

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária da UFMG
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Luciano de Rezende Carvalheira

**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS EXPOSTOS AO
CHOQUE TÉRMICO E AO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA 2**

Belo Horizonte

2019

Luciano de Rezende Carvalheira

**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS EXPOSTOS AO
CHOQUE TÉRMICO E AO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA 2**

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito Parcial para Obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal
Professor Orientador: Álan Maia Borges
Co-orientadores:

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Dr. Bruno Campos de Carvalho

Belo Horizonte

2019

C331d Carvalheira, Luciano de Rezende, 1989.
Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos expostos ao choque térmico e ao Fator Estimulador de Colônia 2 / Luciano de Rezende Carvalheira – 2019.

105p.: il.

Orientador: Àlan Maia Borges
Coorientadores: Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Bruno Campos de Carvalho

Tese de Doutorado apresentada a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Bovino – Embrião - Teses - 2- Bovino – Reprodução – Teses – 3 – Reprodução animal- Teses
I - Borges, Àlan Maia – II – Camargo, Luiz Sérgio de Almeida – III – Carvalho, Bruno Campos de
IV – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V- Título.

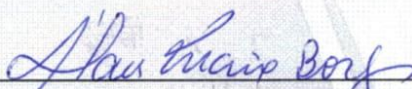
CDD – 636.08926

FOLHA DE APROVAÇÃO

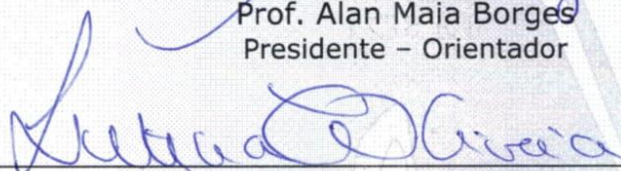
LUCIANO DE REZENDE CARVALHEIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em REPRODUÇÃO ANIMAL.

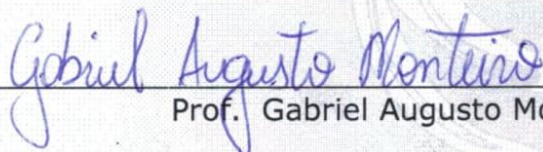
Aprovada em 19 de dezembro de 2019 , pela banca constituída pelos membros:



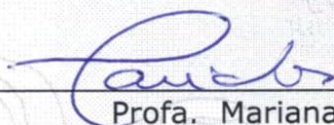
Prof. Alan Maia Borges
Presidente - Orientador



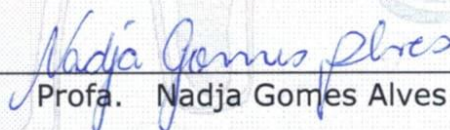
Profa. Letícia Zoccolaro Oliveira



Prof. Gabriel Augusto Monteiro



Profa. Mariana Machado Neves



Profa. Nadja Gomes Alves

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter estado ao meu lado durante todo o percurso e ter permitido a conclusão deste trabalho;

A meus pais Maria Ozinete Nascimento Carvalheira e Paulo Luiz Carvalheira e minha irmã Maria Luiza Nascimento Carvalheira, por serem meu porto seguro, minha base;

Às grandes amigas que a vida acadêmica me deu, Gabriela Leal e Lilian Ribeiro que, mesmo à distância sempre se fizeram presentes nas adversidades dos projetos científicos e da vida pessoal;

Aos amigos da república ACS e da equipe FunTáticos Athos Carlos Silva, João Paulo Moreira, Sávia Rosemarque, Abel Reis e Daina Brandão, pelo apoio e momentos de diversão. A Urbano Ribeiro e Guilherme Carvalho, pela amizade e convivência diária em meu novo lar em Belo Horizonte;

À psicóloga Adriadne, que com sua brilhante competência e profissionalismo me ajudou a manter a estabilidade mental durante os altos e baixos desta caminhada;

Ao meu orientador Prof. Dr. Alan Maia Borges, por me receber na UFMG e me orientar ao longo do doutorado. Aos amigos do laboratório de produção *in vitro* embriões da UFMG Ana Carolina Leite, Victor Mutti, Philipe Pimenta, Eliane Magalhães Silva e Rita de Cássia e Aline, pela parceria e empenho para realização das rotinas no laboratório. Também, aos amigos Verónica Becerra e Adolfo Perez, pela amizade além das salas de aula e atividade de trabalho;

Ao Prof. Raphael Rocha Wenceslau, pela paciência e dedicação com a análise do banco de dados obtidos na Embrapa, que foi fundamental para a elaboração de um dos capítulos desta tese;

Ao pesquisador Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pela parceria com Embrapa Gado de Leite que resultou em parte deste trabalho. Agradecimentos especiais aos integrantes do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite e amigos Eliza Diniz, Gustavo Torres, Rhaisa Dias, Jéssica Fernanda Souza, Lilian Ribeiro, Vivian Mendes e Diana Lemos, pela ajuda em tantos momentos;

Ao Médico Veterinário pesquisador da Pesagro-RJ, Agostinho Camargo, por ter me ensinado a técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia em bovinos;

Ao Dr. Peter Hansen, por ter me aceitado como aluno visitante em seu laboratório na University of Florida, pela orientação, empenho e por ter fornecido toda a estrutura necessária para que em apenas seis meses pudesse realizar um dos experimentos que compõe e engrandece esta tese. A toda equipe do Laboratório do Dr. Peter Hansen, pela amizade, apoio na condução do experimento, e intensa troca de experiências durante o período que pertenci a equipe;

Ao Firgorífico Frigobet, por gentilmente seder os ovários utilizados em um dos trabalhos desenvolvidos nesta tese. Agradecimentos especiais à funcionária Eliza, quem muito me ajudou nas coletas;

À Escola de Veterinária da UFMG e ao programa de pós-graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de concluir esta importante fase da minha formação nesta instituição. Agradecimentos especiais a todos professores do setor de Reprodução Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, por não medirem esforços em compartilhar seus conhecimentos e estimular em nós, pós-graduandos, o constante desejo de aprender;

À CAPES, pela bolsa de doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior;

A todos aqueles que estiveram comigo em algum momento desta caminhada e que por ventura não foram citados;

Muito obrigado!

Resumo

A interação com o ambiente pode modular o desenvolvimento embrionário, interferindo na sua competência em desenvolver e estabelecer uma gestação. Embriocinas produzidas pelo endométrio podem favorecer o desenvolvimento embrionário, enquanto que o aumento na temperatura pode comprometer sua viabilidade. Objetivou-se avaliar a resposta embrionária à presença da embriocina Fator Estimulador de Colônia 2 (CSF2) secretada no ambiente uterino, e responsável por modular o desenvolvimento embrionário; e o estresse térmico pelo calor, indutor de estresse celular no embrião. Devido ao impacto do aumento da temperatura corporal em condições de estresse térmico pelo calor na concepção em vacas leiteiras, também avaliou-se a variação da temperatura vaginal em vacas Girolando no verão. No primeiro capítulo estudou-se a variação da temperatura vaginal em vacas de três grupos genéticos do cruzamento Girolando, mantidas sob condições de pastejo durante a época de verão. A temperatura vaginal apresentou aumento linear estimado de 0,05 °C para o aumento de cada unidade do índice de temperatura e umidade (ITU; $P < 0,001$). Mestiças 1/2 Holandês (H) apresentaram menor variação de temperatura ao longo de 24h em relação às vacas com 3/4 e 7/8 H ($P < 0,001$). Concluiu-se que o trofotoderma de blastocistos pode sofrer modificações epigenéticas pelo sexo do embrião e herança paterna, por meio de modificações em marcações de histonas. O choque térmico entre os dias 2,5 e 3 do desenvolvimento não afetou o desenvolvimento embrionário, mas reduziu a qualidade do embrião. A proporção de genética Holandês a partir de 3/4 H reduziu a resistência de vacas Girolando ao estresse térmico pelo calor. No segundo capítulo avaliou-se a ação da embriocina CSF2 na competência de desenvolvimento e qualidade de embriões previamente estressados pelo choque térmico entre os dias 2,5 e 3 do cultivo embrionário *in vitro*. Não houve efeito do choque térmico e do CSF2 no desenvolvimento embrionário e no número de células do embrião. Contudo, embriões submetidos ao choque térmico apresentaram menor número e percentual de células TUNEL-positivas do trofotoderma ($P = 0,0270$ e $P = 0,0240$) e total do embrião ($P = 0,0029$ e $P = 0,0031$), assim como redução na atividade mitocondrial ($P = 0,0073$). O CSF2 não afetou as variáveis de qualidade embrionária avaliadas. No terceiro capítulo, avaliou-se o efeito da embriocina CSF2, do sexo do embrião e da contribuição paterna (sêmem de 3 touros) sobre a capacidade de desenvolvimento embrionário e modificações pós-

tradicionais em Histona 3 de blastocistos bovinos. Observou-se maior quantidade de marcação para H3K27me3 ($P=0,030$) em embriões do sexo masculino em relação à embriões do sexo feminino. Marcação para H3K27me3 e H3K18ac foi dependente do touro do qual o embrião foi originado. Embora CSF2 tenha reduzido a proporção de embriões que desenvolveram para o estágio de blastocisto, não houve efeito na marcação de H3K27me3 e H3K18ac.

Palavras-chave: blastocistos, choque térmico, embriocina, epigenética, qualidade embrionária.

Abstract

The interaction between the embryos and the surrounding environment can modulate embryo development, affecting its competency to develop into blastocyst and to establish a gestation. The endometrium secretes embryocines responsible to promote embryo development while the increase in mother body temperature disrupt the embryo viability. This thesis aimed to evaluate alterations in embryos exposed to the embryokine Colony Stimulator Factor 2 (CSF2), secreted in the uterus environment and related to modulate embryo development, as well heat stress, that induce cellular stress in developing embryos. Due to the effect of increasing body core temperature on dairy cows conception rate, we also evaluated the vaginal temperature variation in Girolando cows on summer. On chapter one, we evaluated the vaginal temperature variation of three different genetic groups of Girolando under pasture during the summer. The vaginal temperature had estimated linear increase of 0.05 degrees of each temperature humidity index unit increase ($P < 0.001$). Cows with 1/2 of Holstein genetic on crossbred composition (H) had smaller vaginal temperature variation over 24h than cows with 3/4 and 7/8 H ($P < 0.001$). We conclude that the trophoctoderm of blastocysts may goes to epigenetic modifications by embryo sex and bull inheritance through alterations in histone epigenetic marks. Heat shock between days 2.5 to 3 of *in vitro* culture do not affect embryo development, but reduce the embryo quality. The proportion of Holstein genetic on Girolando cows higher than 3/4 reduces cow resistance to heat stress. In the second chapter, we evaluated the effect of CSF2 on embryo development competence and quality previously stressed by heat shock between days 2.5 to 3 of embryo *in vitro* culture. There were no effect of heat shock and CSF2 on embryo development and number of embryo cells. Although, heat stressed embryos had lower number and index of TUNEL-positive cells on trophoctoderm ($P = 0.0270$ e $P = 0.0240$) and total embryo ($P = 0.0029$ e $P = 0.0031$), and showed reduced mitochondrial activity ($P = 0.0073$). The CSF2 did not affected any embryo quality evaluated variables. In the third chapter we evaluated the effect of CSF2, sex of embryos and sire used in fertilization on the embryo development competence and post-translational modifications to Histone 3 in blastocyst trophoctoderm. It was found that amounts of immunolabeled H3K27me3 were greater ($P = 0.030$) for male embryos than female embryos. Additionally, labeling for H3K27me3 and H3K18ac depended upon the bull from which embryos were derived. Although

CSF2 reduced the proportion of embryos developing to the blastocyst, there was no effect of CSF2 on labeling for H3K27me3 or H3K18ac.

Keywords: blastocyst, embryocine, embryo quality, epigenetic, heat shock.

Lista de figuras

	Página
Capítulo 1	
<p>Figure 1. Figura 1. <i>iBotton data logger</i> fixado a um dispositivo liberador de progesterona (Sincrogest®) sem a película impregnada de progesterona. Detalhe: <i>data</i> <i>logger</i> <i>iBotton</i>.....</p>	52
<p>Figura 2. Média da variação da temperatura vaginal de vacas Girolando e Índice de Temperatura e Umidade (ITU) durante o verão.....</p>	56
<p>Figure 3. Média dos quadrados mínimos e intervalor de confiança da temperatura vaginal de três grupos de composição genética de gado leiteiro (<i>Bos taurus (Holstein) x Bos indicus</i>) em função da hora do dia. (*) 1/2 H vs 3/4 H e 1/2 H vs 7/8 H, $P < 0,05$.....</p>	57
Capítulo 2	
<p>Figura 1. Competência de clivagem após fecundação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos, e de desenvolvimento de embriões ao estágio de blastocisto sob efeito de choque térmico e Fator Estimulador de Colônia 2. Média ± SEM. CSF2: Fator Estimulador de Colônia 2; Veic: veículo; controle. $P > 0,05$.....</p>	72
<p>Figura 2. Número total de células e células TUNEL-positivas em blastocistos bovinos em relação ao estímulo por choque térmico e Fator Estimulador de Colônia 2 no cultivo embrionário <i>in vitro</i>. (A) Imagens representativas da marcação de Hoescht e TUNEL em blastocisto; aumento de 400 X; (B) Média ± SEM do número de células e células TUNEL-positivas do trofotoderma e total do embrião. Números entre parênteses representam o <i>n</i> de cada tratamento. CSF2: Fator Estimulador de Colônia 2; Veic: veículo; controle. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.....</p>	73
<p>Figura 3. Atividade mitocondrial <i>in vitro</i> em blastocistos bovinos em relação ao estímulo por choque térmico e Fator Estimulador de Colônia 2 no cultivo embrionário <i>in vitro</i>. (A) Imagens representativas da marcação com Hoescht e MitoTracker Orange em blastocisto; aumento de 200 X; (B) Média ± SEM da intensidade de fluorescência representativa da atividade</p>	

mitocondrial em blastocistos. Números representam o *n* de cada tratamento. CSF2: Fator Estimulador de Colônia 2; Veic: veículo; controle.

** $P < 0,01$ 74

Figura 4. Percentual de lipídios em blastocistos bovinos em relação ao estímulo por choque térmico e Fator Estimulador de Colônia 2 no cultivo embrionário *in vitro*. (A) Imagem representativa da marcação de lipídios por Sudan Black em blastocisto; aumento de 400 X; (B) Média \pm SEM do percentual da área de lipídios no blastocisto. Números representam o *n* de cada tratamento. CSF2: Fator Estimulador de Colônia 2; Veic: veículo; controle. $P > 0,05$ 75

Capítulo 3

Figura 1. Competência de oócitos em clivar após fertilização e de embriões em desenvolver para o estágio de blastocisto em relação ao efeito de sexo, touro e CSF2..... 89

Figura 2. Imunomarcção para histone H3. A. Exemplo representativo de marcação em blastocisto usando anticorpo para H3. Média dos quadrados mínimos \pm SEM da intensidade de fluorescência de H3 no núcleo de células do TE em relação ao sexo, touro e CSF2..... 90

Figure 3. Imunomarcção para H3K27me3. A. Exemplo representativo de marcação em blastocisto usando anticorpo para H3K27me3. Média dos quadrados mínimos \pm SEM da intensidade de fluorescência de H3K27me3 no núcleo de células do TE em relação ao sexo, touro e CSF2, e após usar H3 como covariável..... 91

Figura 4. Imunomarcção para H3K18ac. A. Exemplo representativo de marcação em blastocisto usando anticorpo para H3K18ac. Média dos quadrados mínimos \pm SEM da intensidade de fluorescência de H3K18ac no núcleo de células do TE em relação ao sexo, touro e CSF2, e após usar H3 como covariável..... 92

Lista de tabelas

Capítulo 3

	Página
Tabela 1. Sumário de informações sobre o monitoramento da temperatura vaginal.....	51
Tabela 2. Média dos quadrados mínimos (\pm erro padrão) da temperatura vaginal em função de fazenda, ano, composição genética, status de gestação, escore de condição corporal (ECC) e categoria de produção de leite.....	54

Lista de abreviaturas e siglas

AGNE – Ácidos graxos não esterificados

BSA – Albumina sérica bovina

CIV – Cultivo *in vitro*

CCO – Complexo cumulus-oócito

CSF2 – Fator Estimulador de Colônia 2

FIV – Fertilização *in vitro*

H3 – Histona 3

H3K27me3 – Trimetilação na Lisina 27 de Histona 3

H3K18ac – Acetilação na Lisina 18 de Histona 3

ITU – Índice de temperatura e umidade

MCI – Células da massa celular interna

MIV – Maturação *in vitro*

PZ – Prováveis zigotos

SFB – Soro fetal bovino

TE – Células do trofotoderma

THI – Temperature Humidity index

TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

Sumário

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.4 Objetivo.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Desenvolvimento embrionário pré-implantação.....	18
2.1.1 Alterações moleculares.....	19
2.2 Interação ambiente uterino e embrião.....	21
2.2.1 Sexo do embrião.....	21
2.2.2 Embriocinas.....	21
2.2.2.1 Fator Estimulador de Colônia 2 (CSF2).....	22
2.3 Estresse térmico pelo calor.....	24
2.3.1 Avaliação do estresse térmico pelo calor.....	25
2.3.2 Avaliação da temperatura corporal.....	26
2.3.3 Estresse térmico pelo calor e metabolismo.....	27
2.3.4 Estresse térmico pelo calor e fertilidade da fêmea bovina.....	29
2.3.4.1 Estresse térmico pelo calor no desenvolvimento embrionário.....	30
2.3.4.2 Estresse térmico pelo calor na apoptose celular.....	31
2.3.5 Estresse térmico pelo calor na programação fetal.....	33
2.5 Referências Bibliográficas.....	35
CAPÍTULO 1	
3. TEMPERATURA VAGINAL DIÁRIA EM VACAS GIROLANDO DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES GENÉTICAS SOB ESTRESSE TÉRMICO PELO CALOR NATURAL.....	46
3.1 Resumo.....	46
3.2 Abstract.....	47
3.3 Introdução.....	48
3.4 Material e Métodos.....	50
3.4.1 Animais e fazendas.....	50
3.4.2 Monitoramento da temperatura vaginal.....	51

3.4.3 <i>Análise estatística</i>	53
3.5 Resultados	54
3.5.1 <i>Fazenda e ano</i>	54
3.5.2 <i>Fatores intrínsecos</i>	54
3.5.3 <i>Temperatura vaginal diária e ITU</i>	53
3.5.4 <i>Composição genética</i>	57
3.6 Discussão	57
3.7 Conclusão	59
3.8 Referências	60

Capítulo 2

4. EMBRIÕES BOVINOS ESTIMULADOS <i>IN VITRO</i> COM FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA 2 (CSF2), PREVIAMENTE SUBMETIDOS AO CHOQUE TÉRMICO	64
4.1 Resumo	64
4.2 Abstract	65
4.3 Introdução	65
4.4 Material e Métodos	66
4.4.1 <i>Produção de embriões</i>	66
4.4.2 <i>Degradação de DNA</i>	69
4.4.3 <i>Atividade mitocondrial</i>	70
4.4.4 <i>Percentual de lipídios</i>	71
4.4.5 <i>Análise estatística</i>	71
4.5 Resultados	72
4.5.1 <i>Desenvolvimento embrionário</i>	72
4.5.2 <i>Número de células embrionárias e apoptose</i>	73
4.5.3 <i>Atividade mitocondrial</i>	74
4.5.4 <i>Percentual de lipídios</i>	75
4.6 Discussão	75
4.7 Conclusão	77
4.8 Referências	77

Capítulo 3

5 SEXO AFETA A IMUNOMARCAÇÃO EM HISTONA 3 K27me3 NO TROFECTODERMA DE BLASTOCISTOS BOVINOS MAS NÃO A MARCAÇÃO EM HISTONA 3 K18ac	82
5.1 Resumo.....	82
5.2 Abstract.....	83
5.3 Introdução.....	83
5.4 Material e métodos.....	84
5.4.1 <i>Produção de embrião.....</i>	84
5.4.2 <i>Imunomarcação.....</i>	86
5.4.3 <i>Análise de imagens</i>	87
5.4.4 <i>Análise estatística</i>	87
5.5 Resultados.....	88
5.5.1 <i>Desenvolvimento embrionário.....</i>	88
5.5.2 <i>Imunomarcação em histona H3.....</i>	90
5.5.3 <i>Imunomarcação para histona H3K27me3.....</i>	91
5.5.4 <i>Imunomarcação para histona H3K18ac</i>	92
5.6 Discussão.....	93
5.7 Referências.....	96
6. CONCLUSÕES.....	100
Anexo I.....	101

1. INTRODUÇÃO

Entre diversos fatores que podem influenciar na fertilidade de bovinos está a competência do embrião em estabelecer uma gestação. O início do desenvolvimento embrionário pré-implantação é um período crítico, pois o embrião passa por uma série de modificações morfológicas, metabólicas e moleculares que possibilitam ao zigoto, uma estrutura unicelular, tornar-se um blastocisto, uma estrutura multicelular que apresenta as primeiras linhagens de células diferenciadas (Senger, 2003). Nesta fase do desenvolvimento é onde se concentra a maior parte das perdas embrionárias (Hansen, 2011). Neste processo, o embrião encontra-se migrando pela tuba uterina em direção ao ápice do corno uterino, sendo dependente do ambiente ao seu redor para obter o suporte necessário para sua manutenção e desenvolvimento (Spencer, 2017).

O estresse térmico pelo calor é um dos principais fatores causadores de perdas embrionárias. Períodos de calor intenso, como verão, ou elevação atípica da temperatura e umidade do ar resultam em estresse térmico pelo calor em bovinos, afetando a produção e reprodução (Pereira *et al.*, 2013). Além de alterações metabólicas, o estresse térmico pelo calor induz os animais à hipertermia que, quando ocorre em fêmeas em estádios iniciais da gestação, pode comprometer a viabilidade de embriões em desenvolvimento (Ortega *et al.*, 2016). Em condições de clima tropical e subtropical, o cruzamento entre animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* possibilita a obtenção de animais mais adaptados às condições de estresse térmico pelo calor, reduzindo os impactos na produção e reprodução (Ruas *et al.*, 2014). Contudo, há relatos que mesmo esse grupo de animais resistentes sofre os efeitos adversos quando expostos a climas quentes (Costa *et al.*, 2015).

As células epiteliais da tuba uterina e útero secretam moléculas biotivas, as embriocinas, que são capazes de modular o desenvolvimento embrionário e, em condições de estresse, podem favorecer o desenvolvimento do embrião (Tríbulo *et al.*, 2018). Uma dessas moléculas é o Fator Estimulador de Colônia 2 (CSF2) que modula o desenvolvimento embrionário, alterando o alongamento de embriões e produção de interferon-tau, a metilação de DNA e expressão de genes em fetos e o ganho de peso em bezerros. Alguns desses efeitos ocorrem de forma diferente entre embriões do sexo masculino e sexo feminino. O CSF2 também está relacionado à inibição de vias pró-apoptóticas e estímulo de vias anti-apoptóticas em mórulas, e redução de lesão de

DNA em blastocistos desafiados com choque térmico (Loureiro *et al.*, 2009; Dobbs *et al.*, 2014; Kannampuzha-Francis *et al.*; 2015 ; Siqueira *et al.*, 2017).

2.4 Objetivos

Devido a importância do ambiente sobre o desenvolvimento embrionário e sua competência, objetivou-se estudar modificações do ambiente de desenvolvimento que podem afetar o embrião ainda nos estádios iniciais do período pré-implantação. Buscou-se como focos principais: a) o estresse térmico pelo calor, associado ao estresse celular embrionário, e a redução na fertilidade de vacas leiteiras; e b) a ação da embriocina CSF2, secretada no ambiente uterino e responsável por modular o desenvolvimento embrionário.

No primeiro capítulo avaliou-se a variação da temperatura vaginal em vacas de três grupos genéticos do cruzamento Girolando mantidas sob condições de pastejo durante período de estresse térmico pelo calor natural. No segundo capítulo avaliou-se a ação da embriocina CSF2 na competência de desenvolvimento e qualidade de embriões previamente estressados pelo choque térmico entre os dias 2,5 e 3 do cultivo. Avaliou-se no terceiro capítulo o efeito da embriocina CSF2, do sexo do embrião e da contribuição paterna sobre a capacidade de desenvolvimento embrionário e modificações pós-traducionais em Histona 3 de blastocistos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento embrionário pré-implantação

Após a fecundação, o pró-núcleo feminino, oriundo do núcleo do oócito, e o pró-núcleo masculino, oriundo do núcleo do espermatozoide, se fundem formando o zigoto, o embrião de uma única célula (Senger, 2003). O zigoto passa por sucessivas divisões mitóticas, chamadas de clivagem, até alcançar o estágio de blastocisto. Essas divisões ocorrem por partição do citoplasma, resultando em células cada vez menores conforme a progressão das divisões, que estão confinadas dentro da zona pelúcida (Senger, 2003).

Cada célula embrionária, ou blastômero, passa por subseqüentes divisões, gerando embriões de duas, quatro, oito e 16 células. Após este estágio, torna-se impossível individualizar os blastômeros, formando a mórula (Senger, 2003). A partir desse estágio as células começam a se diferenciar em embrioblasto ou células da massa celular interna (MCI), que darão origem ao corpo do embrião, e em células do trofoblasto (TE) ou trofotoderma, que darão origem aos anexos placentários. Após, inicia-se a formação do blastocisto. Forma-se uma cavidade, a blastocèle, que separa a MCI em um dos polos do embrião e as TE em uma monocamada que reveste a blastocèle (Senger, 2003).

Com o avançar das divisões, o embrião aumenta de tamanho formando um blastocisto expandido que, posteriormente, irá romper a zona pelúcida tornando-se um embrião livre no lúmen uterino (Spencer *et al.*, 2017). Cerca de 15 dias após a ovulação o trofotoderma se alonga, ocupando o corno uterino e sinalizando sua presença por meio da secreção do interferon-tau, garantindo alta concentração sérica de progesterona luteal, hormônio fundamental para manutenção da gestação (Spencer *et al.*, 2017).

Durante o processo de formação inicial do embrião, de zigoto a blastocisto, este se encontra migrando no lúmen da tuba uterina até o útero. Em bovinos, os embriões de três células são formados cerca de 24h após a ovulação, de quatro células 1,5 dias após ovulação (dpo), oito células três dpo, mórula quatro a seis dpo, blastocisto sete dpo e blastocisto eclodido oito dpo (Senger, 2003; Spencer *et al.*, 2017). A chegada do embrião ao lúmen uterino geralmente ocorre no quinto dia após ovulação, no estágio de mórula (Senger, 2003; Spencer *et al.*, 2017).

Nesta fase, o embrião é dependente da secreção das células epiteliais locais para que possa receber nutrientes e sinalizações moleculares (Spencer *et al.*, 2008). As células epiteliais são responsáveis por secretar uma gama de substâncias complexas, formando o histotrofo (Spencer *et al.*, 2008; Spencer *et al.*, 2017). Esse fluido é composto por uma mistura de proteínas, lipídios, aminoácidos, açúcares, íons, exossomos, microvesículas e embriocinas (Spencer *et al.*, 2008; Spencer *et al.*, 2017; Tríbulo *et al.*, 2018). Estima-se que mais de 50% das falhas de concepção ocorram no estágio pré-implantação, sendo crítico o período de desenvolvimento embrionário inicial, entre a fertilização e o estágio de blastocisto (Hansen, 2011).

2.1.1 Alterações moleculares

Durante o período pré-implantação, o embrião passa por intensas modificações estruturais e moleculares que são cruciais para sua competência, especialmente no controle da expressão gênica (Dobbs *et al.*, 2013b; Bogliotti *et al.*, 2019). Este processo envolve a ativação do genoma embrionário e remodelação de marcadores epigenéticos (Dobbs *et al.*, 2013b; Bogliotti *et al.*, 2019).

No ovário, durante o crescimento do oócito, ocorre o acúmulo de transcritos no citoplasma oocitário (Graf *et al.*, 2014). Esse material genético é responsável por controlar as vias metabólicas do embrião durante as primeiras clivagens. A partir do estágio de quatro células inicia-se a ativação do genoma embrionário, processo no qual ocorre degradação no mRNA de origem materna e transcrição do mRNA embrionário (Graf *et al.*, 2014). Este processo se torna mais intenso nos estádios de oito para 16 células, 72h após a fecundação, quando o embrião passa a controlar completamente sua expressão gênica (Bogliotti *et al.*, 2019).

A regulação epigenética controla a expressão diferencial de genes entre os diferentes tipos celulares, o que determina suas funções (Blomen e Boonstra, 2011). Este processo pode ser alterado por ação de fatores externos, podendo modificar o fenótipo celular ou mesmo do indivíduo (Faulk e Dolinoy, 2011). O acesso dos fatores de transcrição à sequência alvo na fita de DNA é influenciado pela estrutura e organização da cromatina. Modificações na cromatina que levem à sua compactação ou descompactação restringem ou facilitam, respectivamente, a transcrição gênica (Ballaré *et al.*, 2013). Portanto, modificações no posicionamento dos nucleossomos ou modificações na estrutura das histonas pós-traducionais (metilação, acetilação,

fosforilação e ubiquitinação de aminoácidos) são mecanismos epigenéticos que podem promover ou inibir a expressão gênica (Ballaré *et al.*, 2013).

Para orquestrar o dinâmico processo do desenvolvimento embrionário inicial, marcadores epigenéticos passam por remodelação, por meio de desmetilação global, seguida de metilação de novo de DNA e histonas (Ross *et al.*, 2008; Dobbs *et al.*, 2013b). A reprogramação epigenética envolve a remoção e restabelecimento da metilação do DNA em dois momentos do ciclo celular, o primeiro nas células germinativas e o segundo no zigoto (Reik *et al.*, 2001). Estes processos são conhecidos, respectivamente, como primeira e segunda onda de desmetilação e metilação *de novo* global do DNA (Reik *et al.*, 2001).

A primeira onda de desmetilação ocorre na fase embrionária, nas células germinativas, durante a migração para a crista genital (Seisenberger *et al.*, 2012). Este mecanismo é importante pois remove epimutações adquiridas, possibilita que ocorram as marcações *imprint* relacionadas ao gameta que dará origem, reativa genes da linhagem germinativa, e prepara a célula para o restabelecimento do potencial de desenvolvimento totipotente após a fecundação (Guibert *et al.*, 2012). Contudo, alguns genes podem resistir à desmetilação, permitindo a herdabilidade de características epigenéticas entre gerações (Guibert *et al.*, 2012).

