeira, a fim de suprir suas exigências.

A composição físico-química do leite foi aferida a cada 14 dias, sendo realizada análise pelo método da ultrassonografia (Brasil, 1981), determinando-se os teores de proteína, gordura, lactose, extrato seco desengordurado e pH. A avaliação de mastite subclínica, por meio do procedimento Califórnia Mastite Teste (CMT), foi realizada semanalmente, porém não foi observada a necessidade de tratamento em nenhum animal.

As curvas de lactação individuais foram inicialmente estimadas utilizando-se o parâmetro univariável e, em seguida, realizou-se uma análise de identidade de modelos de regressão linear com decomposição polinomial, conforme Regazzi (1996). Para as demais variáveis, foi realizada ANOVA, e, quando necessário, foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando programa estatístico R.

O peso médio ao nascimento dos bezerros pantaneiros foi de 27,3kg, sendo 25,0 e 29,6kg para fêmeas e machos, respectivamente, valores esses muito próximos aos encontrados por Biazolli (2014) (23,6kg) e por Santos *et al.* (2005) (26,0kg), que avaliaram vacas primíparas e multíparas, respectivamente, da raça Pantaneira.

Segundo o NRC (Nutrient..., 2001), a quantidade ideal de leite para suprir as exigências nutricionais dos bezerros lactentes nas primeiras semanas de vida é de 10% do peso corpóreo, assim, no caso dos animais pantaneiros, é cerca de 3,0kg de leite por dia.

O período lactacional das vacas Pantaneiras foi de 180 dias, ou seja, de seis meses, quando ocorreu o encerramento natural da lactogênese. Neste trabalho, observou-se que a produção de leite no terço inicial da lactação das vacas Pantaneiras foi suficiente para alimentar os bezerros e ainda permitir a comercialização do leite excedente (Tab. 1).

Provavelmente, o instinto de sobrevivência da raça Pantaneira seja a explicação para o menor tamanho ao nascimento do bezerro e, conseqüentemente, a menor persistência lactacional em relação às raças especializadas na produção de leite.

Tabela 1. Média da produção de leite diária, em kg dia⁻¹, e desvio-padrão das ordenhas matinal e vespertina e do leite ingerido pelos bezerros após a ordenha, nos períodos inicial (primeiro a 60º dia), intermediário (61 a 120º dia) e final (121 a 180º) da lactação

Período	Ordenha (kg dia ⁻¹)		Ingerido bezerro (kg dia ⁻¹)		Produção total (kg dia ⁻¹) *
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	
Inicial	3,56±1,00	2,24±0,58	1,10±0,30	0,91±0,22	7,81±2,10 a
Intermediário	3,44±1,05	1,76±0,80	0,32±0,12	0,27±0,10	5,79±2,07 b
Final	1,89±1,38	0,47±0,17	0,03±0,09	0,02±0,02	2,40±1,66 c
Média	2,96±1,14	1,49±0,52	0,48±0,17	0,40±0,11	5,34±1,94

*Letras minúsculas diferem entre si na mesma coluna (P<0,05), pelo teste de Tukey.

A produção média de leite, em 180 dias, das vacas Pantaneiras foi de 5,34kg/animal/dia (Tab. 1). Ajustando-se a produção de leite dessas vacas para 150 dias, verifica-se uma produtividade média de 6,40kg/animal/dia, sendo esse valor semelhante aos resultados encontrados por Biazolli (2014) e Lopes (2014), que encontraram, em 150 dias de lactação, uma produtividade média de 6,27kg/animal/dia e 6,82kg/animal/dia, respectivamente, para vacas Pantaneiras

primíparas. Nesse sentido, infere-se que não houve uma evolução na lactopoeise desses animais, Isso porque Biazolli (2014) e Lopes (2014) utilizaram os mesmos animais, ainda novilhas, e os animais utilizados neste ensaio eram de segunda cria. Ressalta-se que, ao se corrigir a produção de leite para 3,5% gordura, conforme sugerido por Evans *et al.* (1993), verifica-se uma produtividade média, em 180 dias de lactação, de 6,44kg/animal/dia.

Ao se ajustar a produção de leite diária para 305 dias, verifica-se, portanto, uma produção líquida de 977,4 e 1.166,4kg ou 3,21 e 3,82kgdia⁻¹, respectivamente. Nesse sentido, a produção de leite do gado Pantaneiro está muito aquém dos níveis de produção desejáveis em rebanhos especializados em produção de leite, como do gado Holandês, de 7.570kg ano⁻¹, ou do gado Jersey, de 4.670kg ano⁻¹, ou ainda da raça Girolando, de 3.790kg ano⁻¹. Todavia, foi similar à produção do rebanho leiteiro do estado de Mato Grosso do Sul, da ordem de 984,1kgdia⁻¹ano⁻¹ e uma produtividade média das vacas de 3,2kgdia⁻¹ (Banco..., 2015).