A segunda onda de desmetilação global ocorre no zigoto, após a fertilização. Neste processo, marcas epigenéticas são removidas do genoma materno e paterno. No entanto, os genes *imprinted* permanecem metilados (Okano *et al.*, 1999). A desmetilação do pró-núcleo masculino ocorre rapidamente por mecanismo ativo, antes da primeira divisão celular (Inoue e zhang, 2011). No pró-núcleo feminino, a desmetilação ocorre lentamente de forma passiva, estendendo-se até o início da metilação *de novo* (Inoue e zhang, 2011). Em bovinos, a desmetilação global do DNA e de histonas inicia nos estádios de quatro e oito células, e a metilação *de novo* ocorre entre os estádios de mórula e blastocisto (Ross *et al.*, 2008; Dobbs *et al.*, 2013b).

2.2 Interação ambiente uterino e embrião

O zigoto possui em seu código genético e epigenoma a programação que irá guiar seu desenvolvimento em embrião, feto e até mesmo no período pós-natal. A desenvolvimento deste programa é dependente, entre outros fatores, do ambiente em que o embrião se desenvolve (Hansen, 2014). Características intrínsecas à mãe,

como ordem de parição ou estado nutricional interferem na competência do embrião em estabelecer a gestação (Sartori *et al.*, 2002; Abdelatty *et al.*, 2018). A interação com o ambiente externo também pode induzir a modificações no ambiente uterino, interferindo na sua competência (Sartori *et al.*, 2002; Abdelatty *et al.*, 2018). Um exemplo é o estresse térmico pelo calor que, além de induzir a modificações no metabolismo, também leva à hipertermia materna, induzindo estresse celular no embrião (Sartori *et al.*, 2002 e Baumgard *et al.*, 2011).

2.2.1 Sexo do embrião

Apesar da ausência da ação de hormônios gonadais, embriões em estágio inicial já apresentam diferenças entre os sexos em relação ao desenvolvimento, padrão de expressão gênica e metabolismo proteico (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2011). Embriões do sexo feminino apresentam três vezes menos genes diferentemente expressos e secretam mais miRNA em relação a embriões do sexo masculino (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010; Gross *et al.*, 2017).

A diferença entre os sexos nos embriões ainda no início do desenvolvimento pode ser modulada pelo ambiente. A presença de glucosamina no meio de cultura, após a ativação do genoma embrionário, aumenta a relação de blastocistos do sexo masculino em relação aos do sexo feminino (Kimura *et al.*, 2008). Blastocistos do sexo masculino produzidos *in vitro*, em meio contendo soro fetal bovino (SFB), apresentaram mais genes diferentemente expressos quando comparados com embriões produzidos *in vitro* em meio livre de SFB, ou produzidos *in vivo*. Em contrapartida, embriões do sexo feminino oriundos de meio livre de SFB apresentaram o mesmo perfil de expressão gênica que embriões produzidos *in vivo*, enquanto que embriões do sexo feminino produzidos com SFB apresentaram alta variação na expressão gênica (Heras *et al.*, 2016).

A influência do ambiente sobre o embrião nos estádios iniciais de desenvolvimento parece estar relacionada ao sexo do embrião. As células do trato reprodutor feminino podem induzir modulações no desenvolvimento embrionário por meio de moléculas bioativas (Hansen *et al.*, 2014; Tríbulo *et al.*, 2018).

2.2.2 Embriocinas

As células da tuba uterina e do endométrio secretam diversas moléculas regulatórias capazes de direcionar o desenvolvimento embrionário, chamadas de

embriocinas (Hansen *et al.*, 2014). A secreção destas moléculas se dá de forma dinâmica, conforme o dia após a ovulação, indicando que agem no embrião de acordo com o seu período de desenvolvimento (Tríbulo *et al.*, 2018).

Diversas moléculas secretadas na luz do trato reprodutor feminino, durante o desenvolvimento embrionário, apresentam potencial de embriocinas (Tríbulo *et al.*, 2018). Dentre elas podemos citar o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), o Dickkopf 1 (DKK1) e o Fator Estimulador de Colônia 2 (CSF2), que estão relacionados à proliferação celular, modulação de vias metabólicas importantes para diferenciação celular e proteção contra o estresse celular (Loureiro *et al.*, 2011a; Dobbs *et al.*, 2013b; Tríbulo *et al.*, 2019).

2.2.2.1 Fator Estimulador de Colônia 2

Uma das embriocinas mais estudadas e expressas no endométrio bovino, especialmente no dia cinco após a ovulação, é o CSF2 (Tríbulo *et al.*, 2018). A adição de CSF2 ao meio de cultivo no dia cinco do cultivo *in vitro* afeta a produção de blastocistos e induz ações de longo prazo em embriões humanos, de camundongos e de bovinos, que podem se estender para o feto, placenta, e até mesmo na vida pós-natal (Sjöblom *et al.*, 2005; Ziebe *et al.*, 2013; Loureiro *et al.*, 2009; Kannampuzha-Francis *et al.*, 2015).

Em relação ao desenvolvimento do embrião bovino ao estágio de blastocisto, quando o CSF2 foi associado ao soro fetal bovino no meio de cultivo, houve redução na taxa de blastocistos ou inibição do seu efeito (De Moraes *et al.*, 1997; Tríbulo *et al.*, 2017), enquanto que na ausência de SFB aumentou a produção de embriões *in vitro* (De Moraes *et al.*, 1997).

Outro fator associado à resposta ao CSF2 é a tensão de oxigênio em condições de cultivo *in vitro*. Loureiro *et al.* (2009) mostraram que sob alta concentração de oxigênio, embriões tratados com CSF2 apresentam redução na competência em alcançarem o estágio de blastocistos, enquanto que a 5% de O₂, semelhante ao ambiente uterino, a embriocina aumenta a produção de blastocistos. Contudo, Zolini *et al.* (2019) não encontraram efeito na produção de embriões de vacas da raça holandesa cultivados em condições de baixa tensão de oxigênio.

Dobbs *et al.* (2013a) encontraram associação entre a dinâmica de desenvolvimento embrionário e o CSF2. Quando o desenvolvimento no grupo controle era baixo, o CSF2 aumentava a produção de blastocistos; quando a produção no meio controle era intermediária, não havia efeito do CSF2 e quando a produção era alta, o CSF2 leva à redução na taxa de blastocistos. Também, parece haver relação do CSF2 com o sexo do embrião, em relação a competência de desenvolvimento, uma vez que a adição da embriocina apresentou tendência ao aumento na produção de embriões produzidos a partir de sêmen sexado para fêmea, mas não afetou o desenvolvimento de embriões produzidos por fertilização com sêmen sexado para macho (Siqueira *et al.*, 2016).

Os efeitos da presença do CSF2 no meio de cultivo também são percebidos nas fases mais avançadas da gestação, ou após o nascimento. Embriões de camundongos tratados com CSF2 no cultivo resultaram em maior proporção de progênie viáveis, quando comparado com progênie de embriões produzidos *in vivo* e embriões cultivados sem CSF2 (Sjöblom *et al.*, 2005). Em humanos, embriões tratados com CSF2 apresentaram maior sobrevivência até 12 semanas de vida (Ziebe *et al.*, 2013) e resultaram em aumento das taxas de gestação de mulheres com mais de 35 anos (Zhou *et al.*, 2016).

Em bovinos, embriões tratados no dia cinco do cultivo com CSF2 apresentaram maior probabilidade de estabelecerem gestação (Loureiro *et al.*, 2009), maior alongamento, e produção de interferon-tau em embriões machos em relação às fêmeas (Dobbs *et al.*, 2014). Também, resultou em maior peso corporal até os 13 meses de idade de bezerras em relação às bezerras (Kannampuzha-Francis *et al.*, 2015).

A secreção do CSF2 pelas células endometriais no período inicial do desenvolvimento embrionário parece ser um mecanismo pelo qual o ambiente uterino modula o desenvolvimento embrionário, alterando a programação fetal, favorecendo o desenvolvimento embrionário e fetal em fases posteriores da gestação (Loureiro *et al.*, 2009; Kannampuzha-Francis *et al.*, 2015; Siqueira *et al.*, 2017). Esta modulação parece ocorrer de forma diferente entre os sexos, indicando também uma modulação do ambiente uterino pelo embrião (Siqueira *et al.*, 2016; Dobbs *et al.*, 2014). Esta modulação pode se dar por meio da regulação de marcadores epigenéticos, como a

metilação de DNA (Dobbs *et al.*, 2014), porém, ainda não há informações a respeito de sua ação sobre as modificações pós-traducionais de histonas.

Outro aspecto que necessita de maiores investigações é o efeito do CSF2 em embriões de baixa competência. Sua adição ao meio de cultivo favoreceu embriões com baixa competência de desenvolvimento a alcançarem o estágio de blastocisto (Dobbs *et al.*, 2013a), induzindo a ativação da expressão de genes anti-apoptóticos, e reduzindo o percentual de células TUNEL-positivas em blastocistos posteriormente expostos ao choque térmico (Loureiro *et al.*, 2011a). Contudo, não há resultados de sua ação sobre embriões previamente desafiados pelo choque térmico.

2.3 Estresse térmico pelo calor

No estresse, agentes externos atuam sobre o animal comprometendo a homeostasia, o que resulta na ativação de mecanismos metabólicos para adaptação à nova condição e retorno à homeostase (Scott, 1981). Quando o agente estressor tem por natureza o calor ou o frio ocorre o estresse térmico. Em animais homeotérmicos, quando a carga de calor recebida do ambiente, somada à produzida pelo seu metabolismo, é superior à capacidade de dissipá-la a ponto de prejudicar a manutenção da temperatura corporal fisiológica, ocorre o estresse térmico pelo calor ou estresse térmico pelo calor (West, 2003).

A perda de calor para o ambiente se dá, inicialmente, pelos mecanismos não evaporativos de radiação, convecção e condução. Quando estes mecanismos de termólise não são eficientes frente ao desafio ambiental, há ativação dos mecanismos de resfriamento evaporativo, por aumento da frequência respiratória e sudação (West, 2003). Logo, o primeiro sinal observado em vacas sob estresse térmico pelo calor é o aumento da frequência respiratória, seguido do aumento da frequência cardíaca e temperatura retal (Azevêdo *et al.*, 2005). Se a carga de calor recebido for maior que a capacidade de eliminação pelos mecanismos fisiológicos de resfriamento, o animal entra em estado de hipertermia que, em casos graves, pode levar à morte (Berman *et al.*, 2005).

O aumento da temperatura corporal está associado com a redução do consumo de alimentos, aumento dos requisitos da manutenção, alterações metabólicas, redução da fertilidade e da produção de leite. Portanto, a prioridade para manter a temperatura

corporal, dentro dos limites fisiológicos, prevalece sobre as funções produtivas, como a lactação (Baumgard *et al.*, 2011).

2.3.1 Avaliação do estresse térmico pelo calor

A temperatura corporal não é influenciada apenas pela temperatura do ar, mas também por outros fatores, como a umidade relativa do ar, radiação solar, velocidade do vento e pressão atmosférica (Berman, 2004). A temperatura ambiente e a umidade relativa do ar são informações de fácil obtenção em estações meteorológicas e podem ser combinadas em uma fórmula matemática para se obter um índice de conforto térmico, o índice de temperatura e umidade (ITU).

O ITU, inicialmente criado por Thom em 1959 para avaliar a condição climática para humanos, foi, posteriormente, extrapolado para avaliar o conforto térmico de vacas leiteiras (Berry *et al.*, 1964). Este índice associa os dados de temperaturas do bulbo úmido e bulbo seco em uma fórmula matemática, gerando um valor numérico, um índice que representa as condições de conforto térmico do ambiente avaliado (Thom, 1959).

Atualmente são descritas na literatura diferentes variações da fórmula inicialmente proposta por Thom. Apesar das diferenças nos valores obtidos utilizando as diferentes fórmulas, estudos têm apontado que há alta correlação entre elas (Dikmen e Hansen, 2009; Dash *et al.*, 2015).

Ainda hoje, o padrão para classificar a condição de estresse térmico pelo calor é baseado no estudo desenvolvido pelo *Livestock Conservation Institute* por Frank Wiersma em 1990, e apresentado por Armstrong (1994). Nesse, o ITU <72 indica que os animais estão em conforto térmico, entre 72 e 78 sob estresse brando, de 79 a 88 estresse moderado e de 89 a 98 estresse severo (Armstrong, 1994). Apesar desse padrão ser amplamente empregado em artigos científicos que abordam o tema, dados que suportem estes valores não são descritos na literatura (Collier *et al.*, 2012). Segundo Bernabucci (2010), esta classificação é fruto de um estudo realizado entre as décadas de 50 e 60, com dados retrospectivos de 56 vacas da raça Holandesa, com produção média de 15 Kg de leite/dia. O sucesso na seleção genética focada no aumento da capacidade produtiva das vacas leiteiras, no decorrer das últimas décadas, foi acompanhada do aumento na sensibilidade ao estresse térmico pelo calor. Estudos apontam que vacas que apresentam produção superior a 35Kg de

leite/dia apresentam maior sensibilidade ao estresse térmico, podendo reduzir em até 2,2 kg/leite/dia quando o ITU médio for ≥ 68 (Collier *et al.*, 2009), ou quando o ITU mínimo diário permanecer acima de 65 (Collier *et al.*, 2012).

Contudo, o ITU ainda é a forma mais prática de se avaliar o estresse térmico, sendo amplamente empregado em trabalhos científicos e para monitorar o conforto de vacas em propriedades leiteiras. Dikmen e Hansen (2009) indicaram a fórmula $ITU = (1,8 \times T^{\circ}amb + 32) - (0,55 - 0,0055 \times Umid) \times (1,8 \times T^{\circ}amb - 26)$, onde $T^{\circ}amb$ é temperatura ambiental e $Umid$ a umidade relativa do ar, como a que apresenta melhor relação entre ITU e temperatura retal em animais em ambientes de alta umidade (Dikmen e Hansen, 2009).

2.3.2 Avaliação da temperatura corporal

A avaliação da temperatura retal é um método clássico para avaliação da temperatura corporal em bovinos. Contudo, os dados obtidos por este método são sujeitos à influência do estresse causado ao animal pelo manejo e contenção, assim como possibilita número limitado de mensurações (Vickers *et al.*, 2010).

A avaliação da temperatura superficial por termografia, com uso de câmeras de infravermelho, é um método não invasivo e que não necessita o contato com o animal, eliminando o estresse (Salles *et al.*, 2016). Porém, a avaliação da temperatura superficial apresenta grande variação de acordo como o local da superfície corporal e lado do animal, assim como não possibilita o monitoramento por longos períodos (Salles *et al.*, 2016). Um método que possibilita o monitoramento da temperatura corporal interna é a avaliação da temperatura do retículo-rúmen por meio de *bolus* telemétrico (Liang *et al.*, 2013). Esse método possibilita o monitoramento da temperatura corporal continuamente por longos períodos (até anos), mas é altamente influenciado pela ingestão de água e fermentação dos alimentos (Liang *et al.*, 2013).

O monitoramento da temperatura vaginal é um método não invasivo que possibilita o monitoramento contínuo da temperatura corporal, sem submeter os animais às condições estressantes e apresenta alta correlação com a temperatura retal (Vickers *et al.*, 2010; Burfeind *et al.* 2011; Kaufman *et al.*, 2018). Um *data logger* acoplado a um implante intravaginal é inserido na cavidade vaginal, permitindo a avaliação da temperatura corporal por alguns dias consecutivos, sem a interferência de fatores externos (Vickers *et al.*, 2010; Burfeind *et al.* 2011; Kaufman *et al.*, 2018).

Pesquisas são necessárias para que se entenda melhor o controle térmico em bovinos, para diferentes raças e condições ambientais (Godyn *et al.*, 2019). Estudos têm avaliado a variação da temperatura vaginal de vacas da raça Holandesa (Kendall *et al.*, 2009; Nabenish *et al.*, 2011a) e Brangus (Dikmen *et al.*, 2018; Davila *et al.*, 2019) expostas às condições de estresse térmico pelo calor, natural ou induzido. Contudo, ainda não existem relatos sobre a variação da temperatura vaginal de vacas mestiças leiteiras em condições de estresse térmico pelo calor natural.

2.3.3 Estresse térmico pelo calor e metabolismo

Além das alterações nos parâmetros fisiológicos, outros sinais característicos de uma vaca sob estresse térmico pelo calor são a redução na ingestão de matéria seca (IMS) e redução na produção de leite (West, 1999 e West *et al.*, 2003). Para estudar o efeito da redução da IMS sobre a produção de leite, a equipe do professor Lance H. Baumgard da Iowa State University, EUA, conduziu uma série de trabalhos utilizando o modelo experimental “pair-fed” em vacas em terço médio de lactação (Rhoads *et al.*, 2009, Wheelock *et al.*, 2010 e Baumgard *et al.*, 2011). Neste modelo as vacas mantidas em ambiente termoneutro são submetidas a restrição alimentar semelhante a redução percentual da IMS que ocorre em grupo pareado de vacas submetidas ao estresse térmico (Rhoads *et al.*, 2009, Wheelock *et al.*, 2010 e Baumgard *et al.*, 2011).

A redução na IMS levou vacas lactantes, induzidas ao estresse térmico pelo calor, levou à perda de peso corporal semelhante a observada no grupo “pair-fed”, contudo as concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) circulantes foram menores nas vacas estressadas pelo calor, indicando baixa mobilização de tecido adiposo deste grupo (Rhoads *et al.*, 2009, Wheelock *et al.*, 2010). Já o hormônio insulina apresenta maior concentração plasmática nos animais em estresse térmico pelo calor, mesmo havendo baixa concentração de glicose (Wheelock *et al.*, 2010 e Baumgard *et al.*, 2011).

Em um quadro de restrição alimentar, o esperado seria hipoglicemia e consequente hipoinsulinemia, como observado no BEN fisiológico que ocorre no pós-parto (Rhoads *et al.*, 2009), porém, o estresse térmico pelo calor induz alterações no metabolismo que resultaram em hiperinsulinemia (Wheelock *et al.*, 2010). Devido a ação lipogênica da insulina, há redução na mobilização do tecido adiposo, reduzindo a liberação de AGNEs na circulação (Wheelock *et al.*, 2010). Em animais sob estresse

térmico pelo calor as concentrações plasmáticas de somatotropina também estão reduzidas (Rhoads *et al.*, 2010). Como a somatotropina estimula a mobilização de lipídios e inibe a ação da insulina, sua baixa concentração favorece o aumento de insulina e a redução de AGNEs (Rhoads *et al.*, 2010).

Como consequência da baixa mobilização de lipídios, a menor concentração de AGNES limita a disponibilidade de substrato energético para o tecidos periféricos (Rhoads *et al.*, 2011). Para suprir esta demanda energética, há o aumento da atividade metabólica no fígado para formação de glicose a partir do glicogênio, através da glicogenólise (Rhoads *et al.*, 2011).

Outro mecanismo utilizado para suprir a deficiência de energia é a neoglicogênese, via metabólica hepática em que aminoácidos são deaminados para produção de glicose (Jorritsma *et al.*, 2003). Vacas sob estresse térmico pelo calor apresentaram maior concentração de nitrogênio ureico plasmático do que o grupo “pair-fed” (Wheelock *et al.*, 2010), indicando efeito do estresse térmico sobre o catabolismo proteico.

Em teste de tolerância a glicose, animais sob estresse térmico apresentam maior concentração de insulina e redução mais acentuada de glicose após a infusão de glicose exógena, indicando a preferência à glicose pelos tecidos periféricos (Wheelock *et al.*, 2010). Como na vaca em estresse térmico pelo calor há pouca disponibilidade de AGNEs e corpos cetônicos, os tecidos não mamários utilizam a glicose como fonte energética, reduzindo sua disponibilidade para a produção de leite na glândula mamária (Xie *et al.*, 2016). Com a redução na disponibilidade de glicose para a glândula mamária, ocorre redução na produção de lactose (duas moléculas de glicose) o que leva a redução na produção de leite, uma vez que a molécula é a principal responsável pelo volume do leite produzido (Herdt, 2000 e Rhoads *et al.*, 2009).

Além da redução do volume de leite produzido, o estresse térmico pelo calor também afeta a composição do leite. Vacas submetidas ao estresse térmico pelo calor apresentaram redução da lactose (Baungard *et al.*, 2011) e proteína do leite em comparação ao grupo “pair-fed” (Rhoads *et al.*, 2009). Este resultados podem ser reflexo da menor concentração de glicose e maior metabolização de proteína para suprir o déficit energético.

Nota-se que vacas sob BEN devido ao estresse térmico pelo calor apresentam alterações metabólicas contrárias ao observado em vacas em quadro de BEN

fisiológico pós-parto. O mecanismo pelo qual as células pancreáticas se tornam mais sensíveis à glicose, resultando em maiores concentrações de insulina circulante e consequente redução na mobilização de lipídios ainda não está claro (Wheelock *et al.*, 2010 and Baumgard *et al.*, 2011).

2.3.4 Estresse térmico pelo calor e fertilidade da fêmea bovina

Além dos impactos na produção e metabolismo, o estresse térmico pelo calor leva à redução na fertilidade, principalmente em vacas leiteiras. A análise de um banco de dados de fazendas Israelenses sobre taxa de concepção entre 45 e 50 dias após inseminação artificial, de 70.885 primíparas e 143.490 múltiparas da raça Holandesa, mostrou redução de 44,4% e 38,8% no inverno para 14,6% e 11,3% no verão, respectivamente (Zeron *et al.*, 2001). Avaliando dados de 7.252 vacas da raça Holandesa na Alemanha, Schüller *et al.* (2014) encontraram redução da taxa de concepção de 38% para até 12% quando os animais foram expostos a ITU médio a partir de 73 por, no mínimo, uma hora entre os dias -21 a -1 em relação à data da inseminação. No Estado de Minas Gerais, também com vacas da raça Holandesa, Pereira *et al.* (2013) verificaram menor taxa de concepção (36,8% vs 17,0%) quando as fêmeas experimentaram duas ou mais ocorrências de temperatura retal superior a 39,1°C nos dias -3, -2, 0 e 7 em relação à inseminação artificial.

Vacas 3/4 Holandês x Gir apresentaram maior percentual de animais com temperatura retal $\geq 39,3^\circ\text{C}$ e menor taxa de concepção na estação seca, em relação à chuvosa (Costa *et al.*, 2015). Nesse mesmo trabalho, animais 1/2 Holandês não apresentaram diferença para temperatura retal e na taxa de concepção entre as estações, e apresentaram menor temperatura retal e maior taxa de concepção na estação seca, em relação aos animais 3/4 Holandês (Costa *et al.*, 2015).

A recuperação da taxa de concepção tem sido demonstrada em trabalhos que utilizam a transferência de embriões, do dia 7-8 de desenvolvimento, produzidos *in vitro* ou *in vivo* (Baruselli *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2011). Estes resultados apontam que as primeiras etapas do desenvolvimento do embrião pré-implantação são críticos para a resistência ao estresse térmico pelo calor e competência em gerar uma gestação.

2.3.4.1 Estresse térmico pelo calor no desenvolvimento embrionário

Além dos efeitos metabólicos do estresse térmico pelo calor, a hipertermia é capaz de alterar a função celular. Para estudar o efeito do estresse térmico pelo calor sobre as diferentes fases do desenvolvimento embrionário inicial, tem-se utilizado o modelo de choque térmico *in vitro*. Nesse modelo, durante o processo de produção *in vitro* de embriões, o grupo desafiado é exposto a elevadas temperaturas (geralmente entre 40 e 41°C) por tempo determinado (geralmente de 9 a 12h) em fases específicas do desenvolvimento embrionário que se pretende estudar (Paula-Lopes e Hansen 2002; Ortega *et al.*, 2016; Ascari *et al.*, 2017; Rodriguez *et al.*, 2019).

Oócitos submetidos ao choque térmico, durante a etapa de maturação, tem demonstrado redução na capacidade de alcançar o estágio de blastocisto, com aumento na taxa de apoptose celular, e redução da qualidade embrionária (Ascari *et al.*, 2017; Rodriguez *et al.*, 2019). O uso da embriocina IGF-I (Ascari *et al.*, 2017) e de exossomos do fluido folicular (Rodriguez *et al.*, 2019) mostra que o ambiente folicular possui mecanismos capazes de reverter os danos causados pelo choque térmico durante a etapa da maturação.

Em relação ao desenvolvimento embrionário após a fecundação, zigotos expostos ao choque térmico de 40°C por 12h horas (início 8h após a fecundação) tiveram reduzido potencial de desenvolverem ao estágio de blastocisto, no dia 7 do cultivo (Ortega *et al.*, 2016). Choque térmico de 40°C por 24 horas a partir de 8h após a inseminação reduziu a taxa de blastocisto, mas o mesmo não foi observado quando o estresse foi aplicado entre 116 e 140 horas após a inseminação (Sakatani *et al.*, 2003; Sakatani *et al.*, 2012). Aplicando choque térmico de 41°C por 12h em embriões no dia 0 (12 h pós-inseminação), no dia 2 (48h pós-inseminação) ou no dia 4 (96h pós-inseminação) do desenvolvimento embrionário, Eberhardt *et al.* (2009) observaram que embriões submetidos ao choque térmico no dia 4 foram mais competentes em alcançarem o estágio de blastocisto, indicando aumento da resistência ao choque térmico com a progressão do desenvolvimento.

Choque térmico de 41°C por 12h em embriões com mais de 16 células das raças Nelore, Holandês e Girolando F1 (Holandês x Gir) reduziu a formação de blastocistos, independente da raça (Satrapa *et al.*, 2011). Contudo, a redução foi menos expressiva nos embriões da raça Nelore (Satrapa *et al.*, 2011). Sob mesma

forma de estresse, embriões das raças Jersey e Nelore apresentaram menor expressão dos genes *PLAC8* e *CDX2*, genes expressos no trofotoderma embrionário, importantes para a formação da placenta (Silva *et al.*, 2013). Em acordo com esses achados, embriões da raça Angus submetidos ao mesmo choque térmico apresentaram tendência em menor taxa de concepção em relação aos embriões não desafiados (Silva *et al.*, 2013).

O estresse térmico nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário pré-implantação reduz a competência do embrião em desenvolver e estabelecer gestação (Satrapa *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013). Também, observa-se que os efeitos ocorrem em embriões de origem taurina e zebuína, sendo mais evidentes nos de origem taurina (Silva *et al.*, 2013).

2.3.4.2 Estresse térmico pelo calor na apoptose celular

Por meio da técnica de TUNEL é possível marcar DNA lesionado no núcleo celular, permitindo identificar células em processo de morte por apoptose ou necrose. Embriões de duas células, coletados entre 28-30h de cultivo não apresentam aumento no percentual de células TUNEL-positivas e de atividade da Caspase grupo II (inclui caspases 2, 3 e 7) 24 h após o choque térmico, enquanto que embriões com mais de 16 células, coletados no dia cinco, apresentam maior percentual de células TUNEL-positivas e de atividade da Caspase grupo II (Paula-Lopez e Hansen, 2002).

A indução de apoptose pelo choque térmico, ou pela adição de fator de necrose tumoral α (TNF α) ao meio de cultivo de embriões bovinos no dia seis do desenvolvimento, levou ao aumento do percentual de células TUNEL-positivas e à ativação da Caspase-9 (Loureiro *et al.*, 2007). A adição de z-LEHD-fmk, inibidor da Caspase-9, ao meio de cultivo levou à redução da atividade da Caspase-9 e do percentual de células TUNEL-positivas ao mesmo patamar que o apresentado por embriões não desafiados e não expostos ao inibidor (Loureiro *et al.*, 2007). A inibição da Caspase grupo II, por meio do z-DEVD-fmk, em embriões com mais de 16 células submetidos ao choque térmico de 41°C por 9h levou à redução da atividade caspase e do percentual de células TUNEL-positivas e a redução no percentual de blastocistos no dia oito. Essa redução foi mais intensa do que a redução provocada pelo choque térmico sem o inibidor (Paula-Lopes e Hansen, 2002b). Esses resultados apontam que a lesão de DNA, evidenciada pela técnica de TUNEL em embriões desafiados por

agentes estressores, ocorre por meio de apoptose celular e essa resposta é importante para manutenção do desenvolvimento embrionário após o desafio com o agente extressor.

Paula-Lopes e Hansen (2002) realizaram uma série de experimentos para avaliarem o momento do desenvolvimento embrionário em que o estresse térmico é capaz de induzir a apoptose celular. Embriões nos estádios de duas células (28-30h pós-inseminação), quatro células (37-39h pós-inseminação) ou oito a 16 células no dia três do cultivo não apresentaram aumento do percentual de células TUNEL-positivas 24 horas após choque térmico de 41°C por 9h (Paula-Lopes e Hansen, 2002). Já embriões de oito a 16 células, coletados do dia quatro, e com mais de 16 células, coletados no dia cinco do cultivo, expostos às mesmas condições de estresse descritas anteriormente, apresentaram aumento no percentual de células TUNEL-positivas e redução do número de células 24h após o estresse (Paula-Lopes e Hansen, 2002). Em adição, embriões em estágio de duas células não apresentaram ativação da caspase II, enquanto que embriões com mais de 16 células (28-30h pós-inseminação) apresentaram maior atividade desta enzima da cascata de apoptose celular, quando comparado com embriões não estressados (Paula-Lopes e Hansen, 2002). Esses resultados indicam que a indução a apoptose celular pelo estresse térmico está relacionada ao estágio e ao dia do desenvolvimento embrionário.

Conforme o desenvolvimento embrionário avança, o embrião aumenta sua capacidade de responder ao desafio com choque térmico, com aumento da apoptose celular (Paula-Lopez e Hansen, 2002; Loureiro *et al.*, 2007). Paralelamente, o embrião também aumenta sua resistência ao estresse térmico pelo calor, melhorando sua competência em desenvolver ao estágio de blastocisto (Eberhardt *et al.*, 2009; Sakatani *et al.*, 2012), indicando que a apoptose é um mecanismo de defesa do embrião que possibilita o desenvolvimento embrionário.

O ambiente uterino parece modular a resposta do embrião frente ao estresse térmico pelo calor. Moléculas secretadas por células do trato reprodutor, tais como o fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) e o CSF2, apresentam ação anti-apoptótica quando presentes na maturação oocitária ou cultivo embrionário *in vitro*, durante o choque térmico (Loureiro *et al.*, 2011a; Ascari *et al.*, 2017). Porém, ainda há

necessidade de se investigar se embriocinas são capazes de modular o desenvolvimento de embriões previamente afetados pelo estresse térmico pelo calor.

2.3.5 Estresse térmico pelo calor na programação fetal

O estresse térmico pelo calor também tem ação sobre a programação fetal, uma vez que sua ação no período do desenvolvimento gestacional induz modificações em bezerros, e que podem ser observadas ao longo da vida produtiva (Monteiro *et al.*, 2016b).

Informações relacionadas aos efeitos do estresse térmico pelo calor, aplicado nos terços inicial e médio da gestação, sobre o posterior desempenho da bezerra, ainda são escassos. A análise retrospectiva de dados de dez anos, oriundos de oito fazendas distribuídas em três estados dos EUA, mostrou que vacas que foram concebidas durante o verão produziram significativamente menos leite em sua primeira lactação, quando comparado com aquelas que foram concebidas no inverno (Brown *et al.*, 2016).

A ação do estresse térmico pelo calor no terço final de gestação e período seco afetou o desenvolvimento final do concepto. A gestação de vacas não resfriadas no período seco, durante a época de verão, foi menor quatro e sete dias em relação àquelas resfriadas. Também, seus bezerros nasceram, em média, seis a 13 Kg mais leves e apresentaram menor peso à desmama, em relação aos bezerros de vacas resfriadas no final da gestação (do Amaral *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2016b). Em análise de dados de cinco anos de estudo sobre estresse térmico pelo calor no período seco, vacas sob estresse tiveram taxa de 4,1% de natimortos, enquanto que vacas resfriadas não apresentaram natimortos (Monteiro *et al.*, 2016b).

Devido ao tipo epiteliocorial da placenta bovina, não ocorre passagem de anticorpos para o concepto durante a gestação (Bessi *et al.*, 2002). O colostro é a principal fonte de anticorpos e células imunes, permitindo que o neonato adquira proteção. A capacidade máxima de absorção da imunidade passiva se dá até seis horas após o parto, terminando ao final das primeiras 48h após o parto (Bessi *et al.*, 2002).

Não foi observado diferença na qualidade de colostro de vacas resfriadas e vacas submetidas ao estresse térmico pelo calor durante o período seco (Monteiro *et*

al., 2014). Contudo, além de nascerem mais precocemente e menor peso vivo, bezerros de vacas submetidas ao estresse térmico pelo calor apresentam menor capacidade de absorção de imunoglobulinas do colostro (Tao *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2014). Esse resultado demonstra que apesar da vaca sob estresse térmico produzir colostro de boa qualidade, o seu bezerro terá menor competência para adquirir a imunidade passiva e será menos resistente aos desafios ambientais. Bezerros de vacas resfriadas apresentaram rápida redução de glicose e insulina plasmática, após teste de tolerância à glicose e desafio com insulina, indicando que o estresse térmico no ambiente uterino resulta em maior sensibilidade sistêmica dos bezerros à insulina (Tao *et al.*, 2012).

Os efeitos do estresse térmico pelo calor intrauterino, na fase final da gestação, também são observados pós desmame e na vida produtiva. Bezerras filhas de vacas em estresse térmico pelo calor durante o terço final de gestação, foram mais leves aos 56 dias de idade, ingeriram menos alimentos entre cinco e oito semanas de vida, tiveram maior concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados e de beta hidroxibutirato, e maior absorção de glicose após teste de tolerância à glicose, indicando que as alterações observadas no metabolismo energético persistem após o desmame (Monteiro *et al.*, 2016a). Embora tenham apresentado mesmo ganho de peso, filhas de vacas não resfriadas no terço final de gestação permaneceram mais leves até 12 meses de idade, apresentaram maior número de inseminações por concepção, e produziram menos leite em 35 semanas de lactação ($26,8 \pm 1,7$ vs $31,9 \pm 1,7$ L/d), em relação às filhas de vacas resfriadas no período seco (Monteiro *et al.*, 2016b).

As alterações induzidas pelo estresse térmico parecem estar relacionadas à programação epigenética, uma vez que foram transmitidas para a progênie (Laporta *et al.*, 2018). A netas de vacas não resfriadas durante o período seco no verão produziram, em média, menos 3,7 e 6,5 Kg de leite/dia, em relação às netas de vacas resfriadas, durante a primeira e a segunda lactação, respectivamente (Laporta *et al.*, 2018).

A avaliação da microestrutura da glândula mamária revelou que filhas de vacas sob estresse térmico, no final da gestação, apresentam o mesmo número de alvéolos glandulares, porém, a área foi 46% menor em relação às filhas de vacas resfriadas

(Skibieli *et al.*, 2018). Também foi observado que vacas que passaram por estresse térmico, quando na fase intrauterina, apresentaram maior proporção de tecido conectivo, o que pode explicar seu menor desempenho na produção de leite (Skibieli *et al.*, 2018).

Nota-se que além dos efeitos no início do desenvolvimento embrionário (Ascari *et al.*, 2017; Rodriguez *et al.*, 2019), o estresse térmico pelo calor nas mães induz a alterações no conceito que podem refletir no seu desenvolvimento pós-natal, na sua capacidade produtiva e que pode ser transmitida para próximas gerações (Monteiro *et al.*, 2016b; Laporta *et al.*, 2018). Portanto, o estresse térmico pelo calor materno se mostra prejudicial ao desenvolvimento embrionário e fetal em todas as etapas da gestação.

2.5 Referências Bibliográficas

ABDELATTY, A.M.; IWANIUK, M.E.; POTTS, S.B.; GAD, A. Influence of maternal nutrition and heat stress on bovine oocyte and embryo Development. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. v. 6, P. S1-S5, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.01.005>.

AMARAL, B.C.; CONNOR, E.E.; TAO, S.; HAYEN, J.; BUBOLZ, J.; DAHL, G.E. Heat-stress abatement during the dry period: Does cooling improve transition into lactation? *Journal of Dairy Science*. v.92, p. 5988–5999, 2009. DOI: 10.3168/jds.2009-2343.

ARMSTRONG, D. V. Heat Stress Interaction with Shade and Cooling in: symposium: nutrition and heat stress. *Journal of Dairy Science*. v.77, p.2044-2050, 1994. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77149-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77149-6).

ASCARI, I.J.; ALVES, N.G.; JASMIN, J.; LIMA, R.R.; QUINTÃO, C.C.R.; OBERLENDER, G.; MORAES, E.A.; CAMARGO, L.S.A. Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. *Domestic Animal Endocrinology*. v. 60, p. 50-60, 2017. DOI: 10.1016/j.domaniend.2017.03.003.

AZEVEDO, M.; PIRES, M.F.Á.; SATURMINO, H.M.; LANA, Â.M.Q.; SAMPAIO, I.B.M.; MONTEIRO, J.B.N.; MORATO, L.E. Estimation of upper critical levels of the temperature-humidity index for 1/2, 3/4 and 7/8 lactating Holstein-Zebu dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 34, p. 2000-2008, 2005. DOI: 10.1590/S1516-35982005000600025.

BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; RODRIGUES, C.A.; BÔ, G.A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*. v.76, p. 1583–1593, 2011. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.006.

- BALLARE´, C.; CASTELLANO, G.; GAVEGLIA, L.; ALTHAMMER, S.; GONZÁLEZ-VALLINAS, J.; EYRAS, E.; LE DILY, F.; ZAURIN, R.; SORONELLAS, D.; VICENT, G.P.; BEATO, M. Nucleosome-driven transcription factor binding and gene regulation. *Molecular Cell*, v.49, p.1–13, 2013.
- BAUMGARD, L.H.; WHEELLOCK, J.B.; SANDERS, S.R.; MOORE, C.E.; GREEN, H.B.; WALDRON, M.R.; RHOADS, R.P. Post absorptive carbohydrate adaptations to heat stress and monensin supplementation in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. v.94, p. 5620–5633, 2011. DOI: 10.3168/jds.2011-4462.
- BERMAN, A. Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science*. v. 83, p. 1377–1384, 2005. DOI: 10.2527/2005.8361377x.
- BERMAN, A. Tissue and external insulation estimates and their effects on prediction of energy requirements and of heat stress. *Journal of Dairy Science*. v. 87, p. 1400-1412, 2004. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73289-0.
- BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 107, p. 3394–3399, 2010. DOI: 10.1073/pnas.0913843107.
- BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. Transcriptional sexual dimorphism during preimplantation embryo development and its consequences for developmental competence and adult health and disease. *Reproduction*. v. 141, p. 563–570, 2011. DOI: 10.1530/REP-10-0482.
- BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*. v.4, p. 1167-1183, 2010. DOI: 10.1017/S175173111000090X.
- BERRY, J. L.; SHANKLIN, M. D.; JOHNSON, H. D. Dairy shelter design based on milk production decline as affected by temperature and humidity. *Transactions of the ASAE*, v.7, p. 0329-0331, 1964. DOI: 10.13031/2013.40772.
- BESSI, R.; PAULETTI, P.; D´ARCE, R. D.; NETO R. M. Absorção de Anticorpos do Colostro em Bezerros. I. Estudo no Intestino Delgado Proximal. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.31, p.2314-2324, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982002000900021>.
- BLOMEN, V.A.; BOONSTRA, J.E.; Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v.68, p.27-44, 2011. DOI: 10.1007/s00018-010-0505-5.
- BOGLIOTTI, Y.S.; CHUNG, N.; PAULSON, E.; CHITWOOD, J.; HALSTEAD, M.; KERN, C.; SCHULTZ, R.M.; ROSS, P.J. Transcript profiling of bovine embryos implicates specific transcription factors in the maternal-to-embryo transition. *Biology of Reproduction*. ioz209, 2019. DOI:<https://doi.org/10.1093/biolre/ioz209>.
- BROWN, B.M.; STALLINGS, J.W.; CLAY, J.S.; RHOADS, M.L. Periconceptional heat stress of holstein dams is associated with differences in daughter milk production

during their first lactation. *PLoS ONE*. v. 11, p. e0148234. DOI:10.1371/journal.pone.0148234.

BURFEIND, O.; SUTHAR, V.S.; VOIGTSBERGER, R.; BONK, S.; HEUWIESER, W. Validity of prepartum changes in vaginal and rectal temperature to predict calving in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v.94, p. 5053–5061, 2011. DOI: 10.3168/jds.2011-4484.

COLLIER, R. J.; HALL, L. W.; RUNGRUANG, S.; ZIMBLEMAN, R. B. Quantifying heat stress and its impact on metabolism and performance. In: 23rd Annual Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, Florida. v. 68, 2012.

COLLIER, R. J.; ZIMBELMAN, R. B.; RHOADS, R. P.; RHOADS, M. L.; BAUMGARD, L. H. A. Re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. *Western Dairy Management Conference*. p. 113-125, 2009.

COSTA, A.N.L.; FEITOSA, J.V.; MONTEZUMA, J.R. P.A.; DE SOUZA, P.T.; ARAÚJO, A.A. Hormonal profiles, physiological parameters, and productive and reproductive performances of Girolando cows in the state of Ceará - Brazil. *International Journal of Biometeorology*. v. 59, p. 231-236, 2014. DOI: 10.1007/s00484-014-0838-0.

COSTA, A.N.L.; FEITOSA, J.V.; MONTEZUMA, J.R. P.A.; DE SOUZA, P.T.; ARAÚJO, A.A. Rectal temperatures, respiratory rates, production, and reproduction performances of crossbred Girolando cows under heat stress in northeastern Brazil. *International Journal of Biometeorology*. v. 59, p. 1647-53, 2015. DOI: 10.1007/s00484-015-0971-4.

DASH, S.; CHAKRAVARTY, A. K.; SAH, V.; JAMUNA, V.; BEHERA, R.; KASHYAP, N.; DESHMUKH, B. Influence of temperature and humidity on pregnancy rate on murrh buffaloes under subtropical climate. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, v. 28, p. 943-950, 2015. DOI: 10.5713/ajas.14.0825.

DAVILA, K.M.S.; HAMBLIN, H.; HANSEN, P.J.; DIKMEN, S.; OLTENACU, P.A.; MATEESCU, R.G. Genetic parameters for hair characteristics and core body temperature in a multibreed Brahman–Angus herd. *Journal of Animal Science*. v. 97, p. 3246–3252, 2019. DOI: 10.1093/jas/skz188.

DE MORAES, A.A.S.; HANSEN, P.J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1060–1065, 1997. DOI: 10.1095/biolreprod57.5.1060.

DOBBS, K.B.; GAGNÉ, D.; FOURNIER, E.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; BLOCK, J.; SIRARD, M.A.; BONILLA, L.; EALY, A.D.; LOUREIRO, B.; HANSEN, P.J. Sexual dimorphism in developmental programming of the bovine preimplantation embryo caused by colony-stimulating factor 2. *Biology of Reproduction*. v. 91, 2013 a. DOI: 10.1095/biolreprod.114.121087.

DOBBS, K.B.; RODRIGUEZ, M.; SUDANO, M.J.; ORTEGA, M.S.; HANSEN, P.J. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PloS One*. v. 8, p.e66230, 2013b. DOI: 10.1371/journal.pone.0066230.

DIKMEN, S.; HANSEN, P.J. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *Journal of Dairy Science*, v.92, p.109-116, 2009. DOI: 10.3168/jds.2008-1370.

DIKMEN, S.; MATEESCU, R.G.; ELZO, M.A.; HANSEN, P.J. Determination of the optimum contribution of Brahman genetics in an Angus-Brahman multibreed herd for regulation of body temperature during hot weather. *Journal of Animal Science*. v. 96, p. 2175–2183, 2018. DOI: 10.1093/jas/sky133.

EBERHARDT, B.G.; SATRAPA, R.A.; CAPINZAIKI, C.R.L.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Animal Reproduction Science*. v. 114, p. 54–61, 2009. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.09.008.

FAULK, C.E.; DOLINOY, D.C. Timing is everything the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics*, v.6, p.791-797, 2011. DOI: 10.4161/epi.6.7.16209.

GODYŃ, D.; HERBUT, P.; ANGRECKA, S. Measurements of peripheral and deep body temperature in cattle – A review. *Journal of Thermal Biology*. v.79, p. 42-49, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.011>.

GRAF, A.; KREBS, S.; ZAKHARTCHENKO, V.; SCHWALB, B.; BLUMA, H.; WOLF, E. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *PNAS*. v. 111, p. 4139-44, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1321569111
[doi/10.1073/pnas.1321569111](https://doi.org/10.1073/pnas.1321569111).

GROSS, N.; KROPP, J.; KHATIB, H. Sexual dimorphism of miRNAs secreted by bovine in vitro-produced embryos. *Frontiers in Genetic*. v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fgene.2017.00039.

GUIBERT, S.; FORNE´, T.; WEBER, M. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Research*. v.22, p.633–641, 2012. DOI: 10.1101/gr.130997.111.

HANSEN, P.J. Challenges to fertility in dairy cattle: from ovulation to the fetal stage of pregnancy. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, p.229-238, 2011.

HANSEN, P.J.; DENICOL, A.C.; DOBBS, K.B. Maternal embryokines that regulate development of the bovine preimplantation embryo. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. v. 38, p. 589-598, 2014. DOI: 10.3906/vet-1405-96.

HERAS, S.; DE CONINCK, D.I.M.; VAN POUCKE, M.; GOOSSENS, K.; BOGADO PASCOTTINI, O., VAN NIEUWERBURGH, F.; VAN SOOM, A. Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. *BMC Genomics*. v. 17, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2393-z>.

HERDT, T.H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice*. v.16, n.2, p. 215-230, 2000. DOI: 10.1016/s0749-0720(15)30102-x.

INOUE, A.; ZHANG, Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science*. v.334, 1-3, 2011. DOI: 10.1126/science.1212483.

JORRITSMA, R.; WENSING, T.; KRUIP, T.A.M.; Peter, L.A.M.; Jos, V.; NOORDHUIZEN, P.T.M. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Veterinary Research*, v.34, p.11-26, 2003. DOI: 10.1051/vetres:2002054.

KANNAMPUZHA-FRANCIS, J.; DENICOL, A.C.; LOUREIRO, B.; KANIYAMATTAM, K.; ORTEGA, M.S.; HANSEN, P.J. Exposure to colony stimulating factor 2 during preimplantation development increases postnatal growth in cattle. *Molecular Reproduction & Development*. v.82, p. 892–897, 2015. DOI: 10.1002/mrd.22533.

KAUFMAN, J.D.; SAXTON, A.M.; RÍUS, A.G. Short communication: Relationships among temperature-humidity index with rectal, udder surface, and vaginal temperatures in lactating dairy cows experiencing heat stress. *Journal of Dairy Science*. v. 101, p. 1–6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13799>.

KENDALL, P.E.; WEBSTER, J.R. Season and physiological status affects the circadian body temperature rhythm of dairy cows. *Livestock Science*. v. 125, p. 155–160, 2009. DOI:10.1016/j.livsci.2009.04.004.

KIMURA, K.; IWATA, H.; THOMPSON, J.G. The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos. *Animal Reproduction Science*. v. 103, p. 228–238, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.12.014>.

LAPORTA, F. C.; FERREIRA, DADO-SENN, B.; VRIES, A.D.; DAHL, G.E. Dry period heat stress reduces dam, daughter, and granddaughter productivity. *Journal of Dairy Science*. v.101, Suppl. 2, 2018.

LIANG, D.; WOOD, C.L.; MCQUERRY, K.J.; RAY, D.L.; CLARK, J.D.; BEWLEY, J.M. Influence of breed, milk production, season, and ambient temperature on dairy cow reticulorumen temperature. *Journal of Dairy Science*. v. 96, p. 5072–5081, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6537>.

LOUREIRO, B.; BONILLA, L.; BLOCK, J.; FEAR, J.M.; BONILLA, A.Q.S.; HANSEN, P.J. Colony-stimulating factor 2 (CSF-2) improves development and posttransfer survival of bovine embryos produced in vitro. *Endocrinology*. v. 150, p. 5046–5054, 2009. DOI: 10.1210/en.2009-0481.

LOUREIRO, B.; BLOCK, J.; FAVORETO, M.G.; CARAMBULA, S.; PENNINGTON, K.A.; EALY, A.D.; HANSEN, P.J. Consequences of conceptus exposure to colony-stimulating factor 2 on survival, elongation, interferon-t secretion, and gene expression. *Reproduction*. v. 141, p. 617–624, 2011 b. DOI: 10.1530/REP-10-0511.

LOUREIRO, B. BRAD, A.M.; HANSEN, P.J. Heat shock and tumor necrosis factor- α induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9-dependent mechanism. *Reproduction*. v. 133, p. 1129–1137, 2007. DOI: 10.1530/REP-06-0307.

LOUREIRO, B.; OLIVEIRA, L.J.; FAVORETO, M.G.; HANSEN, P.J. Colony-stimulating factor 2 inhibits induction of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *American*

Journal of Reproductive Immunology. v. 65, p. 578–588, 2011 a. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2010.00953.x.

MONTEIRO, A. P. A.; TAO, S.; THOMPSON, I. M.; DAHL, G. E. Effect of heat stress during late gestation on immune function and growth performance of calves: Isolation of altered colostrum and calf factors. *Journal of Dairy Science*, v.97, p. 6426–6439, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7891>.

MONTEIRO, A.P.A.; GUO, J.R.; WENG, X.S.; AHMED, B.M.; HAYEN, M.J.; DAHL, G.E.; BERNARD, J.K.; TAO, S. Effect of maternal heat stress during the dry period on growth and metabolism of calves. *Journal of Dairy Science*. v. 99, p. 3896–3907, 2016a. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10699>.

MONTEIRO, A.P.A.; TAO, S.; THOMPSON, I.M.T.; DAHL, G.E. In utero heat stress decreases calf survival and performance through the first lactation. *Journal of Dairy Science*. v.99, p. 8443–8450, 2016b. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11072>.

NABENISHI, H.; OHTA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZAWA, K.; TSUZUKI, Y. Effect of the temperature-humidity index on body temperature and conception rate of lactating dairy cows in southwestern Japan. *Journal of Reproduction Development*. v. 57, p. 450-456, 2011a. DOI: 10.1262/jrd.10-135t.

ORTEGA, M.S.; ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; MINGOTI, G.Z.; ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Modification of embryonic resistance to heat shock in cattle by melatonin and genetic variation in *HSPA1L*. *Journal of Dairy Science*. v. 99, p. 9152–9164, 2016. DOI: 10.3168/jds.2016-11501.

OKANO, M.; BELL, D.W.; HABER, D.A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. v.99, p. 247–257, 1999. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81656-6.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of Reproduction*. v. 66, p. 1169–1177, 2002 a. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolreprod/66.4.1169>.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 295, p. 37–42, 2002 b. DOI: 10.1016/s0006-291x(02)00619-8.

PEREIRA, M.H.; RODRIGUES, A.D.; MARTINS, T.; OLIVEIRA, W.V.; SILVEIRA, P.S.; WILTBANK, M.C.; VASCONCELOS, J.L. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. *Journal of Dairy Science*. v. 96, p. 6904 – 6914, 2013. DOI:<https://doi.org/10.3168/jds.2012-6260>.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTE, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. v. 293, p. 1089-1093, 2001. DOI: 10.1126/science.1063443.

RHOADS, M.L.; RHOADS, R.P.; VANBAALE, M.J.; COLLIER, R.J.; SANDERS, S.R.; WEBER, W. J.; CROOKER, B. A.; BAUMGARD, L. H. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of

circulating somatotropin. *Journal of Dairy Science*. v.92, p. 1986-1997, 2009. DOI: 10.3168/jds.2008-1641.

RHOADS, M.L.; RHOADS, R.P.; VANBAALE, M.J.; COLLIER, R.J.; SANDERS, S.R.; WEBER, W. J.; CROOKER, B. A.; BAUMGARD, L. H. Effects of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. *Journal of Dairy Science*. v. 93, p. 170–179, 2010. DOI: 10.3168/jds.2009-2469.

RHOADS, R.P.; La Noce, A.J.; BAUMGARD, L. H.; Wheelock, J.B. *Short communication*: Alterations in expression of gluconeogenic genes during heat stress and exogenous bovine somatotropin administration. *Journal of Dairy Science*, v.94, p. 1917–1921, 2011. DOI: 10.3168/jds.2010-3722.

RODRIGUES, T.A.; TUNA, K.M.; ALLI, A.A.; TRIBULO, P.; HANSEN, P.J.; KOH, J.; PAULA-LOPES, F.F. Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock. *Reproduction, Fertility and Development*. v. 31, p. 888-897, 2019. DOI: 10.1071/RD18450.

ROSS, P.J.; RAGINA, N.P.; RODRIGUEZ, R.M.; IAGER, A.E.; SIRIPATTARAPRAVAT, K.; LOPEZ-CORRALES, N.; CIBELLI, J.B. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction*. v. 136, p. 777-785, 2008. DOI: 10.1530/REP-08-0045.

RUAS, J.R.M.; DA SILVA, E.A.; QUEIROZ, D.S.; PEREIRA, M.E.G.; JÚNIOR, J.A.G.S.; SANTOS, M.D.; JÚNIOR, V.R.R.; DA COSTA, M.D. Lactation productive characteristics of four genetic groups F1 Holstein x Zebu. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. v. 21, p. 33-37, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.014>.

SAKATANI, M.; ALVAREZ, N.V.; TAKAHASHI, M.; HANSEN, P.J. Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. *Journal of Dairy Science*. v. 95, p. 3080–3091, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4986>.

SAKATANI, M.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*. v.67, p. 77–82, 2004. DOI: 10.1002/mrd.20014.

SALLES, M.S.V.; SILVA, S.C.; SALLES, F.A.; ROMA JR, L.C.; FARO, L.E.; LEAN, P.A.B.M.; OLIVEIRA, C.E.L.; MARTELLO, L.S. Mapping the body surface temperature of cattle by infrared thermography. *Journal of Thermal Biology*. v. 62, p. 63–69, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.10.003>.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTHER, J.N.; PARRISH, J.J.; WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*. v. 85, p.2803–2812, 2002. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1.

SATRAPA, R.A.; NABHANA, T.; SILVA, C.F.; SIMÕES, R.A.L.; RAZZA, E.M.; PUELKER, R.Z.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Influence of sire breed (*Bos indicus*

versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. v. 76, p. 1162–1167, 2011. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.026.

SCOTT, G. H. What is animal stress and how is it measured? *Journal of Animal Science*, v.52, p. 150-153, 1981. DOI: 10.2527/jas1981.521150x.

SCHÜLLER, L. K.; BURFEIND, O.; HEUWIESER, W. Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature–humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology*, v.81, p.1050–1057, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.029>.

SENGER, P.L. Early embryogenesis and maternal recognition of pregnancy. In: SENGER, P.L. Pathways to pregnancy and parturition. 2° ed. United States of America: Cadmus Professional Communications. p. 284-303, 2003.

SEISENBERGER, S.; PEAT, J.R.; HORE, T. A.; SANTOS, F.; DEAN. W.; REIK, W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philosophical Transactions the Royal Society of London Biology Science*. v.5, p. 1-11, 2012. DOI: 10.1098/rstb.2011.0330.

SILVA, C.F.; SARTORELLI, E.S.; CASTILHO, A.C.S.; SATRAPA, R.A.; PUELKER, R.Z.; RAZZA, E.M; TICIANELLI, J.S.; EDUARDO, H.P.; LOUREIRO, B.; BARROS, C.M. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology*. v. 79, p. 351–357, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.003>.

SIQUEIRA, L.G.; HANSEN, P.J. Sex differences in response of the bovine embryo to colony-stimulating factor 2. *Reproduction*. v.152, p. 645-654, 2016. DOI: 10.1530/REP-16-0336.

SIQUEIRA, L.G.; TRÍBULO, P.; CHEN, Z.; DENICOL, A.C.; ORTEGA, M.S.; NEGRÓN-PÉREZ, V.M.; KANNAMPUZHA-FRANCIS, J.; POHLER, K.G.; RIVERA, R.M.; HANSEN, P.J. Colony-stimulating factor 2 acts from days 5 to 7 of development to modify programming of the bovine conceptus at day 86 of gestation. *Biology of Reproduction*. v. 96, p. 743–757, 2017. DOI: 10.1093/biolre/iox018.

SJÖBLOM, C.; ROBERTS, C.T.; WIKLAND, M.; ROBERTSON, S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. *Endocrinology*. v. 146, p. 2142–2153, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1210/en.2004-1260>.

SPENCER, T.E.; SANDRA, O.; GENES, E.W. Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*. v. 135, p. 165–179, 2008. DOI: 10.1530/REP-07-0327.

SPENCER, T.E.; FORDE, N.; LONERGAN, P. Insights into conceptus elongation and establishment of pregnancy in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 29, p. 84–100, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/RD16359>.

STEWART, B.M.; BLOCK, J.; MORELLI, P.; NAVARETTE, A.E.; AMSTALDEN, M.; BONILLA, L.; HANSEN, P.J.; BILBY, T.R. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Journal of Dairy Science*. v. 94, p. 3437–3445, 2011. DOI: 10.3168/jds.2010-4008.

TAO, S.; THOMPSON, I. M.; MONTEIRO, A. P. A.; HAYEN, M. J.; YOUNG, L. J.; DAHL, G. E. Effect of cooling heat-stressed dairy cows during the dry period on insulin response. *Journal of Dairy Science*. v.95, p. 5035-5046, 2012. DOI: 10.3168/jds.2012-5405.

TRÍBULO, P.; BERNAL, B.B.H.; RUIZ, A.; TRÍBULO, A.; TRÍBULO, R.J.; TRÍBULO, H.E.; BO, G.A. HANSEN, P.J. Consequences of exposure of embryos produced in vitro in a serum-containing medium to dickkopf-related protein 1 and colony stimulating factor 2 on blastocyst yield, pregnancy rate, and birth weight. *Journal of Animal Science*. v. 95, p. 4407–4412, 2017. DOI: 10.2527/jas2017.1927.

TRÍBULO, P.; RABAGLINO, M.B.; BO, M.B.; CARVALHEIRA, L.R.; BISHOP, J.V.; HANSEN, T.R.; HANSEN, P.J. Dickkopf-related protein 1 is a progesterone acting on the bovine embryo during the morula to-blastocyst transition to program trophoblast elongation. *Scientific Reports*. v. 9, p. 11816, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48374-z>.

TRÍBULO, P.; SIQUEIRA, L.G.B.; OLIVEIRA, L.J.; SCHEFFLER, T.; HANSEN, P.J. Identification of potential embryokines in the bovine reproductive tract. *Journal of Dairy Science*. v. 101, p. 690–704, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13221>.

THOM, E. C. The discomfort index. *Weatherwes*. v.12, p. 57-60, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1080/00431672.1959.9926960>.

WEST, J. W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. *Journal of Animal Science*, v. 77, 1999. DOI: 10.2527/1997.77suppl_221x.

WEST, J. W. Effects of heat stress on production in dairy cattle. *Journal Dairy Science*, v. 86, p. 2131-2144, 2003. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X.

WHEELLOCK, J.B.; RHOADS, R.P.; VANBAALE, M.J.; SANDERS, S.R.; BAUMGARD, L.H. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 644-655, 2010. DOI: 10.3168/jds.2009-2295.

VICKERS, L.A.; BURFEIND, O.; KEYSERLINGK, M.A.G.V.; VEIRA, D.M.; WEARY, D.M.; HEUWIESER, W. Technical note: Comparison of rectal and vaginal temperatures in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v. 93, p. 5246–5251, 2010. DOI: 10.3168/jds.2010-3388.

XIE, G.; COLE, L. C.; ZHAO, L. D.; SKRZYPEK, M. V.; SANDERS, S. R.; RHOADS, M. L.; BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Skeletal muscle and hepatic insulin signaling is maintained in heat-stressed lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v.99, p. 1-11, 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-10464.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*. v. 121, p. 447–454, 2001. DOI: 10.1530/rep.0.1210447.

ZHOU, W.; CHU, D.; SHA, W.; FU, L.; LI, Y. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor supplementation in culture medium on embryo quality and pregnancy outcome of women aged over 35 years. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. v. 33, p. 39–47, 2016. DOI: 10.1007/s10815-015-0627-7.