Nesse contexto, a raça Pantaneira pode ser uma opção interessante, especialmente

nos assentamentos rurais, nas comunidades quilombolas e nas aldeias indígenas. Os dados do último Censo Agropecuário corroboram esse fato, tendo em vista que, no Mato Grosso do Sul, mais de 70% das propriedades rurais que trabalham com leite como atividade principal são de origem familiar, possuem até 50 hectares, e 52% produzem até 50 litros de leite por dia (Banco..., 2015).

Infere-se que, nos primeiros 60 dias da lactação, as vacas produziram, em média, 7,81kg animal⁻¹dia⁻¹. Nessa fase, houve um aumento contínuo da produção de leite e foi também o período em que os animais atingiram o pico de lactação, do 51º ao 60º dia, com média de 11,3kg de leite (Fig. 1).

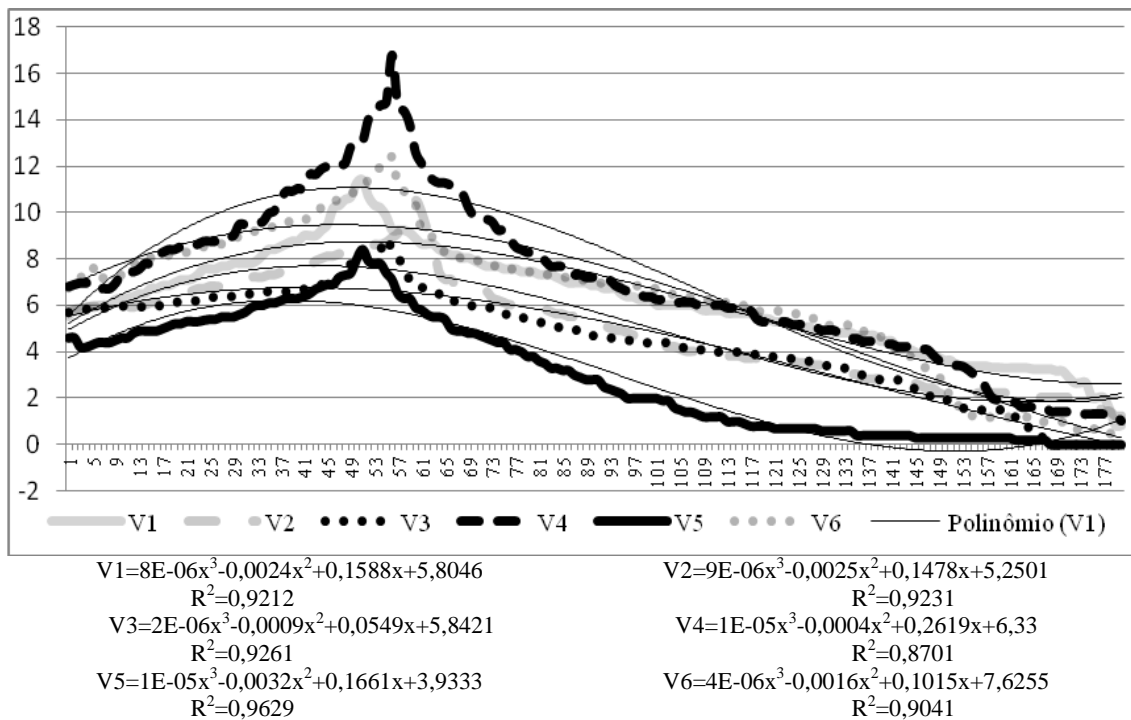


Figura 1. Curva de produção de leite de vacas Pantaneiras, período lactacional com 180 dias de duração, com as equações de regressão, com o eixo “X” indicando a produção de leite diária (kg dia⁻¹) e o eixo “Y” os dias de lactação.

No período intermediário, entre o 61º e o 120º dia de lactação, iniciou-se um declínio natural da produção de leite, mantendo-se essa diminuição constante (Fig. 1). Nesse período, as vacas produziram, em média, 5,79kg leite⁻¹dia⁻¹, o que representou uma diminuição de 25,8% em relação ao terço inicial (primeiro ao 60º dia).

Nesse período intermediário, a vaca com melhor potencial leiteiro iniciou a fase produzindo 12,12kg dia⁻¹ e terminou com 5,28kg dia⁻¹, sendo esses valores 52,1 e 84,8% superiores à vaca menos produtiva.

O último período lactacional, representado pelo intervalo entre o 121° e o 180° dia de lactação, apresentou uma produção média de 2,41kg animal⁻¹dia⁻¹, sendo observado um declínio linear contínuo na produção de leite, com uma queda mais acentuada nos últimos 20 dias da lactação (Fig. 1). Nesse período, o leite produzido representou uma queda de 58,3% em relação ao terço intermediário (61° ao 120° dia) e representava 30,9% da produção do terço inicial (primeiro ao 60° dia).

Verifica-se, assim, que houve uma ampla variação entre as vacas, com o animal mais leiteiro produzindo 1.256,5 litro durante toda a lactação, sendo esse valor 56,7% superior ao leite produzido pela vaca menos produtiva.

Haja vista que esta é a primeira vez que a produção de leite, de vacas de segunda ordem de lactação, é aferida de maneira científica e que,

até o momento, dentro do rebanho de bovinos Pantaneiros, não há linhagens selecionadas para a produção de leite. Os resultados obtidos neste ensaio são de grande importância técnica, pois auxiliarão na identificação das vacas mais produtivas e com maior aptidão leiteira, facilitando os programas de seleção e melhoramento genético (Rebouças *et al.*, 2008) e a própria conservação da espécie (Lopes, 2014).

A ampla diversidade na produção de leite observada neste trabalho pode ser ainda correlacionada com o tamanho dos animais (Tab. 2). Nesse sentido, os animais com peso corpóreo superior também mostraram maior aptidão leiteira. Esse efeito define a relação de maior capacidade torácica-abdominal, maior potencial para ingestão de alimentos e maior eficiência na conversão dos nutrientes absorvidos em leite. Resultados semelhantes foram também observados por Lopes (2014) e Biazolli (2014).

Tabela 2. Peso corpóreo das vacas nos terços inicial, intermediário e final da lactação e produção de leite máxima e mínima

Período	Animais					
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Inicial – kg	428,3	369,8	377,6	415,4	377,0	459,8
Intermediário – kg	437,1	400,4	386,0	417,6	383,7	460,2
Final – kg	451,3	402,6	406,3	441,5	400,6	504,0
Peso médio – kg	438,9	390,9	389,9	422,7	387,1	474,7
Produção leite:mínima/máxima	2,6/11,4	1,2/10,5	1,6/8,9	1,0/16,8	0,2/8,4	0,7/12,3

A composição físico-química do leite de vacas da raça Pantaneira indica teores médios de 5,30% de gordura, 3,71% de proteína, 6,04% de lactose e 10,68% de extrato seco desengordurado (Tab. 3). Não houve diferença na composição físico-química do leite entre os períodos de produção de leite ($P>0,05$). Esses valores, com

exceção da gordura, são próximos aos relatados por Lopes (2014), de 4,20, 3,79, 6,23 e 10,81%, respectivamente, e por Biazolli (2014), de 4,26, 3,82, 6,23 e 10,84%, respectivamente, que trabalharam com vacas primíparas da raça Pantaneira.

Tabela 3. Componentes físico-químicos do leite nos períodos inicial (primeiro ao 60° dia), intermediário (61° ao 120° dia) e final (121° ao 180°) da lactação

Período	Gordura%	Proteína %	ESD ¹ %	Lactose %	pH
Inicial	5,20±0,89	3,78±0,26	10,87±0,68	6,16±0,38	6,90±0,17
Intermediário	5,82±0,84	3,69±0,15	10,52±0,48	5,93±0,34	6,81±0,53
Final	5,14±0,85	3,75±0,15	10,69±0,44	6,04±0,32	6,98±0,06
Média	5,37±0,86	3,73±0,18	10,68±0,53	6,05±0,35	6,89±0,25

¹ESD: extrato seco desengordurado; *Não houve diferenças significativas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Provavelmente, o maior teor de gordura no leite dos animais do presente estudo foi devido à característica da raça. Além disso, sabe-se que a quantidade de leite produzida e sua composição

físico-química são inversamente proporcionais; diante disso, a menor produção de leite dos animais da raça Pantaneira pode ter influenciado na melhora da composição físico-química

quando essa raça foi comparada com outras raças especializadas para a produção de leite.

A lactação das vacas em segunda ordem de parto encerrou-se naturalmente aos 180 dias, e o pico de produção de leite foi atingido entre o 51º e o

60º dia. Não houve diferença na composição físico-química do leite nos diferentes períodos da lactação.