ZIEBE, S.; LOFT, A.; POVLSSEN, B.B.; ERB, K.; AGERHOLM, I.; AASTED, M.; GABRIELSEN, A.; HNIDA, C.; ZOBEL, D.P.; MUNDING, B.; BENDZ, S.H.; ROBERTSON, S.A. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. v. 99, p. 1600-1609, 2013. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.043.

ZOLINI, A.M.; BLOCK, J.; RABAGLINO, M.B.; TRIBULO, P.; HOELKER, M.; RINCON, G.; BROMFIELD, J.J.; HANSEN, P.J. Molecular fingerprint of female bovine embryos produced in vitro with high competence to establish and maintain pregnancy. *Biology of Reproduction*. ioz190, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz190>.

Capítulo 1

Temperatura vaginal diária em vacas girolando de diferentes composições genéticas sob estresse térmico pelo calor natural

3. TEMPERATURA VAGINAL DIÁRIA EM VACAS GIROLANDO DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES GENÉTICAS SOB ESTRESSE TÉRMICO PELO CALOR NATURAL

Luciano de Rezende Carvalheira¹, Raphael Rocha Wenceslau¹, Lilian dos Santos Ribeiro², Bruno Campos de Carvalho³, Álan Maia Borges¹ and Luiz Sérgio de Almeida Camargo³

¹ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 24220-000, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

³ Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite, 70770-901, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

3.1 Resumo

O presente trabalho avaliou o efeito da proporção de genética da raça Holandesa (H), assim como efeito de fazenda, escore de condição corporal (ECC), status de gestação, produção de leite e Índice de Temperatura e Umidade (ITU) na temperatura vaginal (TV) de vacas leiteiras Girolando mantidas sob pastejo durante estações quentes em clima tropical. As médias de TV, temperatura do ar e ITU foram, respectivamente, $39,06 \pm 0,52^{\circ}\text{C}$, $25,63 \pm 0,40^{\circ}\text{C}$ e $75,06 \pm 3,96$. A média dos quadrados mínimos da TV variou entre as fazendas ($P < 0,001$), status de gestação ($P < 0,001$) e ECC ($P < 0,05$). A produção de leite não afetou a TV ($P > 0,05$). A temperatura vaginal apresentou correlação positiva moderada com ITU ($r^2=0,45$; $P < 0,001$) e temperatura do ar ($r^2=0,46$; $P < 0,001$). A TV apresentou aumento linear

estimado de 0.05 graus para cada unidade de aumento do ITU ($P < 0.001$). A proporção de H afetou a TV média do dia ($P < 0.001$). Vacas $\frac{1}{2}$ H apresentaram menor TV em relação as vacas $\frac{3}{4}$ e $\frac{7}{8}$ H. Independente do efeito do ITU, ao longo da tarde vacas $\frac{1}{2}$ H apresentaram menor TV que vacas $\frac{3}{4}$ e $\frac{7}{8}$, que apresentaram TV semelhante entre si. Conclui-se que vacas $\frac{1}{2}$ H apresentam melhor habilidade de termorregulação que vacas $\frac{3}{4}$ e $\frac{7}{8}$ H. Além disso, fatores intrínsecos, como status de gestação e ECC, e extrínsecos, como efeitos de fazenda e ano podem afetar a temperatura vaginal diária em vacas Girolando.

Palavras-chave: ambiente tropical, mestiça, pasto, temperatura corporal, vaca leiteira.

3.2 Abstract

The present trial evaluated the effect of proportion of Holstein genetic on crossbred composition (H), as well dairy farm, body condition score (BCS), pregnancy status, milk yield and Temperature and Humidity Index (THI) on vaginal temperature (VT) of Girolando dairy cows maintained under tropical pasture during warm seasons. Overall mean of VT, air temperature and THI were, respectively, $39.06 \pm 0.52^{\circ}\text{C}$, $25.63 \pm 0.40^{\circ}\text{C}$ and 75.06 ± 3.96 . Least square mean of VT varied among the farms ($P < 0.001$), pregnancy status ($P < 0.001$) and BCS ($P < 0.05$). Milk yield did not affect VT ($P > 0.05$). Vaginal temperature had moderate positive correlation with THI ($r^2=0.45$, $P < 0.001$) and air temperature ($r^2=0.46$, $P < 0.001$). The VT had estimated linear increase of 0.05 degrees of each THI unit increase ($P < 0.001$). The fraction H affected the daily average of VT ($P < 0.001$). Cows with $\frac{1}{2}$ H had smaller daily average VT than cows $\frac{3}{4}$ and $\frac{7}{8}$ H. Independently of THI effect, along afternoon the $\frac{1}{2}$ H cows had lower least square means of vaginal temperature than $\frac{3}{4}$ and $\frac{7}{8}$ H cows, which had similar vaginal temperature within them. In conclusion, cows with $\frac{1}{2}$ H had better thermoregulatory

ability in the afternoon on circadian rhythm than cows with 3/4 and 7/8 H. Furthermore, intrinsic factors, as pregnancy status and BCS, and extrinsic factors, as the effects of dairy farm and year can affect daily vaginal temperature of Girolando cows.

Keywords: core body temperature, crossbreed, dairy cow, grazing pasture, tropical environment.

3.3 Introdução

O estresse térmico pelo calor tem sido um problema nos sistemas de produção animal em todo o mundo, especialmente em regiões de clima tropical e subtropical, conhecidos por condições de calor e alta umidade (Renaudeau *et al.*, 2011). Dados da produção de leite mundial de 2008 a 2018 mostram que seis dos dez países maiores produtores de leite no mundo estão parcialmente ou completamente em áreas de clima tropical ou subtropical (USDA, 2019). Neste período, cerca de 48,5% das vacas leiteiras do mundo estavam na Índia e Brasil, países responsáveis por 33% da produção mundial de leite em 2018 (USDA, 2019).

Em condições de estresse, forças externas ao corpo desregulam a homeostase, que estimula a ativação de respostas fisiológicas que podem induzir alterações e adaptações para que o organismo se adapte ao ambiente (Scott, 1981). Vacas sob estresse térmico pelo calor ativam mecanismos fisiológicos de termólise, como o aumento da frequência respiratória e sudorese, com o objetivo de eliminar calor corporal e manter a temperatura corporal dentro do limite fisiológico. Se a carga de calor excede a capacidade de termólise a temperatura corporal aumenta, o que está associado com o aumento do requerimento de manutenção, redução na fertilidade e produção de leite (Berman, 2005; Baumgard *et al.*, 2011). A intensidade de estresse térmico pelo calor pode ser mensurada pelo Índice de Temperatura e Umidade (ITU) e categorizado em diferentes níveis de estresse. Um dos índices mais citados considera vacas em estresse térmico pelo calor quando ITU é igual ou superior a 72 (Armstrong, 1994).

Alguns fatores são associados a sensibilidade bovina ao estresse térmico pelo calor, como status metabólico (e.g. lactação ou gestação) e raça. Vacas da raça Holandesa têm sido selecionada nas últimas décadas para aumentar a produção de leite, contudo o aumento na produtividade foi seguido por um aumento na sensibilidade ao calor (Lucy *et al.*, 2001). De fato, vacas Holandesas podem alcançar

alta produção de leite em regiões de clima temperado, mas não podem expressar todo o potencial genético sob condições tropicais (Guimarães *et al.*, 2002; Mellado *et al.*, 2011). Por outro lado, raças zebuínas são mais resistentes a desafios ambientais, mas apresentam baixa produção de leite (Ruas *et al.*, 2014). Produtores de regiões tropicais e subtropicais costumam criar animais mestiços Holandês x Zebu, a fim de aproveitar a complementaridade entre as características desejadas de ambas as linhagens, como o rendimento do leite Holandês e a resistência dos Zebu ao calor e ectoparasitas (Porto-Neto *et al.*, 2014). No Brasil, o cruzamento mais utilizado é entre Holandês x Gir, que originou a raça Girolando. É estimado que mais de 70% das vacas que compõem o rebanho brasileiro seja composto por vacas Girolando (Ruas *et al.*, 2014).

Embora o cruzamento possa ser benéfico para a produção de leite em animais *Bos taurus* x *Bos indicus* em regiões tropicais (Bunning *et al.*, 2019), efeito prejudicial do estresse térmico na produção de leite e taxa de concepção em protocolos de inseminação artificial ainda persiste, como reportado em vacas Girolando sob condições do semiárido brasileiro (Costa *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015).

Alta temperatura retal e ITU tem correlação negativa com tamanho do folículo e viabilidade de oócitos aos 90 dias pós-parto em vacas Girolando (Alves *et al.*, 2014) e choque térmico *in vitro* reduziu o desenvolvimento de embriões de Holandês e Girolando (Satrapa *et al.*, 2011). No entanto, ainda não é claro qual o efeito de estresse térmico pelo calor em vacas leiteiras mestiças e estudos ainda são necessários para melhor entender como a temperatura corporal é influenciada pela composição racial, sanidade e condições ambientais (Godyn' *et al.*, 2019).

Estudos tem avaliado a variação da temperatura corporal por meio do monitoramento da temperatura vaginal em vacas da raça Holandês (Kendall *et al.*, 2009; Nabenish *et al.*, 2011) e vacas de corte mestiças (Dikmen *et al.*, 2018; Davila *et al.*, 2019) expostas a estresse térmico pelo calor induzido ou natural. Contudo, não há relatos de resposta diária da temperatura vaginal de vacas leiteiras mestiças ao estresse natural pelo calor em condições tropicais e subtropicais. Neste estudo foi investigado o efeito da composição genética, status de gestação, escore de condição corporal (ECC), produção de leite, Índice de Temperatura e Humidade (ITU) e hora na temperatura vaginal diária de vacas Girolando sob condições de pastejo tropical durante estações quentes.

3.4 Material e métodos

3.4.1 Animais e fazendas

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética de uso de animais (CEUA – Embrapa) pelo protocolo nº 07/2015. Dados foram coletados de janeiro a março de 2016 e janeiro a fevereiro de 2017 de quatro propriedades brasileiras com sistema criação a pasto extensivo: Campo Experimental José Henrique Bruschi (Fazendas 1 e 2, Coronel Pacheco, Minas Gerais; 21°33'25"S e 43°15'26"W; Köpper climate classification [Kcc]: Aw), Campo Experimental Santa Mônica (Fazenda 3, Valença, Rio de Janeiro; 22°21'44"S e 43°41'51"W, Kcc: Cwa), Fazenda Santa Luzia (Fazendas 4 e 5, Passos, Minas Gerais; 20°44'54"S e 46°26'01"W, Kcc: Cwa) e Fazendas do Basa (Fazenda 6, Leopoldina, Minas Gerais; 21°31'55" S e 42°38'35" W; Kcc: Aw). As propriedades Campo Experimental José Henrique Bruschi e Fazenda Santa Luzia possuíam cada uma dois sistemas distintos de pastejo, portanto os dados de cada um desses sistemas foi coletado e analisado como fazendas independentes, somando seis fazendas.

As vacas foram mantidas pastando em pasto tropical durante todo o dia em todas as fazendas (Tabela 1). Vacas em lactação foram ordenhadas duas vezes ao dia (cerca de 5:00 e 15:00) e foram suplementadas com milho e farelo de soja (1,5 a 4 kg/vaca/dia) após cada ordenha, de acordo com o produção diária, exceto na fazenda 2. Nesta fazenda vacas produzindo ≤ 10 L/dia foram ordenhadas apenas uma vez ao dia, pela manhã. Nas fazendas 4 e 5, vacas foram resfriadas por aspersores de água e ventiladores na área de espera antes da ordenha e por ventiladores enquanto eram ordenhadas. Nas fazendas 1, 2 e 3 as vacas foram resfriadas por ventilação apenas enquanto eram ordenhadas.

Tabela 1. Sumário de informações sobre o monitoramento da temperatura vaginal.

Fazenda	Período de monitoramento	Número de vacas monitoradas ¹			Pasto
		1/2 H	3/4 H	7/8 H	
1	01 a 03 de fevereiro de 2016	17	37	19	Brachiaria sp.
	22 a 24 de março de 2016	18	30	19	Brachiaria sp.
2	17 a 19 de fevereiro de 2016	18	21	3	Panicum sp.
3	09 a 11 de março de 2016	33	11	5	Cynodon sp.
	14 a 17 de março de 2016	31	11	-	Brachiaria sp.
	18 a 20 de março de 2016	16	14	1	Brachiaria sp.
4	12 a 14 de janeiro de 2016	30	25	10	Panicum sp.
	27 a 30 de janeiro de 2017	8	18	5	Panicum sp.
	03 a 06 de fevereiro de 2017	20	23	10	Panicum sp.
5	27 a 30 de janeiro de 2017	5	33	6	Cynodon sp.
	03 a 06 de fevereiro de 2017	5	25	5	Cynodon sp.
6	15 a 16 de fevereiro 2017	83	-	-	Brachiaria sp.
Total		284	248	83	

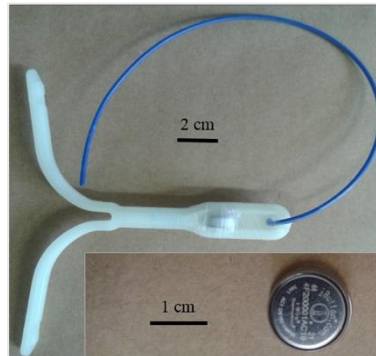
¹Composição genética: proporção da raça Holandesa no cruzamento (H).

Fazenda: 1 e 2) Campo Experimental José Henrique Brushi; 3) Campo Experimental Santa Mônica; 4 and 5) Fazenda Santa Luzia; 6) Fazendas do Basa.

3.4.2 Monitoramento da temperatura vaginal

Temperatura vaginal (TV) foi registrada por *iBotton data logger* (DS1921H-F5# ThermoChron® High Res 15 a 46°C, Maxim Integrated, São José, CA, USA) montado com parafilm em um orifício perfurado em dispositivo intravaginal liberador de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil), sem o revestimento de silicone impregnado com progesterona (Fig.1). Foram coletados dados de 775 vacas Girolando, lactantes e não lactantes de diferentes composições genéticas, em intervalos de 30 min entre 41-96h (média de 53,0 ± 23,3h), gerando de 82-192 registros (média de 106 ± 46,8) por vaca.

Figura 1. *iBotton data logger* fixado a um dispositivo liberador de progesterona (Sincrogest®) sem a película impregnada de progesterona. Detalhe: *data logger iBotton*.



Devido a alta variação na composição genética de Holandês no banco de dados, os dados foram filtrados para manter apenas animais 1/2 (n=284), 3/4 (n=248) e 7/8 (n=83) de Holandês na composição do cruzamento, totalizando 615 vacas usadas nas análises (Tabela 1). Dados de animais em estro, com sete ou menos dias pós-parto ou doente (e.g., mastite, endometrite ou laminite) durante o monitoramento da TV foram excluídos.

Temperatura do ar (TA, °C) e umidade relativa do ar (UR, %) foram registrados ao mesmo tempo que a TV, com um data logger ambiental (AKSO® AK 174, Akso, Brasil) localizado cerca de 2 m de altura do solo em uma área sombreada e protegida de chuva, próxima a ordenha da fazenda. O Índice de Temperatura e Umidade (ITU) foi calculado para cada hora, de acordo com a equação (Dikmen e Hansen, 2009): $THI = (1,8 \times AT + 32) - [(0,55 - 0,0055 \times RH) \times (1,8 \times AT - 26)]$.

Escore de condição corporal (ECC; escala de 1 a 5, com aumento de 0,25) e cor do pelo (escuro, branco ou malhado) foram registrados no momento da introdução ou retirada do data logger. Dados de produção de leite (correspondente a um dia de observação do registro mais próximo do primeiro dia de monitoramento da TV), dias em lactação, ordem de parto, idade e status de gestação foram coleados dos registros zootécnicos de cada fazenda. Produção de leite foi agrupada em sete classes de produção: Não lactante (n= 255); 0,5–10 L/day (n= 53); 10,1–20 L/day (n= 177); 20,1–30 L/day (n= 79); 30,1–40 L/day (n= 21); 40,1–50 L/day (n= 21); 50,1–60 L/day (n= 9). Status de gestação foi categorizado em quatro classes: Não gestante (n= 242), 1º trimestre (n= 105, <90 dias de gestação), 2º trimestre (n= 168, 90-180 dias de gestação) e 3º trimestre (n= 100, >180 dias de gestação) de gestação.

3.4.3 Analise estatística

Foi calculada a média da TV de cada vaca a cada hora do dia e o respectivo ITU de todos os dias de monitoramento para gerar um valor médio de TV e ITU. Foi usado um modelo linear misto com medidas repetidas usando REML método para (co)variância

The VT of each cow at each hour of the day and the respective THI were averaged per hour across all monitoring days to generate an averaged value for VT and THI. Um modelo linear misto com medidas repetidas usando o método REML para o procedimento de estimação de componentes de (co)variância foi empregado. Um modelo completo, incluindo todas as variáveis coletadas e suas variantes aninhadas, foi ajustado e testado pelo teste da razão de verossimilhança, a fim de selecionar o melhor modelo para explicar a TV. O modelo de seleção “stepward” foi utilizado considerando a inclusão no modelo dos efeitos principais das variáveis estudadas, mais a interação entre hora e composição genética para estudo do efeito das diferentes composições de Holandês sobre a TV ao longo do dia. O modelo final descrito abaixo contém os efeitos de fazenda, ano, proporção de genética da raça Holandesa na composição do mestiço, status de gestação, ECC, produção de leite, ITU e hora do dia:

$$TV_{abcdefghi} = \mu + Fazenda_a + ano_b + \% \text{ Holandês}_c + ECC_d + ITU_e + Hora_f + Gestação_g + Produção \text{ de leite}_h + \% \text{ Holandês} * Hora_{cf} + \delta_i + \mathcal{E}_{abcdefghi};$$

Onde, *a*: fazenda 1, 2, 3, 4, 5 ou 6; *b*: 2016 ou 2017; *c*: 1/2 Holandês, 3/4 Holandês ou 7/8 Holandês; *d*: ECC; *e*: média do ITU correspondente a mesma hora da média da TV; *f*: Hora do dia que a TV e ITU foram registrados; *g*: não gestante, 1º trimestre, 2º trimestre ou 3º trimestre; *h*: Produção de leite mais próxima ao primeiro dia de registro da TV; δ_i : efeito randômico da vaca; e $\mathcal{E}_{abcdefghi}$: erro.

Efeitos fixos foram avaliados pela ANOVA e médias estimadas foram testadas com teste de Tukey. Nível de significância foi estipulado como 0,05. Todas as análises foram realizadas usando software R 3.6.1 (R Core Team, 2019).

3.5 Resultados

3.5.1 Fazenda e ano

A temperatura vagina (TV) variou entre as fazendas ($P < 0.001$, Tabela 2). Fazendas 1 e 2 apresentaram TV maior que fazendas 3, 4 e 5. Médias da TV para a fazenda 6 não apresentou diferença em relação as fazendas 1, 2 e 3. A fazenda 3 apresentou a TV mais baixa entre todas as propriedades avaliadas. Não houve diferença entre os sistemas de produção das propriedades Campo Experimental José Henrique Brushi (fazendas 1 e 2) e Fazenda Santa Luiza (fazendas 4 e 5). A TV foi maior em 2016 do que 2017 ($P < 0,01$, Tabela 2).

3.5.2 Fatores intrínsecos

O status de gestação afetou a TV ($P < 0,001$, Tabela 2). Vacas não gestantes e vacas no terceiro trimestre de gestação tiveram TV maior do que vacas no primeiro e segundo trimestre de gestação. Vacas no primeiro trimestre de gestação apresentaram TV menor que vacas no segundo trimestre de gestação (tabela 2). TV variou entre os diferentes ECC ($P < 0,05$, Tabela 2). TV de vacas com ECC igual a 2,5 foi maior que em vacas com ECC de 3, 3,5 ou 4. Produção de leite não interferiu na TV ($P > 0,05$, Tabela 2).

Tabela 2. Média dos quadrados mínimos (\pm erro padrão) da temperatura vaginal em função de fazenda, ano, composição genética, status de gestação, escore de condição corporal (ECC) e categoria de produção de leite.

Variável		n	Temperatura vaginal (°C) \pm SE	P-valor
Fazenda	1	140	38,97 \pm 0,07 ^{be}	<0,001
	2	42	38,86 \pm 0,08 ^{ce}	
	3	122	38,80 \pm 0,08 ^d	
	4	149	39,24 \pm 0,03 ^a	
	5	79	39,24 \pm 0,04 ^a	
	6	83	39,15 \pm 0,06 ^{ab}	
Ano	2016	369	39,16 \pm 0,03 ^a	<0,01
	2017	246	38,93 \pm 0,07 ^b	
Composição genética ¹	1/2	284	38,95 \pm 0,06 ^a	<0,001
	3/4	248	39,08 \pm 0,06 ^b	
	7/8	83	39,09 \pm 0,06 ^b	

*Continua

Tabela 2. Média dos quadrados mínimos (\pm erro padrão) da temperatura vaginal em função de fazenda, ano, composição genética, status de gestação, escore de condição corporal (ECC) e categoria de produção de leite*.

* Continuação...

Variável		n	Temperatura vaginal (°C) \pm SE	P-valor
Status de gestação	Não gestante	242	39,10 \pm 0,04 ^a	<0,001
	1° trimestre	105	38,89 \pm 0,04 ^b	
	2° trimestre	168	38,99 \pm 0,04 ^c	
	3° trimestre	100	39,19 \pm 0,05 ^a	
ECC (1 - 5; 0,25)	2,5	52	39,18 \pm 0,05 ^a	<0,05
	2,75	94	39,08 \pm 0,04 ^{ab}	
	3	200	39,03 \pm 0,04 ^b	
	3,25	18	38,98 \pm 0,07 ^{ab}	
	3,5	214	39,00 \pm 0,04 ^{ab}	
	3,75	19	39,11 \pm 0,08 ^{ab}	
	4	18	38,92 \pm 0,08 ^b	
Produção de leite	Não lactante	255	39,00 \pm 0,03 ^a	>0,05
	0,5 - 10L	53	39,01 \pm 0,04 ^a	
	10,1 - 20L	176	39,11 \pm 0,03 ^a	
	20,1 - 30L	80	39,09 \pm 0,04 ^a	
	30,1 - 40L	21	38,99 \pm 0,09 ^a	
	40,1 - 50L	21	38,97 \pm 0,09 ^a	
	50,1 - 60L	9	39,14 \pm 0,12 ^a	

^{a-c} Os valores dentro de uma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente em $P < 0,05$ pelo teste de Tukey. 1: Proporção de Holstein na composição de mestiços.

3.5.3 Temperatura vaginae diária e ITU

A média geral da TV (\pm erro padrão), temperatura do ar e ITU foram, respectivamente, 39,06 \pm 0,52°C, 25,64 \pm 4,09°C e 75,56 \pm 4,43. Temperatura vaginal teve correlação positiva moderada com ITU ($r^2=0,45$, $P<0,0001$) e temperatura do ar ($r^2=0,46$, $P<0,0001$). Média descritiva da variação da temperatura corporal para todos os animais e média de ITU considerando todos os fatores avaliados são apresentados na Figura 2. A temperatura vaginal ficou alinhada a variação diária do ITU, contudo houve um atraso de aproximadamente uma hora entre eles (Figura 2). Como um

padrão geral, quando avaliando o período de 00:00 a 05:00 h o ITU reduziu de 72.04 para 70.24. Neste ponto o ITU entrou em um platô até 07:00 h, quando iniciou um aumento contínuo até 14:00 h, alcançando 81,35, o maior ITU em 24h. Após, o ITU reduziu lentamente até as 16:00 h alcançando 80.57, quando iniciou um vigoroso declínio até 23:00 h para 72,89 (Figura 2).

A média da TV diminuiu vigorosamente de 0:00 a 8:00 h, de 39,0°C até o ponto mais baixo de 38,6°C. Neste ponto, TV iniciou um aumento e alcançou o maior valor (39,6°C) as 15:0 h, que foi uma hora mais tarde do maior ITU. Em seguida a TV reduziu apenas 0,11°C até 18:00 h, o ponto que iniciou um vigoroso declínio até alcançar 39,06°C as 23:00 h (Figura 2). Vacas alcançaram 39,14°C as 12:00 h quando ITU aumentou para 79,25 e declinou abaixo de 39,1°C as 22:00 h, quando ITU reduziu para 73,39.

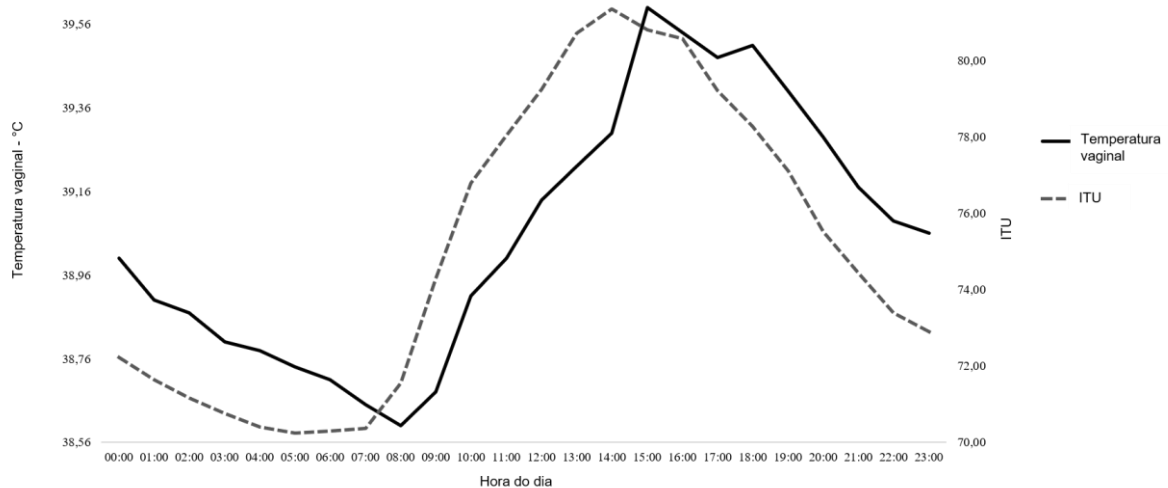


Figura 2. Média da variação da temperatura vaginal de vacas Girolando e Índice de Temperatura e Umidade (ITU) durante o verão.

O modelo proposto foi capaz de explicar 73% da variação da TV ($R^2=0,73$) (Tabela suplementar 1, Anexo I). O ITU afetou significativamente a TV ($P<0.001$). Um aumento linear estimado de 0,05 °C em TV para cada unidade de ITU foi observado (Tabela suplementar 1, Anexo I).

3.5.4 Composição genética

A média da TV no dia foi afetada ($P<0,001$) pela proporção da raça Holandesa (H) na composição genética (Tabela 2). A TV média de vacas 1/2 H foi menor que a média de vacas 3/4 H e 7/8 H. Também, houve variação da TV entre os três grupos mestiços em função da hora do dia. De 12:00 a 20:00 h foi observada diferença na média dos quadrados mínimos entre os grupos genéticos ($P<0,001$, Figura 3). Durante todo este período a média da TV de vacas 1/2 H permaneceu cerca de 0,5 a 1,0 °C abaixo da média da TV de vacas 3/4 H e 7/8 H. A TV de vacas 3/4 H e 7/8 H aumentou agudamente de 11:00 a 12:00 enquanto que a TV de vacas Girolando não aumentou. De fato, a TV de vacas 1/2 H permaneceu próximo a um platô entre 11:00 e 14:00 h. A TV de vacas 1/2 H permaneceu cerca de 1 °C abaixo dos demais grupos até as 15:00 h, quando a TV de vacas 1/2 H aumentou para 39,05°C e de vacas 3/4 e 7/8 para cerca de 39,5 °C. Esta diferença de aproximadamente 0,5°C entre vacas 1/2 e os demais grupos permaneceu de 15:00 até 19:00 h (Figura 3).

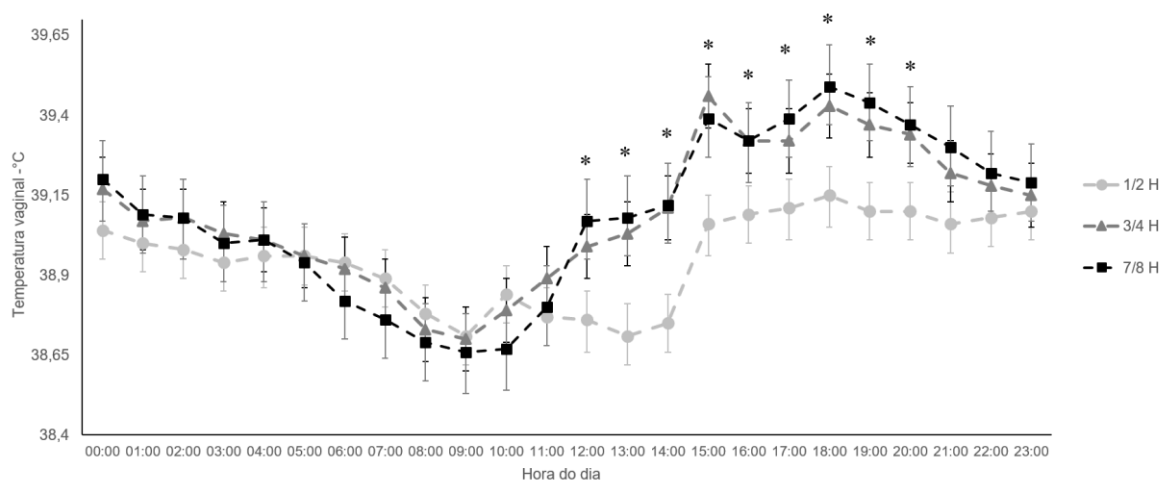


Figure 3. Média dos quadrados mínimos e intervalor de confiança da temperatura vaginal de três grupos de composição genética de gado leiteiro (*Bos taurus* (Holstein) x *Bos indicus*) em função da hora do dia. (*) 1/2 H vs 3/4 H e 1/2 H vs 7/8 H, $P<0,05$.