Palavras-chave: bovinos naturalizados, conservação, curva de lactação, persistência lactacional

ABSTRACT

*The Pantaneira breed is in danger of extinction. Due to the lack of scientific information on the Pantanal milk potential, this work had the objective of determining the lactation period and a physical-chemical composition of the milk of cows in second order of parturition. The animals were managed in a pasture system rotated in mombaça grass (*Panicum maximum*) and individually supplemented with concentrate. The milking was performed mechanically twice a day and the milk weighed daily. The physical-chemical characteristics of the milk were evaluated by the ultrasound method and the lactation curves were estimated using the univariate parameter. The average milk yield was 5.34kg/milk/day and the fat, protein, lactose and total non-fat solids contents were 5.3, 3.7, 6.0 and 10.7%, respectively. Lactation of the cows in second order of calving ended naturally at 180 days and the peak of milk production was reached between 51 and 60 days. Furthermore, there was no difference in milk composition in the different lactation periods.*

Keywords: cattle naturalized, conservation, lactation curve, lactation persistence

AGRADECIMENTOS

À Capes, ao CNPq, à Fundect/MS, ao MCT, ao MEC, ao CPP, à Rede Pró-Centro-Oeste e à Fazenda Campanário.

REFERÊNCIAS

BANCO de dados agregados. [Rio de Janeiro]: IBGE, 2015. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acessado em: 10 de abr. 2015.

BLAZOLLI, W. *Potencial leiteiro de vacas primíparas da raça Pantaneira mantidas em regime de pastejo com diferentes níveis de concentrado*. 2014. 80f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal da Grande Dourados, MS.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para controle de produção de origem animal e seus ingredientes. Brasília: LANARA, 1981.

DANI, S.U.; OLIVEIRA, M.V.M. Cattle, cheese and conservation. *Nature*, v.502, p.448, 2013.

EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Arch. Zootec.*, v.51, p.39-52, 2002.

EVANS, E.H.; YORSTON, S.A.; BINNENDYK, D.V. Numerous factors affect milk protein percentage. *Feedstuffs*, v.65, p.14-21, 1993.

LOPES, R.T. *Potencial leiteiro de vacas primíparas da raça Pantaneira mantidas em regime de confinamento e alimentadas com diferentes níveis de concentrado*. 2014. 56f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, MS.

NUTRIENT requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington: National Academy of Sciences, 2001. 381p.

REBOUÇAS, G.F.; GONÇALVES, T.M.; MARTINEZ, M.L. Novas funções para estimar a produção de leite, em 305 dias de lactação, de vacas da raça Gir. *Rev. Bras. Zootec.*, v.37, p.1222-1229, 2008.

REGAZZI, A.J. Teste para verificar a identidade de modelos de regressão. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.31, p.1-17, 1996.

SANTOS, S.A.; SILVA, R.A.M.S.; COMASTRI FILHO, J.A. *et al.* Desempenho de bezerros Pantaneiros, Nelore e cruzados criados no Pantanal, Brasil. *Arch. Zootec.*, v.54, p.206-207, 2005.



Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictor of antral follicle population in heifers

Christopher Júnior Tavares Cardoso¹, Jair Sábio de Oliveira Junior², Henrique Kischel³, Wilian Aparecido Leite da Silva³, Elielton Dias da Silva Arruda³, Mirela Brochado Souza-Cáceres⁴, Fernanda Amarante Mendes de Oliveira⁵, Ériklis Nogueira⁶, Guilherme de Paula Nogueira⁷, Fabiana de Andrade Melo-Sterza^{1,3,8}

¹Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.

²Veterinary Medicine, Biomedical Sciences Faculty of Cacoal, Cacoal, RO, Brazil.

³Laboratory of Animal Reproduction Biotechnologies, State University of Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brazil.

⁴State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

⁵Federal Institute of Education, Science and Technology of Amazonas, Tabatinga, AM, Brazil.

⁶Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brazil.

⁷State University of São Paulo, Araçatuba, SP, Brazil.

Abstract

Antral follicular population (AFP) and anti-Müllerian hormone (AMH) concentration are strongly associated. Thus, analyzing AMH concentration is a reliable method to predict animals with high AFP, an important feature to select donor cows for embryos and oocytes. However, not much is known about this parameter in heifers, particularly in crossbred animals. The aim of this study was to assess AFP in heifers and cows and its relation to serum AMH levels. *Bos taurus indicus* cows (36–60-months-old; n = 30) and heifers (12–14-months-old; n = 17) of the same breed were evaluated. A single procedure of follicular counting was performed by ultrasound for each animal. Random sampling was performed to analyze serum AMH concentration. Cows showed higher AFP than heifers; nonetheless, plasma AMH concentration did not differ between the categories. A high correlation of AFP with plasma AMH concentration was observed in Girolando heifers. Thus, it is suggested that AMH concentration could be a reliable and less invasive method for selecting heifers with high AFP.

Keywords: bovine, follicles, selection donors.