3.6 Discussão

Vacas leiteiras cruzadas entre *Bos taurus* x *Bos indicus* têm sido usadas em regiões tropicais com objetivo de aliviar o efeito do estresse térmico pelo calor na produção e reprodução (Porto-Neto *et al.*, 2014). Contudo, um efeito adverso ainda permanece em vacas mestiças, como o Girolando (Holstein x Gir) (Alves *et al.*, 2014). Neste estudo, nós encontramos que em estações quentes o status de gestação e o

ECC tem efeito na TV de vacas Girolando em contraste a produção de leite, que não afetou a TV. Foi demonstrado que a variação diária da TV em vaca Girolando é afetada pela composição genética; vacas 1/2 H apresentaram menor variação da TV ao longo do dia em relação as vacas 3/4 H e 7/8 H.

A temperatura corporal apresentou pequena variação das médias, como esperado, contudo, flutuações na temperatura corporal foram influenciadas por diversos fatores, como ECC, status da gestação e composição genética. A detecção das diferenças foi possível pelo uso do monitoramento da temperatura vaginal, registrada a cada hora, sem efeito de contenção dos animais, que é uma fonte de estresse. Neste estudo, vacas estavam sob estresse térmico pelo calor a maior parte do dia. A média de 24h da temperatura do ar ($25,63 \pm 0,40^{\circ}\text{C}$) foi maior que o limite crítico de 25°C descrito para vacas leiteras (Berman *et al.*, 1985; Hahn 1999). Os valores de ITU estiveram acima do limite para estresse térmico pelo calor (72) entre 8:00 e 23:00 h (Armstrong, 1994). Foi demonstrado recentemente que a temperatura vaginal tem melhor correlação com o ITU e parece ser mais efetiva para determinar a carga de calor do que a temperatura retal (Kaufamn *et al.*, 2018). De fato, nosso estudo demonstrou que o ITU afeta a TV.

Temperatura corporal de $39,1^{\circ}\text{C}$ tem sido considerada o limite superior para bovinos adultos, acima deste limite vacas entram em hipertermia, afetando a frequência respiratória e cardíaca, a produção e também a fertilidade (Gwazdauskas, 1985; Wheelock *et al.*, 2010; Polsky *et al.*, 2017). A média da TV de vacas 1/2 H permaneceu durante todo o dia abaixo do limite máximo, enquanto que a TV de vacas 3/4 H e 7/8 H apresentaram aumento significativo e permaneceram acima de $39,1^{\circ}\text{C}$ no período da tarde, quando o ITU aumenta. De fato, nós encontramos que a habilidade de vacas Girolando em regular a TV é determinada pela composição genética, uma vez que as vacas com maior proporção de raça Holandesa foram menos capazes de lidar com alto ITU.

Nosso estudo encontrou que há um atraso de aproximadamente 1 hora entre ITU e TV, indicando que o corpo da vaca necessita de algum tempo para ajustar a temperatura corporal a alterações de temperatura corporal. O maior ITU não ocorreu simultaneamente com a maior TV assim como o ITU mais baixo não ocorreu com a menor TV. De fato, vacas permaneceram com alta TV por 1 h após o declínio do ITU,

o que sugere que a tarde os animais devem ser resfriados por ao menos uma hora após a redução do ITU abaixo do limite de estresse térmico pelo calor, *i.e.*, até as vacas resfriarem abaixo de 39,1°C (Figura 1).

A variação da TV entre fazendas e ano se deu, provavelmente, devido a diferenças nas condições meteorológicas e outros fatores ambientais. De fato, condições ambientais nas fazendas é o fator mais importante que afeta a termorregulação de animais (Godyn' *et al.*, 2019).

O aumento da TV do início para o final da gestação nas vacas pode estar associado ao calor metabólico produzido pelo desenvolvimento fetal. Surpreendentemente, vacas Girolando com alto ECC apresentaram baixa TV em relação as vacas com maior ECC. Em novilhas Brangus no verão, Hamblen *et al.* (2018) encontrou que as novilhas mais pesadas eram capazes de manter a TV baixa em relação às novilhas mais leves. Os autores sugerem que os animais com melhor adaptação a ambientes quentes e úmidos tendem a ter maior média de ganho diário, o que pode explicar a baixa temperatura em animais mais pesados (Hamblen *et al.*, 2018).

A produção de leite está associada com a produção de calor metabólico, que contribui para aumentar a temperatura corporal da vaca (Berman, 2005). Neste estudo, não houve efeito significativo da produção de leite na TV. Contudo, Dikmen e Hansen (2009) também não encontraram relação significativa entre produção de leite e temperatura retal em vacas da raça Holandesa. A falta de efeito da produção de leite na TV pode ter se dado por que vacas Girolando não são tão produtivas quanto as vacas da raça Holandês. Neste estudo, apenas 14% das vacas lactantes produziam mais de 30Kg/dia, o que não permite uma comparação robusta.

3.7 Conclusão

Como a temperatura corporal influencia outras funções, vacas com baixa variação na temperatura corporal sob alto ITU serão mais propensas de terem sucesso nos trópicos. A temperatura vaginal de vacas Girolando passam por variação ao longo das horas do dia e aumenta em paralelo ao ITU, com uma hora de atraso de resposta do animal. Vacas com 1/2 de raça Holandesa na composição genética apresentam melhor habilidade em termorregular ao longo do dia em relação as vacas 3/4 e 7/8 de raça Holandesa na composição genética. Além disso, fatores intrínsecos,

como status da gestação e escore de condição corporal, e fatores extrínsecos, como fazenda e ano podem afetar a temperatura vaginal de vacas Girolando

3.8 Referências

Alves BG, Alves KA, Lúcio AC, Martins MC, Silva TH, Alves BG, Braga LS, Silva TV, Viu MAO, Beletti ME, Jacomini JO, Santos RM and Gambarini ML 2014 Ovarian activity and oocyte quality associated with the biochemical profile of serum and follicular fluid from Girolando dairy cows postpartum. *Reproduction Science* 146, 117-125. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.019>.

Armstrong DV 1994 Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science* 77, 2044–2050. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77149-6.

Azevedo M, Pires MFÁ, Saturmino HM, Lana ÂMQ, Sampaio IBM, Monteiro JBN and Morato LE 2005 Estimation of upper critical levels of the temperature-humidity index for 1/2, 3/4 and 7/8 lactating Holstein-Zebu dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 2000-2008. DOI: 10.1590/S1516-35982005000600025.

Baumgard LH, Wheelock JB, Sanders SR, Moore CE, Green HB, Waldron MR and Rhoads RP 2011 Postabsorptive carbohydrate adaptations to heat stress and monensin supplementation in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 94, 5620–5633. DOI: 10.3168/jds.2011-4462.

Berman A, Folman Y, Kaim M, Mamen M, Herz Z, Wolfenson D, Arieli A and Graber Y 1985 Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. *Journal of Dairy Science* 68, 1488-95. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(85)80987-5.

Berman A 2005 Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science* 83, 1377–1384. DOI: 10.2527/2005.8361377x.

Bunning H, Wall E, Chagunda MGG, Banos G and Simm G 2019 Heterosis in cattle crossbreeding schemes in tropical regions: meta-analysis of effects of breed combination, trait type, and climate on level of heterosis. *Journal of Animal Science* 97, 29-34. DOI: 10.1093/jas/sky406.

Collier RJ, Zimbelman RB, Rhoads RP, Rhoads ML, Baumgard LH 2009 Re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. *Western Dairy Management Conference*, p. 113-125.

Costa ANL, Feitosa JV, Montezuma Jr. PA, de Souza PT and Araújo AA 2015 Rectal temperatures, respiratory rates, production, and reproduction performances of crossbred Girolando cows under heat stress in northeastern Brazil. *International Journal of Biometeorology* 59, 1647-53. DOI: 10.1007/s00484-015-0971-4.

Costa ANL, Feitosa JV, Júnior PAM, Souza PT and de Araújo AA 2015 Hormonal profiles, physiological parameters, and productive and reproductive performances of

Girolando cows in the state of Ceará-Brazil. *International Journal of Biometeorology* 59, 231-236. DOI: 10.1007/s00484-014-0838-0.

Davila KMS, Hamblen H, Hansen PJ, Dikmen S, Oltenacu PA and Mateescu RG 2019 Genetic parameters for hair characteristics and core body temperature in a multibreed Brahman–Angus herd. *Journal of Animal Science*, 97, 3246–3252. DOI: 10.1093/jas/skz188.

Dikmen S and Hansen PJ 2009 Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactation dairy cows in a subtropical environment? *Journal of Dairy Science* 92, 109-116. DOI: 10.3168/jds.2008-1370.

Dikmen S, Mateescu RG, Elzo MA and Hansen PJ 2018 Determination of the optimum contribution of Brahman genetics in an Angus-Brahman multibreed herd for regulation of body temperature during hot weather. *Journal of Animal Science* 96, 2175–2183. DOI: 10.1093/jas/sky133.

Godyń D, Herbut P and Angrecka S 2019 Measurements of peripheral and deep body temperature in cattle – A review. *Journal of Thermal Biology* 79, 42-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.011>.

Guimarães JD, Alves NG, Costa EP, Silva MR, Costa FMJ and Zamperlini B 2002 Reproductive and productive efficiencies in Holstein and Holstein x Zebu cows crossbreds. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31, 641-647. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982002000300014>.

Gwazdauskas FC 1985 Effects of climate on reproduction in cattle. *Journal of Dairy Science* 68, 1568-1578. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80995-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80995-4).

Hamblen H, Hansen PJ, Zolini AM, Oltenacu PA and Mateescu RG 2018 Thermoregulatory response of Brangus heifers to naturally occurring heat exposure on pasture. *Journal of Animal Science* 96, 3131-3137. DOI: 10.1093/jas/sky224.

Hahn GL 1999 Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *Journal of Animal Science* 77 (Suppl. 2), 10-20. DOI: https://doi.org/10.2527/1997.77suppl_210x.

Kaufman JD, Saxton AM and Ríos AG 2018 Short communication: Relationships among temperature-humidity index with rectal, udder surface, and vaginal temperatures in lactating dairy cows experiencing heat stress. *Journal of Dairy Science* 101, 1–6. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13799>.

Kendall PE and Webster JR 2009 Season and physiological status affects the circadian body temperature rhythm of dairy cows. *Livestock Science* 125, 155–160. DOI:10.1016/j.livsci.2009.04.004.

Lucy MC, Jiang H and Kobayashi Y 2001 Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *Journal of Dairy Science* 84 (E. Suppl.), E113-E119. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70205-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70205-6).

Mellado M, Coronel F, Estrada A and Ríos FG 2011 Lactation performance of Holstein and Holstein x Gyr cattle under intensive condition in a subtropical environment. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14, 927 – 931.

Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K and Tsuzuki Y 2011 Effect of the temperature-humidity index on body temperature and conception rate of lactating dairy cows in southwestern Japan. *Journal of Reproduction Development* 57, 450-456. DOI: 10.1262/jrd.10-135t.

Paula-Lopes FF, Lima RS, Satrapa RA, Barros CM 2013 Physiology and Endocrinology Symposium: influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. *Journal of Animal Science* 91, 1143-53. DOI: 10.2527/jas.2012-5802.

Porto-Neto LR, Reverter A, Prayaga KC, Chan EKF, Johnston DJ, Hawken RJ, Fordyce G, Garcia JF, Sonstegard TS, Bolormaa S, Goddard ME, Burrow HM, Henshal JM, Lehnert SA and Barendse W 2014 The genetic architecture of climatic adaptation of tropical cattle. *PLoS ONE* 9, e113284. DOI:10.1371/journal.pone.0113284.

Polsky LB, Madureira AML, Drago Filho EL, Soriano S, Sica AF, Vasconcelos JLM and RLA Cerri 2017 Association between ambient temperature and humidity, vaginal temperature and automatic activity monitoring on induced estrus in lactating cows. *Journal of Dairy Science* 100, 8590–8601. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12656>.

Purwanto BP, Abo Y, Sakamoto R, Furumoto F and Yamamoto S 1990 Diurnal patterns of heat production and heart rate under thermoneutral conditions in Holstein Friesian cows differing in milk production. *Journal of Agricultural Science* 114, 139-142. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859600072117>.

Renaudeau D, Collin A, Yahav S, de Basilio V, Gourdine JL and Collier RJ 2012 Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6, 707–728. DOI: 10.1017/S1751731111002448.

Ruas JRM, da Silva EA, Queiroz DS, Pereira MEG, Júnior JAGS, Santos MD, Júnior VRR and da Costa MD 2014 Lactation productive characteristics of four genetic groups F1 Holstein x Zebu. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 21, 33-37. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.014>.

Satrapa RA, Nabhana T, Silva CF, Simões RAL, Razza EM, Puelker RZ, Trinca LA and Barros CM 2011 Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 76, 1162–1167. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.05.026.

Scott GH 1981 What is animal stress and how is it measured? *Journal of Animal Science* 52, 150-153. DOI: 10.2527/jas1981.521150x.

USDA 2019 Market and trade data, PSD Online, Custom Query. Accessed on 26 August 2019, from <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>.

Wheelock JB, Rhoads RP, Vanbaale MJ, Sanders SR and Baumgard LH 2010 Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 93, 644-655. DOI: 10.3168/jds.2009-2295.

Capítulo 2

Embriões bovinos estimulados *in vitro* com Fator Estimulador de Colônia 2 (CSF2), previamente submetidos ao choque térmico

4. EMBRIÕES BOVINOS ESTIMULADOS *IN VITRO* COM FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA 2 (CSF2), PREVIAMENTE SUBMETIDOS AO CHOQUE TÉRMICO

Luciano de Rezende Carvalheira¹, Peter J. Hansen², Eliane Beatriz Magalhães Silva¹, Ana Carolina Leite¹ e Alan Maia Borges¹

¹ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

² Department of Animal Sciences, D.H. Barron Reproductive and Perinatal Biology Research Program, and Genetics Institute, University of Florida, Gainesville, Florida 32611-00910, USA.

4.1 Resumo

Um dos mecanismos pelos quais o estresse térmico pelo calor reduz a fertilidade de vacas leiteiras se dá pela redução na competência de embriões nas fases iniciais do desenvolvimento. Moléculas bioativas secretadas pelo trato reprodutor feminino, como o Fator Estimulador de Colônia 2 (CSF2), são capazes de modular o desenvolvimento embrionário. Este trabalho avaliou o efeito do choque térmico entre os dias 2,5 e 3 do cultivo *in vitro* (CIV) sobre o desenvolvimento embrionário, apoptose celular, atividade mitocondrial e percentual de lipídios em blastocistos bovinos. Também foi avaliado se a adição de CSF2 ao meio de cultivo no dia 5 do CIV seria capaz de reverter danos causados pelo choque térmico. Não houve efeito do choque térmico e CSF2 no desenvolvimento embrionário e número de células do embrião. Contudo, embriões submetidos ao choque térmico apresentaram menor número e percentual de células TUNEL-positivas do trofotoderma ($P=0,0270$ e $P=0,0240$) e total do embrião ($P=0,0029$ e $P=0,0031$). O choque térmico também reduziu a atividade mitocondrial ($P=0,0073$). CSF2 não afetou o número de células do embrião e células TUNEL-positivas. Não houve efeito do choque térmico e CSF2 no percentual de lipídios. Conclui-se que o choque térmico entre os dias 2,5 e 3 do desenvolvimento embrionário não interfere na competência do embrião em alcançar o estágio de blastocisto, entretanto, reduz a degradação de DNA e a atividade mitocondrial de suas células. O CSF2 não foi capaz de recuperar as alterações observadas em embriões previamente expostos ao choque térmico.

Palavras-chave: Apoptose, blastocistos, embriocina, estresse térmico pelo calor, vacas leiteiras.

4.2 Abstract

One of the mechanisms by which heat stress reduce dairy cows' fertility is due to the reduction of embryos competency on early stages of development. Bioactive molecules secreted by maternal reproductive tract, as Colony Stimulator Factor 2 (CSF2), can modulate embryo development. This study evaluated the effect of *in vitro* heat shock between days 2.5 to 3 of *in vitro* culture (IVC) on embryo development, cellular apoptosis, mitochondrial activity and lipids content of bovine blastocysts. We also evaluated if CSF2 in IVC on day 5 would recover damage caused by heat shock. There were no effect of heat shock and CSF2 on embryo development and cell number. However, heat shocked embryos showed reduced number and percent of TUNEL-positive cells on trophoctoderm ($P=0.0270$ and $P=0.0240$) and total embryo ($P=0.0029$ and $P=0.0031$). Heat shock reduced the mitochondrial activity ($P=0.0073$). The CSF2 did not affected the number and percent of TUNEL-positive cells, as well did not affect mitochondrial activity. There were no effect of heat shock and CSF2 on percent of lipid. In conclusion, heat shock between day 2.5 and 3 post insemination did not affect embryo development to blastocyst stage, but reduced DNA degradation and mitochondrial activity on blastocyst blastomeres. The CSF2 was not able to recover damages on previously heat shock embryos.

Keywords: Apoptosis, blastocysts, embryocine, heat stress, dairy cows.

4.3 Introdução

O desenvolvimento embrionário pré-implantação é um processo dinâmico que envolve proliferação, diferenciação e morte celular, eventos finamente regulados pela interação entre embrião e o ambiente uterino (Hansen *et al.*, 2016). Dentre as diversas moléculas responsáveis pela manutenção do embrião secretadas pelas células epiteliais da tuba uterina e do endométrio bovino, estão as embriocinas, moléculas bioativas capazes de modular o desenvolvimento embrionário (Hansen *et al.*, 2014). O Fator Estimulador de Colônia 2 (CSF2) é uma das embriocinas mais expressas nas células endometriais no quinto dia após a ovulação (Tríbulo *et al.*, 2018) e sua adição ao meio de cultivo *in vitro* no quinto dia após-inseminação inibiu a expressão de genes pró-apoptóticos e estimulou a expressão de genes anti-apoptóticos em mórulas

(Loureiro *et al.*, 2011), aumentou a capacidade do embrião em estabelecer gestação e interferiu do comprimento do trofoblasto e secreção de interferon-tau em embriões de 15 dias (Loureiro *et al.*, 2009; Dobbs *et al.*, 2014).

O choque térmico é um dos fatores que interferem na competência de oócitos e embriões em alcançarem o estágio de blastocisto e reduzem a qualidade embrionária, prejudicando o estabelecimento de gestação (Ascari *et al.*, 2017; Paula-Lopes e Hansen, 2002a; Loureiro *et al.*, 2007). A fase de desenvolvimento até o estágio de blastocisto é crítica para a sensibilidade ao estresse térmico pelo calor, uma vez que a transferência de embriões produzidos *in vivo*, a partir de doadoras provenientes de ambiente termoneutro, ou *in vitro* têm apresentado recuperação nas taxas de concepção em estações quentes (Baruselli *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2011). Estudos *in vitro* demonstram que a maior sensibilidade do embrião ao estresse térmico pelo calor ocorre até o estágio de 16 células, no quarto dia de desenvolvimento (Paula-Lopez e Hansen, 2002; Sakatani *et al.*, 2012). Quando associado ao choque térmico, o CSF2 reduziu o percentual de células apoptóticas em blastocistos que foram submetidos ao choque térmico ainda no estágio mórula (Loureiro *et al.*, 2011), contudo não há relatos da ação do CSF2 em embriões expostos ao choque térmico em estádios anteriores.

Devido ao impacto do estresse térmico pelo calor na qualidade e competência de embriões nas fases iniciais de desenvolvimento e a capacidade do CSF2 em modular o desenvolvimento embrionário, testou-se a hipótese de que o choque térmico entre os dias 2,5 e 3 após a inseminação reduz a competência do embrião em alcançar o estágio de blastocisto e sua qualidade; assim como o CSF2 é capaz de recuperar a qualidade de embriões previamente expostos ao choque térmico.

4.4 Material e Métodos

4.4.1 Produção de embriões

As rotinas para produção *in vitro* de embriões foram realizadas no Laboratório de produção *in vitro* de embriões do Departamento de Clínica e Cirurgias Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, no período de inverno, entre os meses de junho a agosto de 2019. Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma[®] Chemical Co. (St.Louis, MO, EUA), exceto quando explicitado.

Ovários obtidos de animais de composição *Bos indicus* e *Bos taurus* foram obtidos em abatedouro local e transportados em solução salina 0,9% NaCl entre 35 e 39°C, por não mais que quatro horas. Complexos cumulus oócito (CCO) foram recuperados por aspiração de folículos ovariano com diâmetro entre 2 e 8mm, utilizando seringa de 5mL e agulha 40x12mm. O aspirado foi depositado em tubos cônicos, em banho maria, à temperatura de 37°C por 10 min, para sedimentação dos CCO presentes no fluido folicular.

O material sedimentado foi depositado em placa de petri e avaliado em estereomicroscópio para seleção dos CCO. Foram selecionados CCO com pelo menos três camadas compactas de células do cumulus e citoplasma homogêneo, lavados em meio de lavagem (TCM-199 HEPES [Gibco® Life Technologies, Grand Island, EUA] suplementado com 10% de SFB, 22µg/mL de piruvato de sódio, 83,4µg/mL de sulfato de amicacina) e divididos aleatoriamente em grupos de 15 a 20 estruturas em gotas de 70µL de meio de maturação (TCM-199 tamponado com bicarbonato [Gibco® Life Technologies, Grand Island, EUA] suplementado com 10% de SFB, 22µg/mL de piruvato de sódio, 83,4µg/mL de sulfato de amicacina, 5µg/mL de LH [Lutropin-V, Bioniche® Inc., Canadá], 1µg/mL de FSH [Folltropin-V, Bioniche® Inc., Canadá] e 10µg/mL de estradiol) coberto por óleo mineral (IrvineScientific®, CA, EUA). A maturação *in vitro* foi realizada entre 22 e 24h a 38,5°C em atmosfera úmida a 5% (v/v) de CO₂ em ar.

Os CCO maturados foram transferidos para gotas de 70µL de meio FERT-TALP (suplementado com 83,4µg/mL de amicacina, 27µg/mL de penicilina, 1µg/mL de hipotaurina, 0,3µg/mL de epinefrina, 5µg/mL de albumina sérica bovina, 22µg/mL de piruvato de sódio e 10µg/mL de heparina) cobertas por óleo mineral (IrvineScientific®, CA, EUA) para fertilização *in vitro* (FIV). Foi utilizado o sêmen de um único touro da raça Holandesa, de mesma partida, previamente testado para fertilidade em produção *in vitro* de embriões. O sêmen foi descongelado em água a 37°C por 30 segundos e selecionado pelo método do gradiente descontínuo de Percoll (45/95%). O pellet resultante da centrifugação em Percoll foi lavado, por centrifugação, em meio de capacitação espermática (TALP-SÊMEN) e ressuspenso em meio FERT-TALP. As gotas foram fertilizadas com a concentração final de $\sim 2 \times 10^6$ de espermatozoides/mL e incubadas entre 18 e 22h a 38,5°C em atmosfera úmida a 5% (v/v) de CO₂ em ar.

O dia da FIV foi considerado o dia zero (D0). A produção de embriões foi realizada em sete replicatas com total de 1.972 oócitos fertilizados.

Após a FIV os prováveis zigotos (PZ) foram desnudados por agitação com pipeta automática ajustada para 60% do volume da gota, ainda na placa de FIV. Os PZ foram lavados e depositados em gotas de 70 μ L de meio SOF (suplementado com 0,5% de BSA) sem soro fetal bovino (SFB) cobertas por óleo mineral (IrvineScientific®, CA, EUA) para o cultivo *in vitro* (CIV). Os embriões foram cultivados por sete dias a 38,5°C (exceto quando em condição de choque térmico) em atmosfera úmida a 5% de CO₂ (v/v), 5% O₂ (v/v) e 90% de N₂ (v/v) em ar. As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas nos dias 2,5 (60h pós inseminação [pi]) e dia 7 (168h pi), respectivamente.

No CIV, os PZ foram divididos aleatoriamente em grupos experimentais conforme a exposição ao choque térmico e à embriocina CSF2, formando um fatorial 2 x 2, a saber: I) Sem choque térmico e sem adição de CSF2: embriões mantidos a 38,5°C ao longo de todo o CIV, e sem adição da embriocina CSF2 ao meio de cultivo no dia 5 (120h pi); II) Sem choque térmico e com adição de CSF2: embriões mantidos a 38,5°C ao longo de todo o CIV, e com adição da embriocina CSF2 ao meio de cultivo no dia 5 (120h pi); III) Choque térmico e sem adição de CSF2: embriões submetidos a choque térmico de 41°C entre os dia 2,5 e 3 (60-72h pi) e demais períodos a 38,5°C, sem adição da embriocina CSF2 ao meio de cultivo no dia 5 (120h pi); IV) Choque térmico e adição de CSF2: embriões submetidos a choque térmico de 41°C entre os dia 2,5 e 3 (60-72h pi) e demais períodos a 38,5°C, e com adição da embriocina CSF2 ao meio de cultivo no dia 5 (120h pi).

A embriocina CSF2 (RP0871B-005, Kingfisher Biotech Inc., MN, EUA), foi diluída em solução stock na concentração de 1000 ng/mL em DPBS contendo 1 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos e armazenada em alíquotas a -20°C. No dia de adição da embriocina ao meio CIV, foi preparada uma diluição da solução stock de CSF2 em meio SOF sem soro fetal bovino, na 100 ng/mL. Foram retirados 7 μ L de cada gota de CIV e adicionados 7 μ L desta diluição, alcançando a concentração final 10 ng/mL de CSF2 na gota. Aos grupos sem adição de CSF2 (grupos veículo) o mesmo procedimento foi realizado, porém ao invés da solução stock de CSF2, a diluição em meio SOF sem soro fetal bovino foi realizada com DPBS contendo 1

mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, o veículo ao qual o CSF2 encontrava-se diluído na solução stock.

4.4.2 Degradação de DNA

Embriões recuperados aleatoriamente no dia sete do CIV (168h pi), de quatro réplicas de todos os tratamentos, nos estádios de blastocisto e blastocisto expandido (total de 62 estruturas), foram fixados em paraformaldeído 4% por 20 min e armazenados em PBS com 0,1% de BSA a 4°C para posterior marcação de núcleos apoptóticos (DNA fragmentado) por fluoresceína (verde). Utilizou-se o kit DeadEnd Fluorometric TUNEL System (TUNEL; Promega® Corporation, Wisconsin, USA) e DNA com Hoescht 33342 (azul).

As estruturas foram lavadas por cinco minutos em solução de PBS com adição de 0,2% de Triton X-100 (Promega® Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Posteriormente, permaneceram por dez minutos em gota de 50µL em tampão de equilíbrio. Foram adicionados em gotas de 50µL de solução de reação (45µL de tampão de equilíbrio, 5 µL mix de nucleotídeos e 1µL de enzima rTdT) por 60 minutos em estufa a 38,5°C com atmosfera umidificada, protegidos de luz. Na sequência, as estruturas passaram por duas lavagens de 15 minutos cada em solução de 500µL de reagente SSC 20x e 4,5mL de água Milli-Q, para o bloqueio da reação. Os embriões passaram por três lavagens de cinco minutos em PBS e, posteriormente, foram depositados em lâminas histológicas com glicerol adicionado do corante Hoescht 33342, e cobertos com lamínula.

Imagens foram realizadas com microscópio de epifluorescência com objetiva de 40x e filtro azul (460nm), para identificação dos núcleos celulares por meio da marcação do DNA pelo Hoescht 33342, e filtro verde (520 ± 20nm) para identificação do DNA fragmentado de células apoptóticas marcadas pelo TUNEL. As imagens foram avaliadas com o software Image J (Versão 1.51j8, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Os núcleos dos blastocistos foram contabilizados pela ferramenta “Multi point”. Para identificação das células apoptóticas as imagens dos embriões marcados por Hoescht 33342 e TUNEL foram sobrepostas por meio dos comandos “image” > “color” > “Merge channels”, em seguida a coloração dos núcleos marcados por Hoechst foi reduzida as bordas de cada núcleo pelos comandos “Process” > “Find edge”. Este procedimento permite a identificação de cada núcleo e

a visualização da imagem posterior, onde há marcação pelo TUNEL, permitindo a correta identificação da marcação de DNA fragmentado nos núcleos dos blastômeros.

A região das células da massa celular interna (MCI) foi identificada como uma agregação de células no blastocisto, e as demais células foram consideradas trofotoderma (TE). Devido à dificuldade em distinguir entre células da MCI e células da TE, sobrepostas na região da MCI, as análises foram realizadas apenas em células identificadas claramente como TE na região do TE ou para todas as células do embrião, sem distinção de região. Cada blastocisto foi avaliado para o número de células do TE e número total de células, assim como número de células do TE apoptóticas e total de células apoptóticas. O índice de células apoptóticas para TE e total de células do embrião foi calculado a partir da razão entre o número de células apoptóticas e o número total de células do embrião e, posteriormente, multiplicado por 100.

4.4.3 Atividade mitocondrial

Embriões recuperados no dia sete do CIV (168h pi), de três réplicas no estágio de blastocisto e blastocisto expandido (total de 68 estruturas), foram imediatamente marcados pelo MitoTracker Orange (Invitrogen®, OR, USA) para avaliação de atividade mitocondrial. Os embriões foram retirados do meio de CIV, lavados em três gotas de PBS com 0,4% de BSA e, posteriormente, incubados por 30 min em solução de 200nM de MitoTracker Orange, em temperatura ambiente. Após a incubação, embriões foram lavados em três gotas de PBS com 0,4% de BSA, fixados em formaldeído 3,7% por 60 min e, posteriormente, depositados em lâminas histológicas com glicerol adicionado do corante Hoescht 33342, e cobertos com lamínula.

Imagens foram realizadas com microscópio confocal com objetiva de 20x, ganho de 1.0, Pinhole de 9 μ m, filtros 415-480 e laser de comprimento de onda 405nm (28%) para identificação dos embriões pela marcação do DNA pelo Hoescht 33342, e laser de comprimento de onda 532nm (11%) para identificação da marcação de mitocôndrias ativas no citoplasma celular, pelo MitoTracker Orange.

A intensidade de fluorescência mitocondrial foi avaliada para cada blastocisto por meio do software Image J (Versão 1.51j8, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). O perímetro do embrião foi manualmente delimitado usando a ferramenta *freehand selections* para mensurar a intensidade de fluorescência nas imagens

marcadas em vermelho. Na mesma imagem, em uma área escura aleatória próxima ao embrião, foi mensurada a intensidade de fluorescência do *background* e este valor foi subtraído do valor obtido para fluorescência mitocondrial.

4.4.4 Percentual de lipídios

Embriões recuperados no dia sete (168h pi), de cinco réplicas no estágio de blastocisto e blastocisto expandido (total de 49 estruturas), foram fixados em paraformaldeído 4% como descrito anteriormente e, em seguida corados com Sudan Black (Merck® Ag Darmstadt, Alemanha). Inicialmente, os embriões foram depositados em etanol 50% por 2 min e incubados por 5 min em solução de 1% de Sudan Black em etanol 70% (p/v). Posteriormente, foram lavados por três vezes em etanol 50% por 5 min, seguida por lavagem em PBS com 0,1% de BSA por 5 min, e depositados em lâmina com lamínula.

As imagens foram realizadas por microscopia de luz e avaliadas com o software Image J. Utilizando a ferramenta *freehand selections* foi feita a seleção ao redor do blastocisto, sem incluir possíveis artefatos, e mensurada a área total do embrião. Posteriormente, a imagem do blastocisto foi cortada e colada em uma nova janela do software. Por meio dos comandos “Image” > “Adjust” > “Color Threshold” a área marcada pelo Sudan Black, representativa da localização das gotículas de lipídios, foi identificada e mensurada pelo programa. Por meio da razão entre a área ocupada pelas gotículas de lipídios e a área total do embrião, multiplicado por 100, foi calculado o percentual da área de lipídios de cada blastocisto.

4.4.5 Análise estatística

Análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA, USA). Os efeitos do choque térmico, CSF2 e interação dos dois fatores sobre o percentual de oócitos que clivaram, percentual de embriões clivados que se tornaram blastocisto, e percentual de oócitos fertilizados que se tornaram blastocisto, foram avaliados por tabela de contingência. O número de células do trofotoderma, número de células do trofotoderma apoptóticas, percentual de células do trofotoderma apoptóticas, número total de células do blastocisto, número total de células apoptóticas do blastocisto, percentual do total de células apoptóticas do blastocisto, atividade mitocondrial e percentual de lipídio foram analisados pelo

método da Two-way ANOVA, com nível de significância de 5%. Comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey.

4.5 Resultados

4.5.1 Desenvolvimento embrionário

Não houve efeito do choque térmico, do CSF2 ou interação dos dois fatores no percentual de oócitos que clivaram, percentual de embriões clivados e percentual de oócitos fertilizados que se tornaram blastocistos (Figura 1).

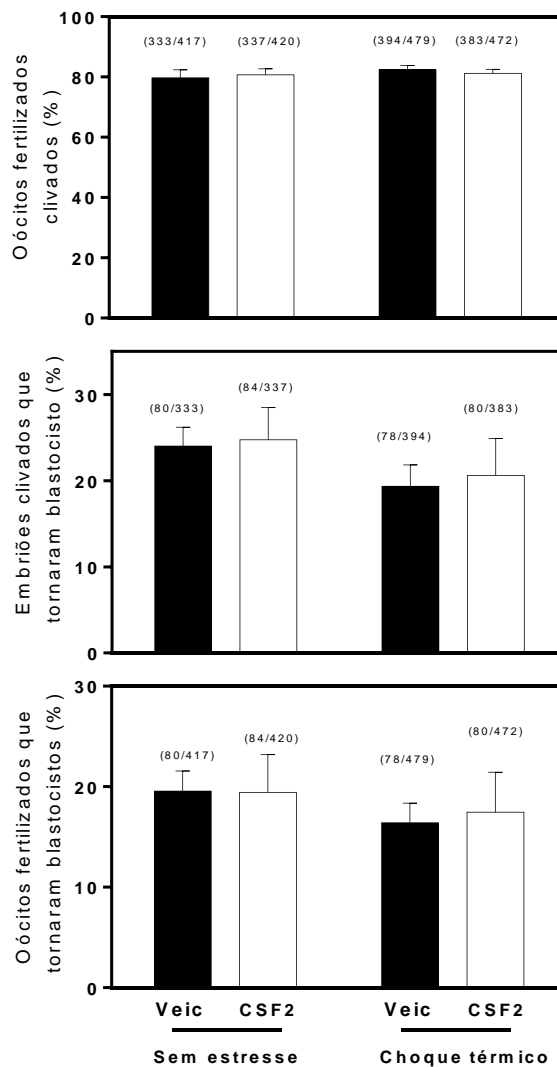


Figura 1. Competência de clivagem após fecundação *in vitro* de oócitos bovinos, e de desenvolvimento de embriões ao estágio de blastocisto sob efeito de choque térmico

e Fator Estimulador de Colônia 2. Média \pm SEM. CSF2: Fator Estimulador de Colônia 2; Veic: veículo; controle. $P > 0,05$.

4.5.2 Número de células embrionárias e apoptose

Não houve efeito do choque térmico, do CSF2 ou interação dos dois fatores no número de células do trofotoderma e no número total de células do blastocisto. Contudo, embriões submetidos ao choque térmico apresentaram menor número ($P=0,0270$) e percentual ($P=0,0240$) de células apoptóticas no trofotoderma, menor número ($P=0,0029$) e percentual ($P=0,0031$) do total de células apoptóticas do blastocisto em relação aos embriões que não sofreram choque térmico durante o cultivo (Figura 2).

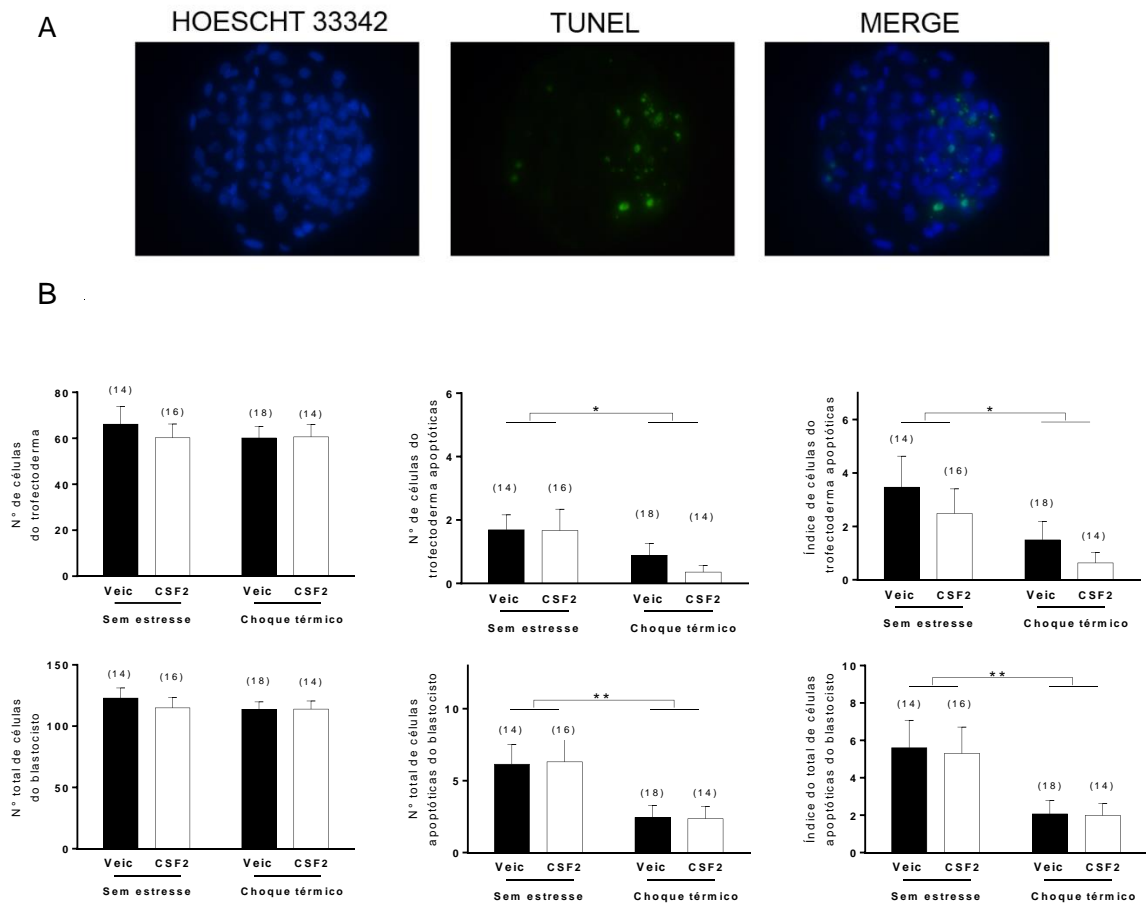


Figura 2. Número total de células e células TUNEL-positivas em blastocistos bovinos em relação ao estímulo por choque térmico e Fator Estimulador de Colônia 2 no cultivo embrionário *in vitro*. (A) Imagens representativas da marcação de Hoescht e TUNEL em blastocisto; aumento de 400 X; (B) Média \pm SEM do número de células e células

TUNEL-positivas do trofoblasto e total do embrião. Números entre parênteses representam o n de cada tratamento. CSF2: Fator Estimulador de Colônia 2; Veic: veículo; controle. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.5.3 Atividade mitocondrial

O choque térmico entre os dias 2,5 e 3 do cultivo embrionário reduziu a atividade mitocondrial em blastocistos ($P = 0,0073$). Não houve efeito do CSF2 ou interação com choque térmico na atividade mitocondrial (Figura 3).

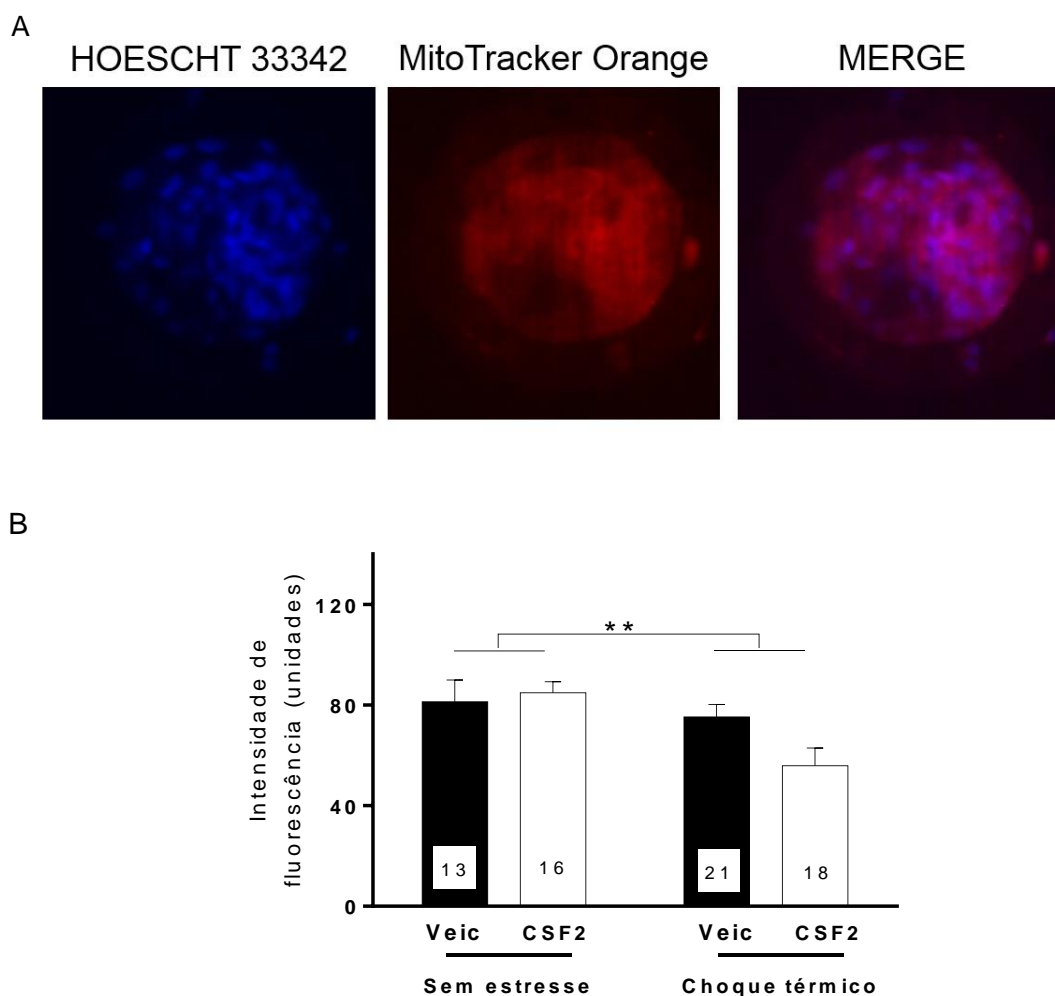


Figura 3. Atividade mitocondrial *in vitro* em blastocistos bovinos em relação ao estímulo por choque térmico e Fator Estimulador de Colônia 2 no cultivo embrionário *in vitro*. (A) Imagens representativas da marcação com Hoescht e MitoTracker Orange em blastocisto; aumento de 200 X; (B) Média \pm SEM da intensidade de fluorescência representativa da atividade mitocondrial em blastocistos. Números representam o n

de cada tratamento. CSF2: Fator Estimulador de Colônia 2; Veic: veículo; controle. ** $P < 0,01$.

4.5.4 Percentual de lipídios

Não houve efeito do choque térmico ($P=0,3691$), CSF2 ($P=0,7879$) e interações ($P=0,7107$) no percentual da área ocupada por lipídios nos blastocistos (Figura 4).

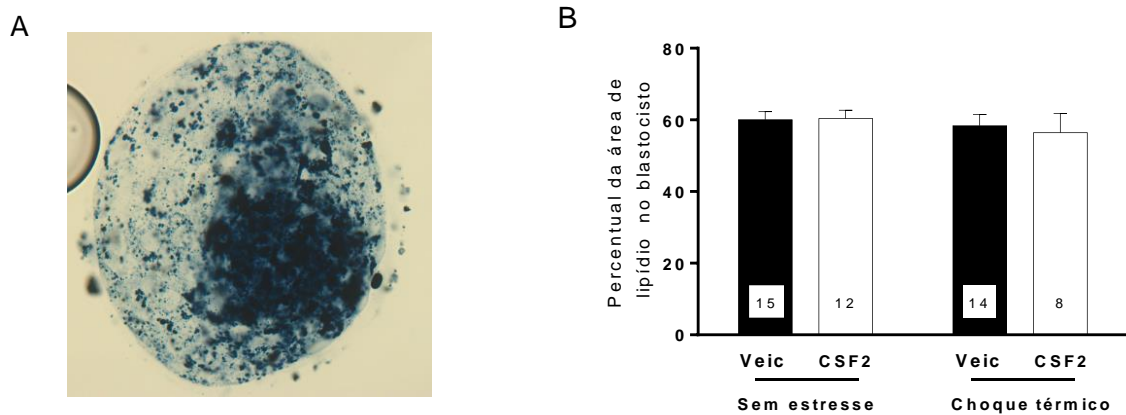


Figura 4. Percentual de lipídios em blastocistos bovinos em relação ao estímulo por choque térmico e Fator Estimulador de Colônia 2 no cultivo embrionário *in vitro*. (A) Imagem representativa da marcação de lipídios por Sudan Black em blastocisto; aumento de 400 X; (B) Média \pm SEM do percentual da área de lipídios no blastocisto. Números representam o n de cada tratamento. CSF2: Fator Estimulador de Colônia 2; Veic: veículo; controle. $P > 0,05$.

4.6 Discussão

O estresse térmico pelo calor prejudica o desenvolvimento do embrião pré-implantação, reduzindo sua competência em desenvolver e estabelecer gestação (Stewart *et al.*, 2011; Schüller *et al.*, 2014). No presente trabalho embriões foram submetidos ao choque térmico entre os dias 2,5 e 3 do CIV, período das primeiras divisões celulares e ativação do genoma embrionário (Graf *et al.*, 2014). Também, foi testado se a embriocina Fator Estimulador de Colônia 2 (CSF2) recuperaria modificações induzidas pelo choque térmico, uma vez que modula o desenvolvimento embrionário e fetal (De Moraes *et al.*, 1997; Loureiro *et al.*, 2011b; Siqueira *et al.*, 2017). Os embriões submetidos ao choque térmico não apresentaram diferença na competência de desenvolvimento e no número de células embrionárias, porém,

apresentaram redução nas células TUNEL-positivas (apoptose) e na atividade mitocondrial.

No presente estudo o índice de apoptose nos blastocistos do grupo sem estresse foi de 6,2%, semelhante aos resultados de outros estudos em grupos não submetidos ao choque térmico, que variam entre 4 e 7% (Loureiro *et al.*, 2007; Loureiro *et al.*, 2011); já nos blastocistos submetidos ao choque térmico, o índice apoptótico foi 2,4%, significativamente menor que o controle e abaixo do comumente observado em condições normais de cultivo *in vitro* (Loureiro *et al.*, 2007; Loureiro *et al.*, 2011).

A indução de apoptose celular por estresse térmico pelo calor, em certos limites, é importante mecanismo para a eliminação de células embrionárias lesionadas, possibilitando que o embrião prossiga seu desenvolvimento (Paula-Lopes e Hansen, 2002b). Até o estágio de oito-16 células no dia três do desenvolvimento os embriões não são capazes de responder ao choque térmico com aumento da apoptose (Paula-Lopes *et al.*, 2002a). Enquanto que choque térmico em mórulas reflete em aumento de apoptose no estágio de blastocistos (Loureiro *et al.*, 2007; Loureiro *et al.*, 2011). Como o choque térmico no presente trabalho foi induzido no período em que os embriões ainda não são capazes de responder com aumento da morte celular, é possível que tenha ocorrido inibição deste mecanismo de defesa, que permaneceu até o estágio de blastocisto. O aumento do percentual de células apoptóticas induzido por choque térmico está associado com redução do número total de células em blastocistos (Loureiro *et al.*, 2011). Logo, a ausência de efeito do choque térmico entre os dias 2,5 e 3 do CIV no número de células do blastocisto pode ser reflexo da reduzida apoptose apresentada pelos embriões deste grupo, reduzindo a qualidade do embrião.

As mitocôndrias são responsáveis por prover ATP para o desenvolvimento embrionário e, em condições normais, sua função aumenta ao longo do desenvolvimento (Muller *et al.*, 2019). A redução na atividade mitocondrial, associada com a redução na apoptose celular dos blastocistos originados de embriões submetidos ao choque térmico *in vitro*, corrobora com o entendimento de que o choque térmico, no período realizado, induziu modificações que resultaram em redução na qualidade embrionária que persistiram nos próximos estádios de

desenvolvimento. Corroborando os resultados do presente estudo, alterações na função mitocondrial de oócitos expostos ao choque térmico persistiram em embriões em estádios iniciais de desenvolvimento (Payton *et al.*, 2018). A redução na atividade mitocondrial pode levar à redução na disponibilidade de ATP necessária para as intensas divisões celulares, necessárias para a progressão do desenvolvimento, podendo reduzir a competência do embrião em estabelecer a gestação.

O efeito do CSF2 sobre o desenvolvimento de embriões bovinos tem resultados variáveis na literatura. É descrito aumento da taxa de blastocistos (De Moraes *et al.*, 1997; Loureiro *et al.*, 2009; Siqueira *et al.*, 2016), redução (De Moraes *et al.*, 1997; Dobbs *et al.*, 2013; Carvalheira *et al.*, 2019) e até mesmo ausência de efeito (Dobbs *et al.*, 2013; Tríbulo *et al.*, 2017; Zolini *et al.*, 2019), como observado no presente estudo.

Mórulas submetidas ao choque térmico de 42°C por 15h no dia seis do CIV resultaram em blastocistos com maior percentual de células apoptóticas, já mórulas previamente tratadas com CSF2 no dia cinco do CIV, quando submetidas as mesmas condições de estresse, apresentaram redução no percentual de células apoptóticas dos blastocistos produzidos (Loureiro *et al.*, 2011). Nos embriões submetidos ao choque térmico entre os dias 2,5 e 3 do CIV o tratamento posterior com CSF2 não interferiu nas modificações induzidas pelo choque térmico, indicando que a embriocina não é capaz de recuperar alterações já estabelecidas pela ação do estresse celular.

4.7 Conclusões

Estresse térmico pelo calor entre os dias 2,5 e 3 do desenvolvimento embrionário não interferiu na competência do embrião em alcançar o estágio de blastocisto, mas reduziu a qualidade celular por redução da apoptose e atividade mitocondrial, comprometendo sua viabilidade. A embriocina CSF2 não apresentou efeito sob o desenvolvimento e qualidade de embriões previamente estressados pelo choque térmico entre os dias 2,5 e 3 do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

4.8 Referências

ASCARI, I.J.; ALVES, N.G.; JASMIN, J.; LIMA, R.R.; QUINTÃO, C.C.R.; OBERLENDER, G.; MORAES, E.A.; CAMARGO, L.S.A. Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte

competence. *Domestic Animal Endocrinology*. v. 60, p. 50-60, 2017. DOI: 10.1016/j.domaniend.2017.03.003.

BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; RODRIGUES, C.A.; BÓ, G.A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*. v. 76, p. 1583–1593, 2011. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.006.

CARVALHEIRA, L.R.; TRÍBULO, P.; BORGES, A.M.; HANSEN, P.J. Sex affects immunolabeling for histone 3 K27me3 in the trophectoderm of the bovine blastocyst but not labeling for histone 3 K18ac. *PLoS ONE*. v. 14, p. e0223570, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223570>.

DE MORAES, A.A.S.; HANSEN, P.J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1060–1065, 1997. DOI: 10.1095/biolreprod57.5.1060.

DOBBS, K.B.; KHAN, F.A.; SAKATANI, M.; MOSS, J.I.; OZAWA, M.; EALY, A.D.; HANSEN, P.J. Regulation of pluripotency of inner cell mass and growth and differentiation of trophectoderm of the bovine embryo by colony stimulating factor. *Biology of Reproduction*. v. 89, p. 1-10, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.113183>.

DOBBS, K.B.; GAGNÉ, D.; FOURNIER, E.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; BLOCK, J.; SIRARD, M.A.; BONILLA, L.; EALY, A.D.; LOUREIRO, B.; HANSEN, P.J. Sexual dimorphism in developmental programming of the bovine preimplantation embryo caused by colony-stimulating factor 2. *Biology of Reproduction*. V. 91, p. 1-12, 2014. DOI: 10.1095/biolreprod.114.121087.

GRAF, A.; KREBS, S.; ZAKHARTCHENKO, V.; SCHWALB, B.; BLUMA, H.; WOLF, E. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *PNAS*. v. 111, p. 4139-44, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1321569111 [doi/10.1073/pnas.1321569111](https://doi.org/10.1073/pnas.1321569111).

HANSEN, P.J.; DOBBS, K.B.; DENICOL, A.C.; SIQUEIRA, L.G.B. Sex and the preimplantation embryo - implications of sexual dimorphism in the preimplantation period for maternal programming of embryonic development. *Cell Tissue Research*. v. 363, p. 237–247, 2016. DOI:10.1007/s00441-015-2287-4.

HANSEN, P.J.; DENICOL, A.C.; DOBBS, K.B. Maternal embryokines that regulate development of the bovine preimplantation embryo. *Turkey Journal of Veterinary Animal Science*. v. 38, p. 589-598, 2014 DOI: 10.3906/vet-1405-96.

LOUREIRO, B.; BRAD, A.M.; HANSEN, P.J. Heat shock and tumor necrosis factor- α induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9-dependent mechanism. *Reproduction*. v.133, p. 1129–1137, 2007. DOI: 10.1530/REP-06-0307.

LOUREIRO, B.; BONILLA, L.; BLOCK, J.; FEAR, J.M.; BONILLA, A.Q.S.; HANSEN, P.J. Colony-stimulating factor 2 (CSF-2) improves development and post transfer survival of bovine embryos produced in vitro. *Endocrinology*. v. 150, p. 5046–5054, 2009. DOI: 10.1210/en.2009-0481.

LOUREIRO, B.; OLIVEIRA, L.J.; FAVORETO, M.G.; HANSEN, P.J. Colony-stimulating factor 2 inhibits induction of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *American Journal of Reproductive Immunology*. v. 65, p. 578–588, 2011 a. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2010.00953.x.

LOUREIRO, B.; BLOCK, J.; FAVORETO, M.G.; CARAMBULA, S.; PENNINGTON, K.A.; EALY, A.D.; HANSEN, P.J. Consequences of conceptus exposure to colony-stimulating factor 2 on survival, elongation, interferon-t secretion, and gene expression. *Reproduction*. v. 141, p. 617–624, 2011 b. DOI: 10.1530/REP-10-0511.

MULLER, B.; LEWIS, N.; ADENIYI, T.; LEESE, H.J.; BRISON, D.R.; STURMEY, R.G. Application of extracellular flux analysis for determining mitochondrial function in mammalian oocytes and early embryos. *Scientific Reports*. v. 9, p.16778, 2019. DOI: <https://DOI.org/10.1038/s41598-019-53066-9>.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of Reproduction*. v. 66, p. 1169–1177, 2002 a. DOI: <https://DOI.org/10.1093/biolreprod/66.4.1169>.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 295, p. 37–42, 2002 b. DOI: 10.1016/s0006-291x(02)00619-8.

PAYTON, R.R.; RISPOLI, L.A.; NAGLE, K.A.; GONDRO, C.; SAXTON, A.M.; VOY, B.H.; EDWARDS, J.L. Mitochondrial-related consequences of heat stress exposure during bovine oocyte maturation persist in early embryo development. *Journal of Reproduction Development*. v. 64, p. 243–251, 2018. DOI: 10.1262/jrd.2017-160.

SCHÜLLER, L.K.; BURFEIND, O.; HEUWIESER, W. Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature–humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology*. v. 81, p. 1050-1057, 2014. DOI: <https://DOI.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.029>.

SIQUEIRA, L.G.B.; HANSEN, P.J. Sex differences in response of the bovine embryo to colony-stimulating factor 2. *Reproduction*. v. 152, p. 645–654, 2016. DOI: 10.1530/REP-16-0336.

SIQUEIRA, L.G.; TRÍBULO, P.; CHEN, Z.; DENICOL, A.C.; ORTEGA, M.S.; NEGRÓN-PÉREZ, V.M.; KANNAMPUZHA-FRANCIS, J.; POHLER, K.G.; RIVERA, R.M.; HANSEN, P.J. Colony-stimulating factor 2 acts from days 5 to 7 of development to modify programming of the bovine conceptus at day 86 of gestation. *Biology of Reproduction*. v. 96, p. 743–757, 2017. DOI: 10.1093/biolre/iox018.

STEWART, B. M.; BLOCK, J.; MORELLI, P.; NAVARETTE, A. E.; AMSTALDEN, M.; BONILLA, L.; HANSEN, P.J.; BILBY, T.R. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Journal of Dairy Science*. v. 94, p. 3437–3445, 2011. DOI: 10.3168/jds.2010-4008.

TRÍBULO, P.; BERNAL, B.B.H.; RUIZ, A.; TRÍBULO, A.; TRÍBULO, R.J.; TRÍBULO, H.E.; BO, G.A.; HANSEN, P.J. Consequences of exposure of embryos produced in vitro in a serum-containing medium to dickkopf-related protein 1 and colony stimulating factor 2 on blastocyst yield, pregnancy rate, and birth weight. *Journal of Animal Science*. v. 95, p. 4407–4412, 2017. DOI: 10.2527/jas2017.1927.

TRÍBULO, P.; SIQUEIRA, L.G.B.; OLIVEIRA, L.J.; SCHEFFLER, T.; HANSEN, P.J. Identification of potential embryokines in the bovine reproductive tract. *Journal of Dairy Science*. v. 101, p. 690–704, 2018. DOI: <https://DOI.org/10.3168/jds.2017-13221>.

KANNAMPUZHA-FRANCIS, J.; DENICOL, A.C.; LOUREIRO, B.; KANIYAMATTAM, K.; ORTEGA, M.S.; HANSEN, P.J. Exposure to colony stimulating factor 2 during preimplantation development increases postnatal growth in cattle. *Molecular Reproduction & Development*. V.82, p. 892–897, 2015. DOI: 10.1002/mrd.22533.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*. V. 121, p. 447–454, 2001. DOI: 10.1530/rep.0.1210447.

ZOLINI, A.M.; BLOCK, J.; RABAGLINO, M.B.; TRIBULO, P.; HOELKER, M.; RINCON, G.; BROMFIELD, J.J.; HANSEN, P.J. Molecular fingerprint of female bovine embryos produced in vitro with high competence to establish and maintain pregnancy. *Biology of Reproduction*. ioz190, 2019. DOI: <https://DOI.org/10.1093/biolre/ioz190>.

Capítulo 3

Sexo afeta a imunomarcção em histona 3 K27me3 no trofectoderma de blastocistos bovinos mas não a marcação em histona 3 K18ac

Trabalho publicado na revista PLoS ONE

Carvalho, Luciano de R.; Tríbulo, Paula; Borges, Alan M.; Hansen, Peter J. Sex affects immunolabeling for histone 3 K27me3 in the trophoctoderm of the bovine blastocyst but not labeling for histone 3 K18ac. PLoS ONE, v. 14, p. e0223570, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223570>

5. SEXO AFETA A IMUNOMARCAÇÃO EM HISTONA 3 K27ME3 NO TROFECTODERMA DE BLASTOCISTOS BOVINOS MAS NÃO A MARCAÇÃO EM HISTONA 3 K18AC

Luciano de R. Carvalheira^{1,2}, Paula Tríbulo^{1,3}, Alan M. Borges² e Peter J. Hansen¹

¹ Department of Animal Sciences, D.H. Barron Reproductive and Perinatal Biology Research Program, and Genetics Institute, University of Florida, Gainesville, Florida 32611-00910, USA.

² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³ Present address: Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Córdoba, Argentina.