Introduction

Taking advantage of the rusticity of the Gir breed and the dairy productivity of the Holstein breed, Girolando cows are currently the main breed for milk production in Brazil, comprising around 80% of the dairy cattle in the country (Borges *et al.*, 2012). To improve dairy production, selection of females with high productivity, better reproductive efficiency, and/or better competence to respond to reproduction biotechnologies is essential.

The first calving age is approximately 35 months for $\frac{3}{4}$ Holstein \times $\frac{1}{4}$ Gir cows, (Silva *et al.*, 2014), however a high variability among herds (lineages) has been observed. Taking that into account, strategies are needed to reduce the age for first calving and to select animals with higher genetic potential to attain the desired traits.

Phenotypic traits linked to infertility are associated with low ovarian antral follicle population

(AFP) in *B. taurus* (Ireland *et al.*, 2011). Nevertheless, the relationship between AFP and fertility has not been observed in *B. indicus* (Nellore) and crossbred beef cows (Baruselli *et al.*, 2015; Morotti *et al.*, 2015; Silva-Santos *et al.*, 2014a). The number of recruited follicles in each follicular wave is highly variable between individuals; however, a high level of individual repeatability is observed (Evans *et al.*, 2010; Oliveira Junior *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2014; Gobikrushanth *et al.*, 2017). High correlation of AFP with *in vivo* and *in vitro* embryo production may be used as an auxiliary tool to select donor cows for embryos and oocytes (Silva-Santos *et al.*, 2014a; Baruselli *et al.*, 2015; Ghanem *et al.*, 2016).

AFP is positively correlated with anti-Müllerian hormone (AMH) (Baldighi *et al.*, 2014; Guerreiro *et al.*, 2014). The glycoprotein AMH, which belongs to the transforming growth factor (TGF)- β family, is only expressed in the gonads (Cate *et al.*, 1986) and is correlated to ovarian follicular development (Visser *et al.*, 2007). AMH expression is observed in granulosa cells of growing preantral and antral follicles (Rico *et al.*, 2011), and it is described as a premature modulator of follicular growth by controlling premature depletion of the follicular reserve in ovaries (Monniaux *et al.*, 2012; Durlinger *et al.*, 2002). Intrafollicular AMH expression increases until the size of the follicle is 5 mm in cows (Rico *et al.*, 2011) and 4 mm in humans (Weenen *et al.*, 2004) and then starts decreasing in larger antral follicles (Monniaux *et al.*, 2008).

Furthermore, the positive association between AMH and total number of follicles has been described in the ovaries of mice (Durlinger *et al.*, 2002), women (Fanchin *et al.*, 2003), and bovines (*B. taurus* and *B. indicus*) (Guerreiro *et al.*, 2014).

In cows, *B. indicus* is superior to *B. taurus* in terms of AFP and plasma AMH concentration (Batista *et al.*, 2014). Considering the strong association between AFP and plasma AMH concentration, analyzing AMH concentration is a reliable method to predict AFP (Ireland *et al.*, 2011; Rico *et al.*, 2011).

Plasma AMH concentration and ovarian follicular population in heifers has been studied in Nellore and Holstein pubertal heifers (Batista *et al.*, 2014), but not much is known about crossbred prepubertal dairy cattle. Understanding the correlation

⁸Corresponding author: fabiana.sterza@gmail.com

Received: August 1, 2016

Accepted: January 18, 2018



between plasma AMH concentration and AFP in heifers can validate a methodology for premature selection of heifers with high AFP.

Thus, the aim of this study was to evaluate the correlation between serum AMH plasma and AFP in crossbred dairy heifers and cows.

Material and methods

Animals and Experimental Design

The study was performed at the State University of Mato Grosso do Sul. Animals from three different herds were used. Girolando breed cows ($\frac{3}{4}$ *B. taurus* × $\frac{1}{4}$ *B. indicus*), 36–60-months-old ($n = 30$), and heifers, 12–14-months-old ($n = 17$), were used. None of the heifers exhibited corpus luteum or ovarian follicles above 8 mm at the time of ultrasonography analyses, indicating a high probability of being pre-pubertal. All animals showed a body score condition that ranged from 2.5 to 3.5 (on a scale of 1–5) (Houghton *et al.*, 1990) and were maintained in a grazing system with *ad libitum* access to water and minerals. They were neither pregnant nor lactating. All procedures were approved by the Committee of Ethic and Animal Use of the State University of Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS (Protocol CEUA-UEMS 021-2013).