5.1 Resumo

O embrião de mamíferos apresenta diferenças entre os sexos no período pré-implantacional. Contudo, a competência de desenvolvimento embrionário é dependente da contribuição paterna e pode ser modificado por embriocinas produzidas pelo endométrio, como o Fator Estimulador de Colônia 2 (CSF2). O período pré-implantacional é caracterizado por grandes alterações epigenéticas no DNA e histona. É possível, portanto, que os efeitos do sexo, touro e moléculas regulatórias sejam mediados por alterações em modificações epigenéticas. Foi testado se os níveis globais de duas modificações de histona no trofotoderma do blastocisto bovino foram afetados pelo sexo, touro e CSF2. Verificou-se que a quantidade de H3K27me3 imunomarcadas foi maior ($P=0.030$) para embriões do sexo masculino do que embriões do sexo feminino. Adicionalmente, a marcação de H3K27me3 e H3K18ac foi dependente do touro que o embrião foi originado. Embora o CSF2 tenha reduzido a proporção de embriões que desenvolveram para o estágio de blastocisto, não houve efeito do CSF2 na marcação de H3K27me3 ou H3K18ac. Os resultados indicam que o trofotoderma do blastocisto bovino pode ser modificado epigeneticamente pelo sexo do embrião e herança paterna através de alterações em marcações epigenéticas em histonas.

Palavras-chave: blastocistos, CSF2, epigenética, histona H3, sexo, touro.

5.2 Abstract

The mammalian embryo displays sexual dimorphism in the preimplantation period. Moreover, competence of the embryo to develop is dependent on the sire from which the embryo is derived and can be modified by embryokines produced by the endometrium such as colony stimulating factor 2 (CSF2). The preimplantation period is characterized by large changes in epigenetic modifications of DNA and histones. It is possible, therefore, that effects of sex, sire, and embryo regulatory molecules are mediated by changes in epigenetic modifications. Here it was tested whether global levels of two histone modifications in the trophectoderm of the bovine blastocyst were affected by sex, sire, and CSF2. It was found that amounts of immunolabeled H3K27me3 were greater ($P=0.030$) for male embryos than female embryos. Additionally, labeling for H3K27me3 and H3K18ac depended upon the bull from which embryos were derived. Although CSF2 reduced the proportion of embryos developing to the blastocyst, there was no effect of CSF2 on labeling for H3K27me3 or H3K18ac. Results indicate that the blastocyst trophoctoderm can be modified epigenetically by embryo sex and paternal inheritance through alterations in histone epigenetic marks.

Keywords: blastocyst, histone H3, CSF2, epigenetics, sex, sire.

5.3 Introdução

O embrião de mamíferos apresenta diferenças entre os sexos nos estágios iniciais do desenvolvimento e antes da gonadogenese. Existem dissimilaridades entre embriões do sexo masculino e feminino no período pré-implantacional na expressão gênica [1-6], número de mitocôndrias [7], secreção de miRNAs [8], resposta aguda a embriocinas específicas [9], alterações no desenvolvimento em resposta a estresse específico [10,11], e alterações de longo prazo na programação de desenvolvimento fetal causada por alterações no microambiente dos embriões [ver 12,13 para revisão].

O principal fator de diferença entre embriões do sexo masculino e feminino no início do desenvolvimento, particularmente antes da inativação do cromossoma-X, é a distribuição desigual dos cromossomas sexuais. Em bovinos, por exemplo, cerca de 50% dos genes diferencialmente expressos entre embriões do sexo masculino e feminino no estágio de mórula são localizados no cromossoma X [3] e 18-62% no estágio de blastocisto [2, 6]. Foi hipotetizado que alterações transcricionais e

epigenéticas derivadas dos cromossomas sexuais regulam cromossomas autossômicos no início do desenvolvimento para estabelecer padrões sexo-específicos no epigenoma tardiamente no desenvolvimento [14]. Diferenças sexuais nos graus de metilação em locus específicos de blastocisto têm sido identificados em bovinos [7].

O epigenoma do embrião bovino passa por alterações de larga escala durante o período pré-implantação. Inicialmente, a metilação global de DNA e a extensão de várias modificações de histonas (H3K27me3, H3K9ac, H3K18ac e H3K4me3) declina abundantemente no estágio de 8-células antes de aumentar até o estágio de blastocisto [15-18]. Outras modificações de histona, especificamente H3K9me2, H4K5ac e H4K8ac não declinam durante as primeiras clivagens, mas aumentam em abundância dos estágios de mórula para o blastocisto [18].

Foi testada a hipótese de que duas modificações em histonas H3 importantes para regulação epigenética no trofotoderma (TE) do blastocisto bovino são modificadas pelo sexo do embrião. As modificações avaliadas foram trimetilação de lisina 27 (H3K27me3), o qual está associado ao silenciamento na transcrição em regiões gene-específicas, e acetilação de lisina 18 (H3K18ac), que aumenta a acessibilidade a cromatina e atividade transcricional [19]. Também foi testado se CSF2, que pode afetar a função do trofoblasto em embriões do sexo masculino diferentemente que em embriões do sexo feminino [20], altera modificações de histonas no TE de maneira dependente do sexo. Adicionalmente, foi hipotetizado que a contribuição paterna pode afetar marcas epigenéticas em histonas no trofotoderma de blastocistos. Essa hipótese é baseada em observações de que o touro usado para contribuir com espermatozoides para fertilização pode ter um grande impacto na competência do embrião resultante para se desenvolver até o estágio do blastocisto [21] e também pode afetar a metilação de DNA em blastocistos [22].

5.4 Material e métodos

5.4.1 Produção de embrião

Complexos cumulus oócitos (CCO) foram obtidos usando bisturis para cortar folículos de 2-8 mm de diâmetro na superfície de ovários obtidos em matadouro local. Ovários foram obtidos de bovinos de um misto de genótipos indeterminados. A maioria dos oócitos eram de *Bos taurus*, mas alguns foram coletados de animais contendo

proporções indeterminadas de genética *B. indicus*. Após cortar a superfície do ovário com bisturi, o ovário era agitado vigorosamente em meio de lavagem de oócito BoviPRO (MOFA Global, Verona, WI, USA) para liberar os CCO. Posteriormente, o meio foi filtrado em filtro de células de 100 µm (Corning, Corning, NY, USA) e o material retido foi lavado em placas de petri quadradas com meio de lavagem de oócitos. Por meio de esteriomicroscópio e micropipeta Wiretrol® (Drummond, Broomall, PA, USA), CCO com ao menos 3 camadas de células do cumulus compactas e citoplasma homogêneo foram selecionados e colocados em grupos de 10 em gotas de 50 µL de meio BO-IVM (IVF Bioscience, Falmouth, UK) sob óleo mineral. Os CCO foram maturados por 22-24 h a 38,5°C em atmosfera umidificada com 5% (v/v) CO₂ em ar.

Meios para fertilização e cultivo embrionário foram preparados como descrito por Ortega e colaboradores [23], exceto pelos meios suplementados com 20 µg/mL de amicacina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Complexos cumulus oócitos maturados foram lavados em HEPES-TALP e transferidos em grupos de 30 em gotas de 50 µL de meio HEPES e 3,5 µL de solução de 0,05 mM penicilina, 0,25 mM de hypotaurina e 25 µM de epinefrina cobertas por óleo mineral. Cada gota foi fertilizada com 20 µL de semen sexado para macho (Y) ou fêmea (X), purificados com Puresperm 40/80 como descrito pelo fabricante (Nidacon International, Mölndal, Sweden), na concentração final de $\sim 2 \times 10^6$ sperm/mL. Após 12-18h a 38,5°C em atmosfera humidificadada 5% (v/v) de CO₂ em ar, presuntivos zigotos foram removidos das gotas de fertilização e desnudos por vortexização por 5 min em tubo com 100 µL de 10.000 U/mL de hialuronidase em 0,9% (w/v) NaCl e 600 µL de HEPES-TALP. Os presuntivos zigotos desnudos foram lavados duas vezes em HEPES-TALP, uma vez em meio SOF-BE2, agrupados entre 25-30 estruturas em gotas de 45 µL de SOF-BE2 cobertas com óleo mineral e incubadas a 38,5°C em 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ e ar humidificado em incubadora EVE (WTA, College Station, TX, USA). No dia 5 após a inseminação [120 h após a inseminação (hpi)], 5 µL de SOF-BE2 contendo 100 ng/mL de CSF2 (doado por CIBA-GEIGY, Basle, Switzerland) ou veículo [Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) contendo 1 mg/ml de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA) (Sigma-Aldrich)] foi adicionado em cada gota de meio de cultivo resultando na concentração final de 10 ng/mL de CSF2. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliados no dia 3,5 após a inseminação (84 hpi) e no dia 7,5 (180 hpi), respectivamente. Os blastocistos foram coletados no dia 7,5, fixados em 4% (w/v)

de paraformaldeído por 15 min e armazenados em 50 µL de DPBS contendo 1% (w/v) polivinilpirrolidona a 4°C, até o processamento para marcação de histonas.

Os embriões foram produzidos em um total de 20 replicatas, envolvendo 5.907 oócitos. Para cada replicata foi utilizado sêmen sexado para fêmea e macho de um ou mais touros (ST Genetics, Navasota, TX, USA) para fertilizar os oócitos e os embriões foram tratados com CSF2 ou veículo. Um total de três diferentes touros da raça Holandesa (ST Genetics, Navasota, TX, USA) foram usados no experimento. Touro A foi usado em 8 replicatas, touro B em 8 replicatas e touro C em 7 replicatas. Para a marcação de histona, um total de 17 replicatas (4.789 oocytes) foram utilizadas e cada replicata utilizou sêmen de um único touro para fertilização. Sêmen do touro A foi utilizado em 6 replicatas, touro B em 6 replicatas e touro C em 5 replicatas.

5.4.2 *Imunomarcação*

Blastocistos fixados foram permeabilizados por 30 min a temperatura ambiente usando 0,25% (v/v) Triton X-100 (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluído em DPBS. Os embriões foram lavados três vezes em tampão de lavagem [DPBS contendo 1 mg/mL de BSA fraction V (Sigma-Aldrich) e 0,1 % (v/v) Tween 20] e depois incubado por 1 h a temperatura ambiente em tampão de bloqueio consistindo de DPBS contendo 50 mg/ml de BSA. Posteriormente os blastocistos foram incubados *overnight* a 4°C com um de três anticorpos policlonais primários de coelho na concentração de 1 µg/mL: anti-histona H3 [ab18521; Abcam (Cambridge, MA)], anti-H3K27me3 [07-449, Millipore Sigma (Burlington MA)] e anti-H3K18ac (ab1191; Abcam). Os anticorpos foram diluídos em tampão consistindo em DPBS contendo 0,1% (v/v) de Tween 20 e 10 mg/mL de BSA fração V. Como controle negativo, anticorpos primários foram substituídos por 1 µg/mL de IgG de coelho (PRABP01, Bio-Rad [Hercules, CA]). Blastocistos foram lavados três vezes com tampão de lavagem e incubados com 2 µg/mL 1:1000 (v/v) de anticorpo de carneiro anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488 [A-11008, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)] por 1h a temperatura ambiente. Após três lavagens em tampão de lavagem, os blastocistos foram incubados com 1 µg/mL de Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich) por 15 min a temperatura ambiente para marcação dos núcleos, lavado em DPBS contendo 0,2% (w/v) de polivinilpirrolidona, depositados em lâmina com 5 µL de ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen) e coberta com lamínula. As imagens foram realizadas com microscópio de epifluorescência Axioplan 2 (Zeiss, Göttingen,

Germany) com objetiva de 40x e filtros azul e verde. Imagens digitais foram adquiridas usando AxioVision software (Zeiss) e uma câmera de alta-resolução branca e preta AxionCam MRm digital. Para cada anticorpo primário, o tempo de exposição foi constante para todos os blastocistos analisados na mesma replicata.

5.4.3 *Análise de imagens*

O software Image J (version 1.51j8, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) foi utilizado para quantificar a imunofluorescência. Nucleo de blastocistos foram identificados e contados baseados na marcação de Hoechst 33342. A região da massa celular interna (MCI) foi identificada como uma agregação de células nos blastocistos e as demais células foram consideradas células do TE. Devido a dificuldade em distinguir entre células da MCI e células da TE sobrepostas na área da MCI, as análises foram realizadas apenas em núcleos que estavam claramente da região de TE. Com a ferramenta de seleção mão livre, um perímetro foi manualmente desenhado ao redor de cada núcleo, individualmente para mensurar a intensidade de fluorescência para H3, H3K27me3 ou H3K18ac (verde) e DNA (azul). A intensidade de fluorescência do *background* no canal verde foi mensurada em uma área randômica próxima a cada embrião e este valor foi subtraído do valor da intensidade de fluorescência obtido para histonas. A média da intensidade para marcação nuclear para H3, H3K27me3 e H3K18ac foi determinada para cada blastocisto. O número total de blastocistos analisados foi 123 para H3 (17 replicatas), 125 para H3K27me3 (17 replicatas) e 128 para H3K18ac (16 replicatas).

5.4.4 *Análise estatística*

Análise estatística foi realizada usando SAS software (version 9,4: SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Dados de percentual de oócitos que clivaram, percentual de presuntivos zigotos que desenvolveram para o estágio de blastocisto e percentual de embriões clivados que desenvolveram para o estágio de blastocisto foram analisados pelo procedimento Glimmix do SAS. Cada embrião foi considerado como unidade experimental. Respostas foram consideradas com variáveis binárias e as análises foram realizadas por regressão logística com distribuição binária dos dados. O modelo incluiu sexo do embrião (masculino vs feminino), tratamento (veículo vs CSF2), touro (A, B e C) e interações entre essas variáveis e replicatas. O último termo foi considerado como variável de classe aleatória.

Dados de número de células de blastocistos e intensidade de fluorescência para H3 foram analisados por análise de variância usando o procedimento Mixed do SAS. Para número de células, blastocistos foram considerados unidade experimental e o modelo incluiu sexo, tratamento, touro e interações, assim como efeitos fixos e com replicata contendo touro como efeito randômico. A análise de H3 foi similar, exceto que a intensidade de fluorescência de Hoescht foi usada com covariável para ajuste de diferenças na condensação nuclear. Dados da intensidade de fluorescência para H3K27me3 e H3K18ac foram também analisados usando o procedimento Mixed do SAS. O modelo incluiu sexo, tratamento, touro e interações, assim como efeitos fixos, com replicata contendo touro como efeito randômico e com média de intensidade de fluorescência de H3 como covariável para ajustar diferenças entre grupos no total de intensidade para H3. Embora os resultados não sejam apresentados, conclusões foram similares se a intensidade de H3 não fosse usada como uma covariável.

5.5 Resultados

5.5.1 Desenvolvimento embrionário

Não houve efeito do sexo, CSF2 ou touro na proporção de oócitos que clivaram (Fig. 1). Houve, no entanto, uma interação entre touro x sexo ($P < 0,0001$) que resultaram de maior clivagem para embriões do sexo masculino para o touro A e maior clivagem para embriões do sexo feminino para touro C e sem diferença para touro B.

Não houve efeito do sexo no desenvolvimento para o estágio de blastocisto (Fig. 1). Tratamento com CSF2 reduziu o desenvolvimento para o estágio de blastocisto, expressa em porcentagem em relação a embriões clivados ($P = 0,047$) e em relação a putativos zigotos ($P = 0,036$) (Fig. 1). Não teve interação significativa entre CSF2 e sexo, mas o efeito do CSF2 tendeu a ser mais pronunciado em embriões machos. Touro afetou significativamente o desenvolvimento para o estágio de blastocisto, com desenvolvimento sendo maior para o touro C, intermediário para o touro B, e menor para o touro A. Houve tendência ($P = 0,060$) para número total de células de embriões do sexo masculino ($132,3 \pm 4,6$ células) fosse maior que embriões do sexo feminino ($125,4 \pm 5,0$ células) mas não houve efeito do CSF2 ($129,0 \pm 4,9$

células para veículo vs $128,8 \pm 4,8$ células para CSF2) ou touro ($P=0,549$; $126,5 \pm 8,5$, $135,2 \pm 6,0$ e $124,9 \pm 8,5$ células para touros A, B e C, respectivamente).

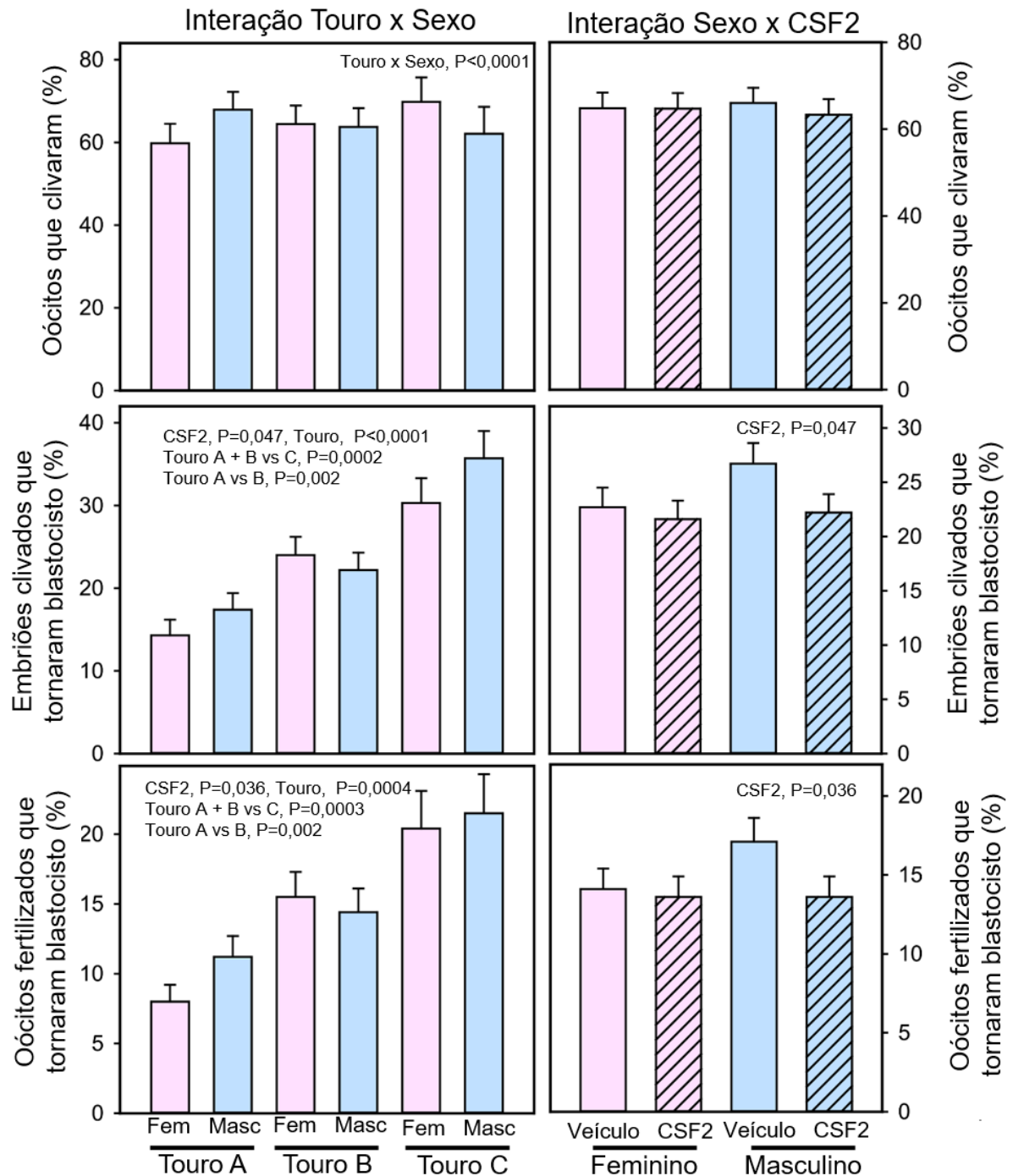


Figura 1. Competência de oócitos em clivar após fertilização e de embriões em desenvolver para o estágio de blastocisto em relação ao efeito de sexo, touro e CSF2.

5.5.2 Imunomarcacão em histona H3

Exemplos da imunomarcacão para histona H3 são demonstrados na Fig. 2A e resultados da quantificacão de intensidade de fluorescência são demonstrados na Fig. 2B. Como esperado, a marcação foi limitada ao núcleo. Não houve efeito do CSF2, touro, ou interações entre sexo e CSF2 ou touro e CSF2 na imunomarcacão para histona 3. Houve, no entanto, um efeito de sexo ($P=0,052$) e uma interaçãõ entre touro e sexo, como determinado pelo uso de contrastes ortogonais. Em particular, não houve efeito de sexo para touro A e B, enquanto a marcação foi maior para embriões do sexo feminino em relaçãõ aos embriões do sexo masculino para o touro C (Touro A + B vs Touro C x Sexo; $P=0,029$).

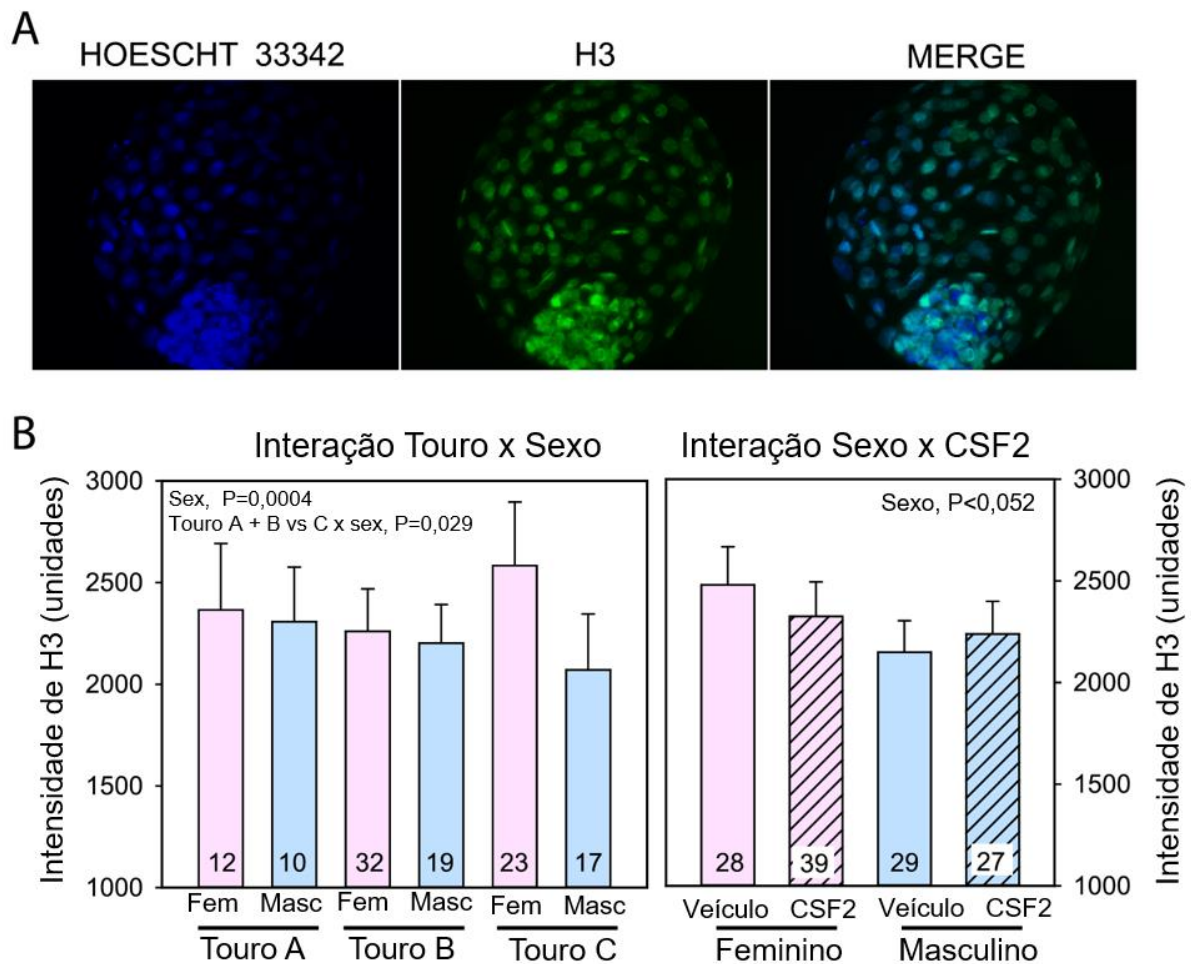


Figura 2. Imunomarcacão para histone H3. A. Exemplo representativo de marcação em blastocisto usando anticorpo para H3. Média dos quadrados mínimos \pm SEM da intensidade de fluorescência de H3 no núcleo de células do TE em relaçãõ ao sexo, touro e CSF2.

Dada esta interação e para corrigir possíveis diferenças no total de histona H3 entre os grupos, as análises subsequentes de imunomarcacão para H3K27me3 e H3K18ac foram realizadas usando a média de intensidade de fluorescência de histonas H3 de cada subgrupo como covariável para os efeitos de touro, sexo e tratamento.

3.5.3 Imunomarcacão para histona H3K27me3

A imunomarcacão foi limitada ao núcleo celular (Fig. 3A). Como apresentado na Fig. 3B, a intensidade de fluorescência de H3K27me3 foi maior para embriões do sexo masculino em relação aos embriões do sexo feminino ($P=0,030$). Marcação também foi afetada ($P=0,010$) pelo touro, com marcação mais intensa para o touro C que touro A e B ($P=0,003$). A marcação não foi afetada pelo CSF2 ou alguma interação com CSF2.

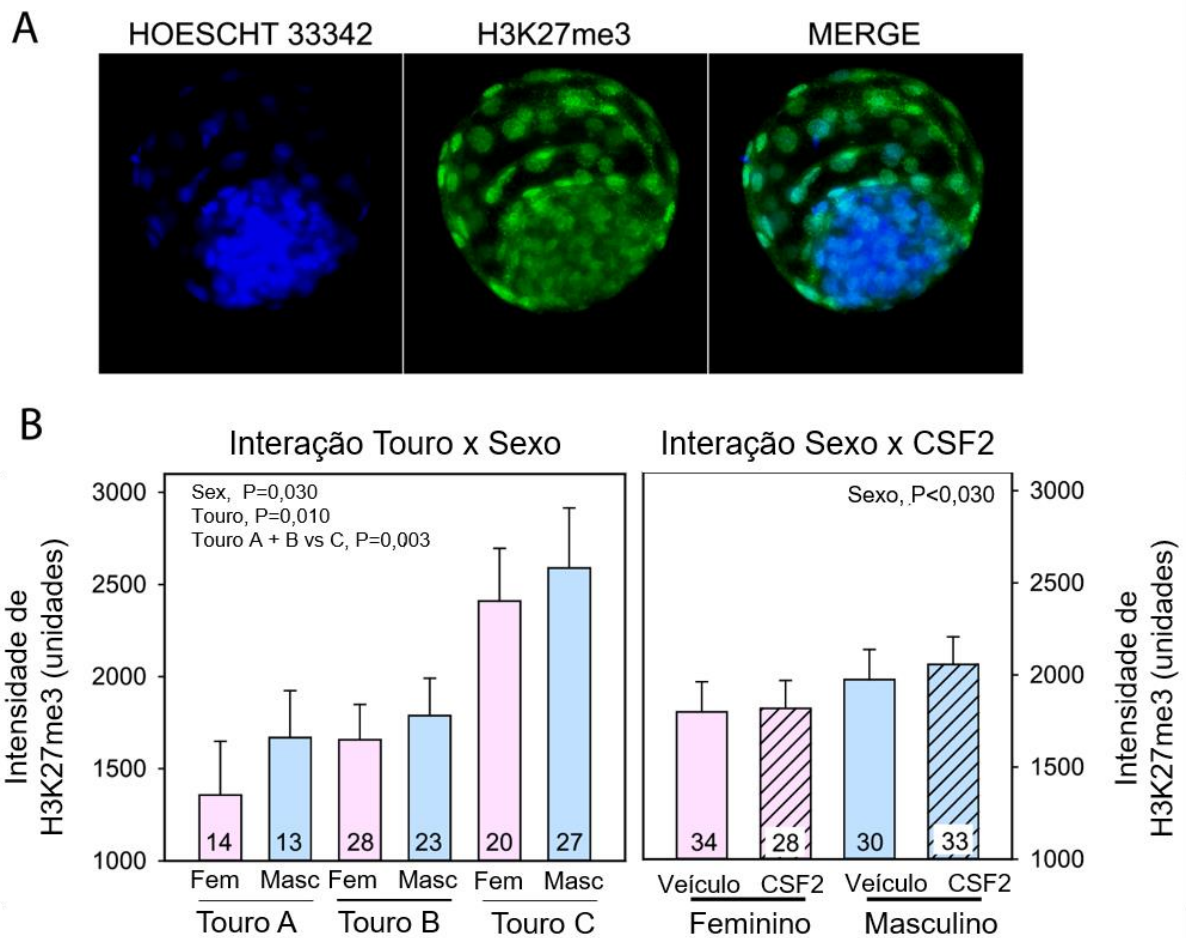


Figure 3. Imunomarcacão para H3K27me3. A. Exemplo representativo de marcação em blastocisto usando anticorpo para H3K27me3. Média dos quadrados mínimos \pm

SEM da intensidade de fluorescência de H3K27me3 no núcleo de células do TE em relação ao sexo, touro e CSF2, e após usar H3 como covariável.

3.5.4 Imunomarcacão para histona H3K18ac

Assim como os demais marcadores de histona, imunomarcacão foi limitada ao núcleo celular (Fig. 4A). Não houve efeito para sexo ou CSF2, ou da interação entre esses dois fatores na quantificação de intensidade de fluorescência para histona H3K18ac (Fig 4B). Houve um efeito de touro ($P < 0,0001$), com marcação sendo maior para touro C e menor para touro B (Touro A+B vs Touro C, $P < 0,0001$; Touro A vs B, $P = 0,003$).