Ultrasonographic evaluations

A single procedure of follicular counting was performed for each experimental animal. Transvaginal ultrasonography was performed using ultrasound equipment attached to a 7.5-MHz micro-convex transducer (Aquila[®], Pie Medical, Maastricht, The Netherlands). Before each procedure, feces were removed from the rectum and the perianal area was washed using tap water. Follicles of ≥ 3 mm in diameter in both ovaries were counted to characterize AFP. In order to count the follicles, the operator promoted a slow rotation of about 180° to make sure all follicles were counted at once. Immediately after counting with the help of a “cineloop” (an instrument of the ultrasound that records images in few seconds), AFP was checked. The same individual performed the counting procedure

in all animals.

Blood collection and hormonal analysis

Of the 47 evaluated animals, serum samples from 11 cows and seven heifers were subjected to the AMH quantification. Blood samples were collected by the venipuncture flow method on the day of AFP counting, were immediately placed in an icebox, and then RT centrifuged at 3000 rpm for 10 min to allow separation of the serum. After that, samples were frozen at -20°C until further analysis. Plasma AMH concentration was assessed using a kit for bovine AMH (ELISA AL-114, Ansh Labs, Webster, TX, USA), and the concentration was expressed as ng/mL. The inter-assay coefficient of variation ranged from 0.28 to 3.15. All assays were performed at the Animal Endocrinology Laboratory of the Paulista State University (UNESP), Araçatuba, SP.

Statistical Analyses

All data were assessed using the Statistical Analysis System (SAS), version 9.3 and were represented as means \pm SD (standard deviation), except for correlation. Follicular population was analyzed using the PROC MIXED option, and Pearson’s correlation was determined using the PROC CORR option of SAS 9.3. The data were assessed according to the number of follicles, and AMH quantification was performed to determine its effect in the animal category. For all analyses, $P \leq 0.05$ was considered as significant.

Results

The number of antral ovarian follicles observed through transvaginal ultrasonography was higher in cows ($P < 0.05$) than that in heifers. AFP ranged from 5 to 70 follicles in cows and from 10 to 31 follicles in heifers. However, plasma AMH concentration did not vary ($P = 0.19$) between the categories (Table 1).

A high correlation between AFP and AMH concentration ($r = 0.87$; $P = 0.0102$) was observed in heifers; however, this correlation was not observed in cows ($r = 0.48$; $P = 0.1351$; Figure 1).

Table 1. Number of follicles greater than 3 mm and plasma AMH concentration in Girolando cows and heifers (Means \pm SD)

	Cows (n)	Heifers (n)	Value P*
Number of follicles	25,93 \pm 12,6 (30)	19,23 \pm 5,34 (17)	0,05
AMH (ng/mL)	0,34 \pm 0,17 (11)	0,59 \pm 0,4 (7)	0,19

*Significant values at $P \leq 0.05$.

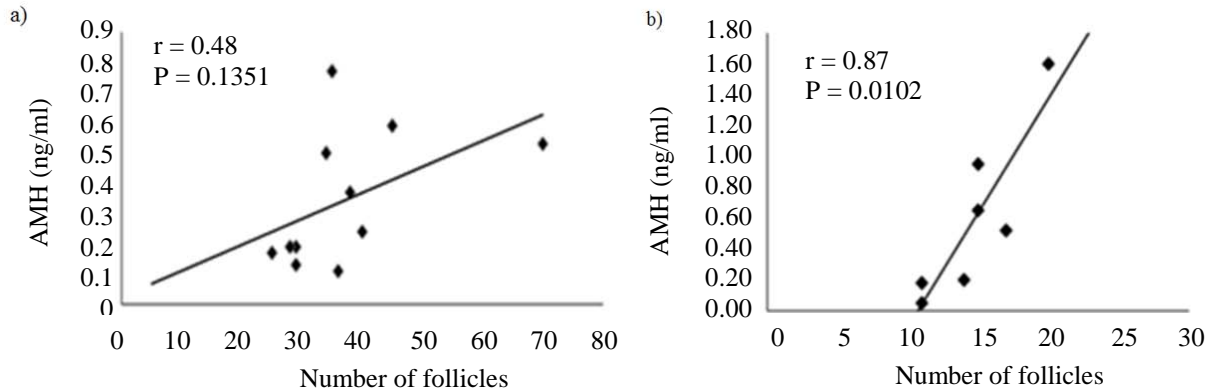


Figure 1. Correlation of plasma AMH concentration and antral follicle ovarian population of cows (A) and Girolando heifers (B).

Discussion

The present study showed a remarkable difference in AFP between heifers and cows. Nonetheless, no difference was observed in plasma AMH concentration between both categories of Girolando breed.

AMH is an excellent endocrine marker of small antral follicle, which is the direct target of ovarian stimulatory treatments. Plasma AMH concentration before superovulation varies among animals and is positively correlated to the number of ovulations and transferable embryos produced (Monniaux *et al.*, 2010; Rico *et al.*, 2009).