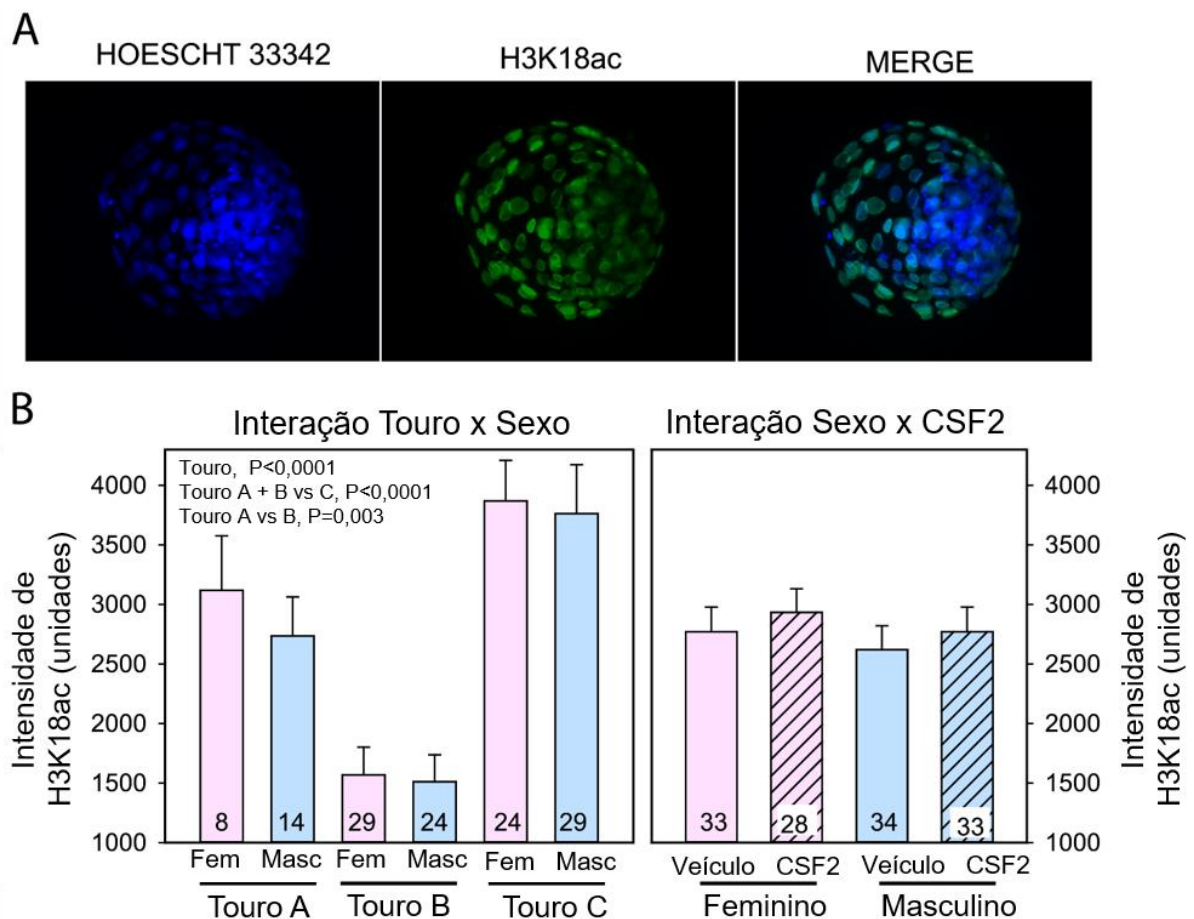


Figura 4. Imunomarcacão para H3K18ac. A. Exemplo representativo de marcação em blastocisto usando anticorpo para H3K18ac. Média dos quadrados mínimos \pm SEM da intensidade de fluorescência de H3K18ac no núcleo de células do TE em relação ao sexo, touro e CSF2, e após usar H3 como covariável.

5.6 Discussão

Têm-se estabelecido que o sexo pode afetar o processo de desenvolvimento no início da vida do embrião, durante o período que antecede a formação do blastocisto. Na vaca, diferença entre os sexos durante este período é observado na expressão gênica [2,3,6], DNA mitocondrial [7] e secreção de miRNAs [8]. Embriões do sexo masculino podem responder diferentemente a condições ambientais em relação a embriões do sexo feminino, como observado para os efeitos de alta concentração de glicose para o desenvolvimento do estágio de blastocisto [11] e efeitos de soro e CSF2, na expressão gênica de blastocistos cultivados *in vitro* [6, 9]. Os resultados apresentados são condizentes com a ideia de que diferenças entre os sexos em características de desenvolvimento pré-implantacional são devido, em parte, a regulação epigenética diferencial da expressão gênica. Esta conclusão é baseada na observação de que a trimetilação da lisina 27 de histona H3 foi maior em células do TE de blastocistos do sexo masculino em relação aos blastocistos do sexo feminino. Um achado adicional foi que o touro usado para produzir os blastocistos também afetaram a intensidade de marcação de H3K27me3 e H3K18ac. Esses resultados também indicam a importância da contribuição paterna para panorama epigenético no desenvolvimento do embrião.

Diferenças entre embriões do sexo masculino e feminino em estabelecer marcas de H3K27me3 no estágio de blastocisto pode ter importantes consequências para regulação da expressão gênica por sinalização de desenvolvimento ou ambiental. Na vaca, níveis globais de H3K27me3 são elevados no oócito e declinam até o estágio de 8 células através de ações do domínio Jumonji contendo proteína 3 antes de aumentar posteriormente para o estágio de blastocisto [18,24]. O *Knockdown* do domínio jumonji contendo proteína 3 interrompe o desenvolvimento para o estágio de blastocisto [24]. Domínios H3K27me3 na cromatina do embrião pré-implantacional de camundongo não estão intimamente correlacionados com a metilação de DNA [25], sugerindo um mecanismo independente na repressão da transcrição. A diferença entre os níveis de marcas H3K27me3 entre embriões do sexo masculino e feminino não é resultado da inativação do cromossoma X na fêmea, pois este evento ainda não ocorreu no blastocisto bovino [2]. Também pode ser notado que essas diferenças entre embriões do sexo masculino e feminino pode ser um pouco maior do que

indicado por este estudo devido ao fato de cerca de 10% do sêmen sexado conter espermatozoides do sexo cromossômico errado [26].

Em contraste, a diferença entre sexos nos níveis de trimetilação em H3K27, não houve efeito do sexo na H3K18ac global ou, em outro estudo, H3K29ac. A falta de efeito de diferença entre os sexos não significa necessariamente que essas marcas epigenéticas não estão envolvidas em diferenças entre embriões dos sexos masculino e feminino durante o desenvolvimento pré-implantação devido a possibilidade de regulação em locus específicos. Em búfalos, embriões produzidos por transferência nuclear de células somáticas, níveis globais de H3K18ac foi maior para embriões derivados de células somáticas originadas de machos do que os originados de células somáticas originadas de fêmeas [28].

É provável que diferenças epigenéticas entre embriões dos sexos masculino e feminino se estendam à metilação do DNA. Usando anti-metilcitosina para mensurar metilação global de DNA, Dobbs *et al.* [15] observaram que embriões do sexo feminino experimentaram maior metilação de DNA entre os estádios de 6-8 células em relação a embriões do sexo masculino. No estágio de blastocisto, diferenças entre sexos foram reduzidas e metilação de DNA foi maior para embriões do sexo masculino [15]. Níveis de metilação de DNA em uma região minissatélite foi maior para blastocistos do sexo masculino [7], assim como a expressão de metiltransferases de DNA 3A e 3B [7].

Como encontrado anteriormente [21, 29], houve diferença entre touros na competência de embriões clivados em desenvolver para o estágio de blastocisto. A contribuição paterna para o embrião inclui ambos, informação genética e epigenética. Polimorfismo de sítio único em genes específicos têm sido associados com desenvolvimento embrionário [21,30,31]. Há também diferenças entre touros na metilação de DNA e modificações epigenéticas em histonas de espermatozoides [22,32]. Diferenças na metilação de DNA existe mesmo entre gêmeos homozogóticos [33]. No entanto, é improvável que as diferenças de H3K27me3 e H3H18ac entre embriões gerados de touros diferentes reflitam diferenças no grau de modificações epigenéticas nas histonas do espermatozoide. Isso ocorre porque os cromossomos paternos se associam a histonas de origem materna coincidentes com a singamia [34] e há ausência de imunomarcagem para marcadores H3K27me3 no pró-núcleo masculino bovino [18]. É mais provável que outros reguladores transcricionais ou

epigenéticos que diferem entre os touros resultem em graus variados de marcas epigenéticas da histona H3.

Não houve efeito do CSF2 no padrão de marcação para H3K27me3 ou H3K18ac no blastocisto. Isso ocorreu apesar do CSF2 poder atuar no embrião bovino do dia 5 ao 7 para programar o alongamento do trofoblasto no dia 15 da gestação [20] e expressão gênica na placenta e fígado fetal no dia 86 da gestação [35]. Efeitos do CSF2 no alongamento depende do sexo, uma vez que o CSF2 aumenta o comprimento do trofoblasto de embriões do sexo masculino, mas reduz em embriões do sexo feminino [20]. Algumas consequências a longo prazo dos efeitos do CSF2 no embrião provavelmente envolvem alterações na expressão gênica [9,36]. Em adição, CSF2 pode induzir alterações epigenéticas no embrião, como evidenciado por alterações dependentes do sexo em níveis de metilação de DNA em centenas de locus no trofoblasto de embriões de 15 dias [20]. A falha em encontrar alterações em larga escala em modificações epigenéticas em histonas não impede a possibilidade de CSF2 regular modificações de histonas, pois apenas dois marcadores epigenéticos de histona foram testados e ao fato de a técnica analítica usada não permitir a avaliação de modificações de histona em regiões específicas do genoma.

Tratamento com CSF2 reduziu o percentual de embriões que desenvolveram para o estágio de blastocisto. O efeito do CSF2 na competência dos embriões é altamente variável e depende, de forma geral, da competência de embriões em desenvolver. Quando o percentual de embriões controle que desenvolveram para blastocisto foi baixa, CSF2 aumentou percentual de blastocisto, enquanto que CSF2 reduziu a taxa de blastocisto quando o percentual de embriões que desenvolveram para o estágio de blastocisto no grupo controle foi elevado [37]. É possível que o CSF2 promova o desenvolvimento para o estágio de blastocisto reduzindo as consequências de estresse celular. De fato, o CSF2 pode reduzir os níveis de apoptose em embriões bovinos causados pelo choque térmico [38]. A razão pela qual CSF2 é inibitório para desenvolvimento quando a competência embrionária é elevada ainda não é conhecida, mas provavelmente ativação de mecanismos que promovam o desenvolvimento em embriões estressados sejam deletérios quando condições celulares para desenvolvimento são mais favoráveis.

Em conclusão, os níveis de trimetilação de lisina 27 de histona H3 no TE de embriões bovinos depende do sexo do embrião. Além disso, a contribuição paterna pode afetar H3K27me3 e H3K18ac. Estes resultados indicam que a função do

blastocisto pode ser modificada epigeneticamente pelo sexo do embrião e contribuição paterna de forma dependente a alterações das marcas epigenéticas de histona. Identificação de genes específicos regulados por H3K27me3 e H3K18ac em embriões bovinos e consequências de variação em H3K27me3 e H3K18ac entre embriões para desenvolvimento fenotípico são tópicos importantes para pesquisas futuras. Em adição, o estudo deve ser expandido para identificar efeitos de sexo em outras modificações epigenéticas de histona na MCI e TE.

5.7 Referências

1. Kobayashi S, Isotani A, Mise N, Yamamoto M, Fujihara Y, Kaseda K, Nakanishi T, Ikawa M, Hamada H, Abe K, Okabe M. Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, *Rhox5/Pem*, at preimplantation stages. *Curr Biol.* 2006; 16:166-172.
2. Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:3394–3399. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0913843107>.
3. Denicol AC, Leão BC, Dobbs KB, Mingoti GZ, Hansen PJ. Influence of sex on basal and dickkopf-1 regulated gene expression in the bovine morula. *PLoS One* 2015; 10:e0133587. DOI: 10.1371/journal.pone.0133587.
4. Lowe R, Gemma C, Rakyan VK, Holland ML. Sexually dimorphic gene expression emerges with embryonic genome activation and is dynamic throughout development. *BMC Genomics* 2015; 16:295. DOI: 10.1186/s12864-015-1506-4.
5. Petropoulos S, Edsgård D, Reinius B, Deng Q, Panula SP, Codeluppi S, Plaza Reyes A, Linnarsson S, Sandberg R, Lanner F. Single-cell RNA-seq reveals lineage and x chromosome dynamics in human preimplantation embryos. *Cell.* 2016;165:1012-1026. DOI: 10.1016/j.cell.2016.03.023.
6. Heras S, De Coninck DI, Van Poucke M, Goossens K, Bogado Pascottini O, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, De Sutter P, Leroy JL, Gutierrez-Adan A, Peelman L, Van Soom A. Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. *BMC Genomics.* 2016;17:72. DOI: 10.1186/s12864-016-2393-z.
7. Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. *Physiol Genomics* 2008; 32:264-272.
8. Gross N, Kropp J, Khatib H. Sexual dimorphism of miRNAs secreted by bovine In vitro-produced embryos. *Front Genet* 2017; 8:39.

9. Siqueira LG, Hansen PJ. Sex differences in response of the bovine embryo to colony-stimulating factor 2. *Reproduction* 2016; 152:645-654.
10. Pérez-Crespo M, Ramírez MA, Fernández-González R, Rizos D, Lonergan P, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Mol Reprod Dev* 2005; 72:502-10.
11. Kimura K, Spate LD, Green MP, Roberts RM. Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 2005; 72:201-207.
12. Hansen PJ, Dobbs KB, Denicol AC, Siqueira LGB. Sex and the preimplantation embryo: implications of sexual dimorphism in the preimplantation period for maternal programming of embryonic development. *Cell Tissue Res* 2016; 363:237-247. DOI: 10.1007/s00441-015-2287-4.
13. Pérez-Cerezales S, Ramos-Ibeas P, Rizos D, Lonergan P, Bermejo-Alvarez P, Gutiérrez-Adán A. Early sex-dependent differences in response to environmental stress. *Reproduction* 2018; 155:R39-R51. DOI: 10.1530/REP-17-0466.
14. Engel N. Sex differences in early embryogenesis: inter-chromosomal regulation sets the stage for sex-biased gene networks: The dialogue between the sex chromosomes and autosomes imposes sexual identity soon after fertilization. *Bioessays* 2018; 40:e1800073. DOI: 10.1002/bies.201800073.
15. Dobbs KB, Rodriguez M, Sudano MJ, Ortega MS, Hansen PJ. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PLoS One* 2013; 8:e66230. DOI: 10.1371/journal.pone.0066230.
16. Jiang Z, Lin J, Dong H, Zheng X, Marjani SL, Duan J, Ouyang Z, Chen J, Tian XC. DNA methylomes of bovine gametes and in vivo produced preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2018; 99:949-959. DOI: 10.1093/biolre/i0y138.
17. Wu X, Li Y, Xue L, Wang L, Yue Y, Li K, Bou S, Li GP, Yu H. Multiple histone site epigenetic modifications in nuclear transfer and in vitro fertilized bovine embryos. *Zygote* 2011; 19:31-45. DOI: 10.1017/S0967199410000328.
18. Ross PJ, Ragina NP, Rodriguez RM, Lager AE, Siripattarapivat K, Lopez-Corrales N, Cibelli JB. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction* 2008; 136:777-785. DOI: 10.1530/REP-08-0045.
19. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007; 128:669-681.
20. Dobbs KB, Gagné D, Fournier E, Dufort I, Robert C, Block J, Sirard MA, Bonilla L, Ealy AD, Loureiro B, Hansen PJ. Sexual dimorphism in developmental programming of the bovine preimplantation embryo caused by colony-stimulating factor 2. *Biol Reprod* 2014; 91:80. DOI: 10.1095/biolreprod.114.121087.

21. Cochran SD, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertilizing ability of sperm and subsequent embryonic development in cattle. *Biol Reprod* 2013; 89:69. DOI: 10.1095/biolreprod.113.111260.
22. Kropp J, Carrillo JA, Namous H, Daniels A, Salih SM, Song J, Khatib H. Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. *BMC Genomics* 2017; 18:280. DOI: 10.1186/s12864-017-3673-y.
23. Ortega MS, Wohlgemuth S, Tribulo P, Siqueira LG, Cole JB, Hansen PJ. A single nucleotide polymorphism in COQ9 affects mitochondrial and ovarian function and fertility in Holstein cows. *Biol Reprod* 2017; 96:652-663. DOI: 10.1093/biolre/iox004.
24. Canovas S, Cibelli JB, Ross PJ. Jumonji domain-containing protein 3 regulates histone 3 lysine 27 methylation during bovine preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:2400-2405. DOI: 10.1073/pnas.1119112109.
25. Liu X, Wang C, Liu W, Li J, Li C, Kou X, Chen J, Zhao Y, Gao H, Wang H, Zhang Y, Gao Y, Gao S. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature* 2016; 537:558-562. DOI:10.1038/nature19362.
26. Oliveira CS, Saraiva NZ, de Souza MM, Tetzner TA, de Lima MR, Garcia JM. Effects of histone hyperacetylation on the preimplantation development of male and female bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22:1041-1048.
27. Sandhu A, Mohapatra SK, Agrawal H, Singh MK, Palta P, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS. Effect of sex of embryo on developmental competence, epigenetic status, and gene expression in buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced by hand-made cloning. *Cell Rerogram* 2016; 18:356-365.
28. Ortega MS, Moraes JGN, Patterson DJ, Smith MF, Behura SK, Pooch S, Spencer TE. Influences of sire conception rate on pregnancy establishment in dairy cattle. *Biol Reprod* 2018; 99:1244-1254. DOI: 10.1093/biolre/ioy141.
29. Driver AM, Huang W, Gajic S, Monson RL, Rosa GJ, Khatib H. Short communication: Effects of the progesterone receptor variants on fertility traits in cattle. *J Dairy Sci* 2009; 92:4082-4085.
30. Khatib H, Huang W, Mikheil D, Schutzkus V, Monson RL. Effects of signal transducer and activator of transcription (STAT) genes STAT1 and STAT3 genotypic combinations on fertilization and embryonic survival rates in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 2009; 92:6186-6191.
31. Kutchy NA, Menezes ESB, Chiappetta A, Tan W, Wills RW, Kaya A, Topper E, Moura AA, Perkins AD, Memili E. Acetylation and methylation of sperm histone 3 lysine 27 (H3K27ac and H3K27me3) are associated with bull fertility. *Andrologia* 2018; 50.e12915. DOI: 10.1111/and.12915.
32. Shojaei Saadi HA, Fournier É, Vigneault C, Blondin P, Bailey J, Robert C. Genome-wide analysis of sperm DNA methylation from monozygotic twin bulls. *Reprod Fertil Dev* 2017; 29:838-843.

33. McLay DW, Clarke HJ. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 2003; 125: 625-633; <http://dx.DOI.org/10.1530/rep.0.1250625>; PMID: 12713425.
34. Norman HD, Hutchison JL, Miller RH. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *J Dairy Sci* 2010; 93:3880–3890. DOI: 10.3168/jds.2009-2781.
35. Siqueira LG, Tribulo P, Chen Z, Denicol AC, Ortega MS, Negrón-Pérez VM, Kannampuzha-Francis J, Pohler KG, Rivera RM, Hansen PJ. Colony-stimulating factor 2 acts from days 5 to 7 of development to modify programming of the bovine conceptus at day 86 of gestation. *Biol Reprod* 2017; 96:743-757. DOI: 10.1093/biolre/iox018.
36. Ozawa M, Sakatani M, Dobbs KB, Kannampuzha-Francis J, Hansen PJ. Regulation of gene expression in the bovine blastocyst by colony stimulating factor 2. *BMC Res Notes*. 2016;9:250. DOI: 10.1186/s13104-016-2038-y.
37. Dobbs KB, Khan FA, Sakatani M, Moss JI, Ozawa M, Ealy AD, Hansen PJ. Regulation of pluripotency of inner cell mass and growth and differentiation of trophectoderm of the bovine embryo by colony stimulating factor 2. *Biol Reprod* 2013; 89:141. DOI: 10.1095/biolreprod.113.113183.
38. Loureiro B, Oliveira LJ, Favoreto MG, Hansen P J Colony-stimulating factor 2 inhibits induction of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65: 578–588. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2010.00953.x.

6. CONCLUSÕES

- A trimetilação da Lisina 27 de histona 3 no trofotoderma de blastocistos bovinos depende do sexo do embrião;
- O touro utilizado no cruzamento pode afetar a trimetilação da Lisina 27 e acetilação de Lisina 18 de histona 3 de blastocistos bovinos;
- Estresse térmico pelo calor entre os dias 2,5 e 3 do desenvolvimento embrionário não interferiu no desenvolvimento embrionário, mas reduziu apoptose e atividade mitocondrial;
- A adição da embriocina Fator Estimulador de Colônia 2 no dia cinco do cultivo embrionário *in vitro* não recuperou a qualidade de embriões previamente expostos ao choque térmico;
- Temperatura vaginal de vacas Girolando apresentou variação entre as horas do dia, e aumentou paralelamente ao índice de temperatura e umidade;
- Vacas mestiças 1/2 sangue Holandês tiveram variação na temperatura vaginal, porém, melhor termorregulação em relação aos animais 3/4 e 7/8 de genética Holandesa.

Anexo I

Tabela suplementar 1. Teste de significância dos fatores que influenciam a média diária da temperature vaginal em vacas Girolando*.

Efeito		Coeficiente	SE	P-valor
Intercepto		35,50	0,30	<0,001
Fazenda	1	-0,26	$8,04 \times 10^{-2}$	<0,01
	2	-0,38	$8,50 \times 10^{-2}$	<0,001
	3	-0,44	$8,68 \times 10^{-2}$	<0,001
	4	0,00	-	-
	5	$1,46 \times 10^{-3}$	$4,62 \times 10^{-2}$	>0,05
	6	$-8,54 \times 10^{-2}$	$6,84 \times 10^{-2}$	>0,05
Ano	2016	0,00	-	-
	2017	-0,22	$7,76 \times 10^{-2}$	<0,01
ITU		$5,16 \times 10^{-2}$	$1,47 \times 10^{-3}$	<0,001
Status de gestação	Non-pregnant	0,00	-	-
	1º trimestre	-0,21	$3,32 \times 10^{-2}$	<0,001
	2º trimestre	-0,11	$3,24 \times 10^{-2}$	<0,001
	3º trimestre	$8,38 \times 10^{-2}$	$3,64 \times 10^{-2}$	<0,05
ECC (1 - 5; 0.25)	2.25	0,00	-	-
	2.5	0,13	0,27	>0,05
	2.75	$3,30 \times 10^{-2}$	0,27	>0,05
	3.00	$-1,48 \times 10^{-2}$	0,27	>0,05
	3.25	$-6,05 \times 10^{-2}$	0,28	>0,05
	3.50	$-4,29 \times 10^{-2}$	0,27	>0,05
	3.75	$-6,55 \times 10^{-2}$	0,28	>0,05
	4.00	$-1,2 \times 10^{-1}$	0,28	>0,05
	4.25	$-8,70 \times 10^{-2}$	0,38	>0,05
	4.5	$1,62 \times 10^{-2}$	0,33	>0,05
Produção de leite	non-lactating	0,00	-	-
	0.5 - 10L	$6,58 \times 10^{-3}$	$5,22 \times 10^{-2}$	>0,05
	10.1 - 20L	0,10	$4,75 \times 10^{-2}$	<0,05
	20.1 - 30L	$9,10 \times 10^{-2}$	$5,45 \times 10^{-2}$	>0,05

Continua

Tabela suplementar 1. Teste de significância dos fatores que influenciam a média diária da temperature vaginal em vacas Girolando*.

Continuação

Efeito		Coeficiente	SE	P-valor
	30,1 - 40L	$-1,33 \times 10^{-2}$	0,10	>0,05
	40,1 - 50L	$3,16 \times 10^{-2}$	0,10	>0,05
	50,1 - 60L	0,13	0,12	>0,05
Cruzamento (H ¹)	1/2	0,00	-	-
	3/4	0,12	$3,81 \times 10^{-2}$	<0,01
	7/8	0,15	$5,26 \times 10^{-2}$	<0,01
Hora do dia	00:00	0,00	-	-
	01:00	$-4,69 \times 10^{-2}$	$2,34 \times 10^{-2}$	<0,01
	02:00	$-5,87 \times 10^{-2}$	$2,34 \times 10^{-2}$	<0,01
	03:00	-0,10	$2,35 \times 10^{-2}$	<0,001
	04:00	-8,64	$2,36 \times 10^{-2}$	<0,001
	05:00	$-8,45 \times 10^{-2}$	$2,36 \times 10^{-2}$	<0,001
	06:00	-0,10	$2,36 \times 10^{-2}$	<0,001
	07:00	-0,15	$2,36 \times 10^{-2}$	<0,001
	08:00	-0,26	$2,34 \times 10^{-2}$	<0,001
	09:00	-0,33	$2,37 \times 10^{-2}$	<0,001
	10:00	-0,20	$2,42 \times 10^{-2}$	<0,001
	11:00	-0,27	$2,47 \times 10^{-2}$	<0,001
	12:00	-0,28	$2,50 \times 10^{-2}$	<0,001
	13:00	-0,33	$2,60 \times 10^{-2}$	<0,001
	14:00	-0,29	$2,65 \times 10^{-2}$	<0,001
	15:00	$1,53 \times 10^{-2}$	$2,62 \times 10^{-2}$	>0,05
	16:00	$5,04 \times 10^{-2}$	$2,61 \times 10^{-2}$	>0,05
	17:00	$6,35 \times 10^{-2}$	$2,54 \times 10^{-2}$	<0,05
	18:00	0,10	$2,49 \times 10^{-2}$	<0,001
	19:00	$5,66 \times 10^{-2}$	$2,43 \times 10^{-2}$	<0,05
	20:00	$5,47 \times 10^{-2}$	$2,38 \times 10^{-2}$	<0,05
	21:00	$2,22 \times 10^{-2}$	$2,36 \times 10^{-2}$	>0,05
	22:00	$4,05 \times 10^{-2}$	$2,34 \times 10^{-2}$	>0,05
	23:00	$6,02 \times 10^{-2}$	$2,34 \times 10^{-2}$	<0,05

Continua

Tabela suplementar 1. Teste de significância dos fatores que influenciam a média diária da temperature vaginal em vacas Girolando*.

Continuação

Efeito			Coefficiente	SE	P-valor
Cruzamento x Hora	00:00	1/2	0,00	-	-
		3/4	0,00	-	-
		7/8	0,00	-	-
	01:00	1/2	0,00	-	-
		3/4	-4,60 x 10 ⁻²	3,43 x 10 ⁻²	>0,05
		7/8	-5,90 x 10 ⁻²	4,94 x 10 ⁻²	>0,05
	02:00	1/2	0,00	-	-
		3/4	-3,64 x 10 ⁻²	3,43 x 10 ⁻²	>0,05
		7/8	-6,07 x 10 ⁻²	9,44 x 10 ⁻²	>0,05
	03:00	1/2	0,00	-	-
		3/4	-3,93 x 10 ⁻²	3,43 x 10 ⁻²	>0,05
		7/8	-9,49 x 10 ⁻²	4,94 x 10 ⁻²	>0,05
	04:00	1/2	0,00	-	-
		3/4	-6,89 x 10 ⁻²	3,43 x 10 ⁻²	<0,05
		7/8	-0,10	4,94 x 10 ⁻²	<0,05
	05:00	1/2	0,00	-	-
		3/4	-0,12	3,43 x 10 ⁻²	<0,001
		7/8	-0,17	4,94 x 10 ⁻²	<0,001
	06:00	1/2	0,00	-	-
		3/4	-0,13	3,43 x 10 ⁻²	<0,001
		7/8	-0,26	4,94 x 10 ⁻²	<0,001
	07:00	1/2	0,00	-	-
		3/4	-0,15	3,43 x 10 ⁻²	<0,001
		7/8	-0,28	4,94 x 10 ⁻²	<0,001
	08:00	1/2	0,00	-	-
		3/4	-0,17	3,43 x 10 ⁻²	<0,001
		7/8	-0,24	4,94 x 10 ⁻²	<0,001
09:00	1/2	0,00	-	-	
	3/4	-0,13	3,50 x 10 ⁻²	<0,001	
	7/8	-0,20	5,11 x 10 ⁻²	<0,001	
10:00	1/2	0,00	-	-	
	3/4	-0,16	3,50 x 10 ⁻²	<0,001	
	7/8	-0,32	5,11 x 10 ⁻²	<0,001	

Continua

Tabela suplementar 1. Teste de significância dos fatores que influenciam a média diária da temperatura vaginal em vacas Girolando*.

Continuação

Efeito		Coeficiente	SE	P-valor
11:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	-1,33 x 10 ⁻³	3,50 x 10 ⁻²	>0,05
	7/8	-0,11	5,11 x 10 ⁻²	<0,05
12:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	0,10	3,44 x 10 ⁻²	<0,01
	7/8	0,16	4,95 x 10 ⁻²	<0,001
13:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	0,20	3,44 x 10 ⁻²	<0,001
	7/8	0,22	4,95 x 10 ⁻²	<0,001
14:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	0,23	3,43 x 10 ⁻²	<0,001
	7/8	0,22	4,94 x 10 ⁻²	<0,001
15:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	0,28	3,43 x 10 ⁻²	<0,001
	7/8	0,18	4,94 x 10 ⁻²	<0,001
16:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	0,10	4,94 x 10 ⁻²	<0,01
	7/8	6,94 x 10 ⁻²	4,94 x 10 ⁻²	>0,05
17:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	0,92 x 10 ⁻²	3,43 x 10 ⁻²	<0,01
	7/8	0,12	4,94 x 10 ⁻²	<0,01
18:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	0,15	3,43 x 10 ⁻²	<0,001
	7/8	0,19	4,94 x 10 ⁻²	<0,001
19:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	0,14	4,43 x 10 ⁻²	<0,001
	7/8	0,18	4,94 x 10 ⁻²	<0,001
20:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	0,12	3,43 x 10 ⁻²	<0,001
	7/8	0,11	4,96 x 10 ⁻²	<0,05
21:00	1/2	0,00	-	-
	3/4	3,69 x 10 ⁻²	3,43 x 10 ⁻²	>0,05
	7/8	8,65 x 10 ⁻²	4,94 x 10 ⁻²	>0,05

Continua

Tabela suplementar 1. Teste de significância dos fatores que influenciam a média diária da temperature vaginal em vacas Girolando*.

Continuação

Efeito		Coeficiente	SE	P-valor
	22:00 1/2	0,00	-	-
	3/4	$-2,65 \times 10^{-2}$	$3,43 \times 10^{-2}$	>0,05
	7/8	-1,22	$4,94 \times 10^{-2}$	>0,05
	23:00 1/2	0,00	-	-
	3/4	$-7,58 \times 10^{-2}$	$3,43 \times 10^{-2}$	<0,05
	7/8	$-6,55 \times 10^{-2}$	$4,94 \times 10^{-2}$	>0,05

*R²=0.73

H¹: Proporção de Holandês na composição do cruzamento.