Animals with higher AFP have an increased probability to produce higher numbers of *in vitro* embryos (Silva-Santos *et al.*, 2014b), thereby propelling the application of this information as a selection trait. Furthermore, high variability in AFP among individuals (Silva-Santos *et al.*, 2014b) and among distinct bovine breeds has been well-documented (Rodrigues *et al.*, 2015; Oliveira Junior *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2014; Guerreiro *et al.*, 2014; Rico *et al.*, 2011), indicating that AFP is an important trait for animal selection.

In crossbred beef cows and heifers, AFP is correlated to birth weight and age; an increase in AFP is observed until five years of age, after which AFP decreases (Cushman *et al.*, 2009). In consonance with these data, the present study attained higher AFP in cows than that in heifers of the same breed. However, some previous results do not conform to this observation and did not observe any variation in AFP between young and adult Braford heifers (Silva-Santos *et al.*, 2014b). This divergence between breeds may be due to variations within the individuals of different breeds, lineages, or selective pressure applied in a particular herd.

High plasma AMH concentration is positively associated with the total number of follicles in the ovaries of mice (Durlinger *et al.*, 2002) women (Fanchin *et al.*, 2003), and bovines (Batista *et al.*, 2014). Superior AFP (Holstein cows, 25 follicles; Nellore, 47 follicles) and plasma AMH concentration (Holstein cows, 0.3 ng/mL; Nellore, 0.97 ng/mL) have been observed in zebu heifers compared to those in taurine

heifers (Batista *et al.*, 2014). Moreover, higher plasma AMH concentration in Nellore cows (2.3 ng/mL) compared to that in Holstein (0.4 ng/mL) has been observed (Guerreiro *et al.*, 2014). In the present study, plasma AMH concentration was 0.34 ± 0.17 ng/mL, which is close to that observed for taurine breed.

It is important to note that the animals used in this assay were crossbreeds ($\frac{3}{4}$ *B. taurus* \times $\frac{1}{4}$ *B. indicus*); thus, it will be necessary to verify whether the trait increases based on the crossing performed.

Several studies in women (Fanchin *et al.*, 2003) and bovines (Guerreiro *et al.*, 2014) demonstrated no variation in plasma AMH concentration across the lifespan, particularly between young and adult individuals.

Increasing reproductive biotechnological methods have been performed in young heifers. Recently, Ovum Pick-Up (OPU) has been performed in Holstein calves (Bayeux *et al.*, 2016). Despite the difficulty in performing ultrasound examinations in young heifers and considering animal welfare, our results stated that a single plasma AMH analysis could help in selecting heifers with higher AFP that would probably better respond to OPU. The cost of AMH quantification is still the largest limitation of this technique; however, an increased demand could change this situation.

In conclusion, Girolando ($\frac{3}{4}$ Holstein \times $\frac{1}{4}$ Gir) cows (24–60-months-old) have higher AFP than heifers (12–14-months-old); however, plasma AMH concentration did not differ between the categories. High correlation of AFP and plasma AMH concentration was observed in Girolando heifers. Thus, it is suggested that AMH quantification can predict AFP in Girolando heifers.

Acknowledgements

The authors would like to thank the staff at Aquidauana Campus –UEMS (Aquidauana-MS) for allowing the use of their animals and facilities during this study. The authors are also grateful to the Animal Endocrinology Laboratory of the Paulista State University (UNESP), Araçatuba, São Paulo for performing AMH assays. This research was supported by CAPES, CNPq and Fundect.



References

- Baldrighi J, Sa Filho MF, Batista EO, Lopes RN, Visintin JA, Baruselli PS, Assumpcao ME.** 2014: Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Domest Anim*, 49:1015-1020.
- Baruselli OS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH.** 2015. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Anim Reprod*, 12:487-497.
- Batista EO, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MD, Sa Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RN, Renno FP, Baruselli PS.** 2014. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod Domest Anim*, 49:448-452.
- Bayeux BM, Carvalho LM, Watanabe YF, Mingoti RD, Oliveira AdS, Chiba MO, Azrak AJ, Castro PMdN, Souza AH, Baruselli PS.** 2016. Efeito da categoria (pré-púberes, púberes e prenhes) na produção *in vitro* de embriões de novilhas da raça holandesa [in portuguese]. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 25 a 27 de agosto, 2016, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: Paraná, Brasil, p.256. Abstract.
- Borges CRA, Azevedo M, Lima IA, Brasil LHA, Ferreira MA.** 2012. Heterogeneous genetic cows of three genetic groups in feedlot system in the state of Pernambuco, Brazil. *Acta Sci Anim Sci*, 34:91-96.
- Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, Fisher RA, Bertonis JM, Torres G, Wallner BP, Ramachandran KL, Ragin RC, Manganaro TF, Maclaughlin DT, Donahoe PK.** 1986. Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human-Gene in Animal-Cells. *Cell*, 45:685-698.
- Cushman RA, Allan MF, Kuehn LA, Snelling WM, Cupp AS, Freetly HC.** 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J Anim Sci*, 87:1971-1980.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP.** 2002. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143:1076-1084.
- Evans AC, Mossa F, Fair T, Lonergan P, Butler ST, Zielak-Steciwo AE, Smith GW, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Ireland JJ.** 2010. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 67:421-429.
- Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J.** 2003. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod*, 18:323-327.
- Ghanem N, Jin JJ, Kim SS, Choi BH, Lee KL, Ha AN, Song SH, Kong IK.** 2016. The Anti-Mullerian Hormone Profile is Linked with the *In Vitro* Embryo Production Capacity and Embryo Viability after Transfer but Cannot Predict Pregnancy Outcome. *Reprod Domest Anim*, 51:301-310.
- Gobikrushanth M, Dutra PA, Bruinje TC, Colazo MG, Butler ST, Ambrose DJ.** 2017. Repeatability of antral follicle counts and anti-Mullerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology*, 92:90-94.
- Guerreiro BM, Batista EO, Vieira LM, Sa Filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, Silveira CR, Bayeux BM, Dias EA, Monteiro FM, Accorsi M, Lopes RN, Baruselli PS.** 2014. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest Anim Eendocrinol*, 49:96-104.
- Houghton P, Lemenager R, Hendrix K, Moss G, Stewart T.** 1990. Effects of body composition, pre-and postpartum energy intake and stage of production of energy utilization by beef cows. *J Anim Sci*, 68:1447-1456.
- Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Mossa F, Lonergan P, Evans AC.** 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 23:1-14.
- Monniaux D, Clemente N, Touze JL, Belville C, Rico C, Bontoux M, Picard JY, Fabre S.** 2008. Intrafollicular steroids and anti-mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod*, 79:387-396.
- Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touze J. L, Sapa J, Phocas F, Dupont J, Dalbies-Tran R, Fabre S.** 2012. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. *Reprod Fertil Dev*, 25:1-16.
- Monniaux D, Rico C, Larroque H, Dalbies-Tran R, Medigue C, Clement F, Fabre S.** 2010. Anti-Mullerian hormone, an endocrine predictor of the response to ovarian stimulation in the bovine species. *Gynecol Obstet Fertil*, 38:465-470.
- Morotti F, Barreiros TRR, Machado FZ, Gonzylez SM, Marinho LSR, Seneda MM.** 2015. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle? *Anim Reprod*, 12:479-486.
- Oliveira Junior JS, Cardoso CJT, Silva WAL, Kischel H, Souza MB, Andrade ER, Nogueira E, Silva-Santos KC, Seneda MM, de Andrade Melo-Sterza F.** 2015. Antral follicles population in heifers and cows of Nelore and Girolando breeds. *Semina: Ciênc Agrár*, 36:3741-3750.
- Rico C, Fabre S, Medigue C, di Clemente N, Clement F, Bontoux M, Touze JL, Dupont M, Briant E, Remy B, Beckers JF, Monniaux D.** 2009. Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod*, 80:50-59.
- Rico C, Medigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M,**



- Clement F, Monniaux D.** 2011. Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol Reprod*, 84:560-571.
- Rodrigues AS, Oliveira SN, Loiola MVG, Ferraz PA, Chalhoub M, Bittencourt RF, Araujo EAB, Bittencourt TCBdS, Ribeiro Filho AL.** 2015. Antral follicle count in Nelore females subjected to fixed-time artificial insemination. *Ciênc Rural*, 45:711-717.
- Silva-Santos KC, Santos GM, Koetz Junior C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, Urbano MR, Oliveira RL, Lima DC, Seneda MM.** 2014a: Antral follicle populations and embryo production-*in vitro* and *in vivo*-of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reprod Domest Anim*, 49:228-232.
- Silva-Santos KC, Siloto LS, Santos GM, Morotti F, Marcantonio TN, Seneda MM.** 2014b. Comparison of antral and preantral ovarian follicle populations between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* cows with high or low antral follicles counts. *Reprod Domest Anim*, 49:48-51.
- Silva MVGB, Martins MF, Paiva LC, Cembranelli MAR, Arbex WA, Santos KCL.** 2014. Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando Avaliação Genética de Vacas [in portuguese]. Documentos 173 - Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.
- Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH, Themmen AP.** 2007. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Mullerian hormone null mice. *Endocrinology*, 148:2301-2308.
- Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP.** 2004. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*, 10:77-83.
-