

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado de Pós-graduação em Ciência Animal

**CHOQUE TÉRMICO NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE OÓCITOS E EMBRIÕES
BOVINOS E ESTRATÉGIAS PARA INCREMENTAR A QUALIDADE EMBRIONÁRIA**

Ana Carolina Leite

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Alan Maia Borges

Coorientador: Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2019

L533c Leite, Ana Carolina -1988.
Choque térmico no desenvolvimento in vitro de oócitos e embriões bovinos e estratégias para incrementar a qualidade embrionária/ Ana Carolina Leite – 2019.
162f.: il.

Orientador: Álan Maia Borges
Coorientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
Área de concentração: Reprodução Animal
Inclui bibliografia

1- Vacas leiteiras –Teses - 2 – Embriões – Qualidade - Teses – 3 – Reprodução animal –Teses -
I – Borges, Álan Maia - II – Camargo, Luiz Sérgio de Almeida – III – Universidade Federal
de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV- Título.

CDD – 636.08926

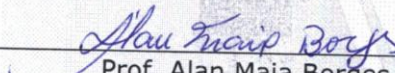
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CAROLINA LEITE

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.

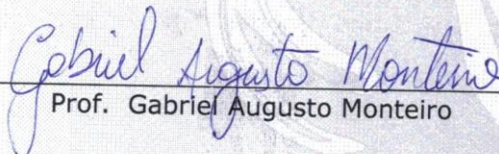
Aprovada em 20 de dezembro de 2019 , pela banca constituída pelos membros:



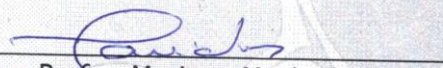
Prof. Alan Maia Borges
Presidente - Orientador



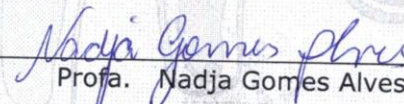
Profa. Letícia Zoccolaro Oliveira



Prof. Gabriel Augusto Monteiro



Profa. Mariana Machado Neves



Profa. Nadja Gomes Alves



Dedico este trabalho a todas as pessoas que sempre estiveram ao meu lado e não mediram esforços para sua realização, aos meus pais e meu irmão, ao Matheus e à minha família, em especial ao meu avô (in memoriam) que sempre foi meu incentivador e agora não está mais conosco.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese marca o fim de uma etapa muito importante para mim, concluir o doutorado, especialmente nesse momento de grandes desafios e ameaças à educação, é um privilégio. Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desse trabalho.

A Deus e à Nossa Senhora Desatadora dos Nós da qual sou devota, por me conceder sabedoria na escolha dos melhores caminhos, coragem para acreditar e força para não desistir e começar de novo quantas vezes fosse preciso.

À Escola de Veterinária da UFMG, por possibilitar a realização deste trabalho. A todos os professores e técnicos da Reprodução Animal, pelo auxílio e esclarecimento de dúvidas. Ao Prof. Antônio de Pinho por toda a contribuição para o laboratório de Produção *in vitro* de Embriões.

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio financeiro para execução do projeto de pesquisa. Ao CNPq, pela bolsa de estudos.

Ao Prof. Alan Maia Borges, pela orientação, pela confiança e parceria durante todos esses anos trabalhando juntos.

Aos meus pais e meu irmão, obrigada por compartilharem comigo meus sonhos e acreditarem que eu fosse capaz de alcançá-los. À minha mãe, minha amiga e conselheira, por acreditar em mim e não me deixar desanimar diante de todas as dificuldades, você foi essencial nesse processo, não teria conseguido chegar aqui sem a sua força. Ao meu pai, por ser meu exemplo de força e fé, por me fazer acreditar que enquanto houver o mínimo de esperança ainda será possível vencer, você é e sempre será meu herói. A vocês que desde criança me fizeram acreditar que incentivar a estudar seria o melhor presente que vocês poderiam me dar, hoje concordo plenamente com isso e sou extremamente grata por essa oportunidade. Ao meu irmão, que acompanhou todo o processo de longe, mas sempre presente.

À minha família, meus avós, minha madrinha, minhas “irmãs” Letícia e Bruna, meus tios e primos que sempre me apoiaram e incentivaram. Gostaria de agradecer em especial ao meu avô Darci que despertou em mim a paixão pela reprodução animal, me ensinando a fazer palpação retal para diagnóstico de gestação enquanto recém-ingressante no curso de graduação em Medicina Veterinária. Hoje agradeço a você com o pesar de não estar aqui para presenciar a conclusão dessa etapa profissional.

Ao Matheus, muito obrigada pelo apoio, companheirismo e incentivo ao longo de todos esses anos. Obrigada acreditar no meu potencial e me fazer vencer todos os desafios. Obrigada por

cada noite mal dormida esperando que eu retornasse do laboratório de madrugada ao longo de quase dois anos de idas ao laboratório para realizar manipulações noturnas com os oócitos e embriões. Aos meus sogros por todo carinho e apoio.

Ao Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo da EMBRAPA-CNPGL, pela coorientação e por todo auxílio na mentoria e execução do trabalho.

Aos membros da banca de qualificação Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Prof. Guilherme Pugliesi e Prof. Antônio de Pinho, pelos conselhos e auxílio no delineamento do experimento.

À equipe do Prof. Alan, à Telma, Philipe, Luciano e Victor. Muito obrigada por toda ajuda, amizade e troca de experiências.

A todos os alunos de pós-graduação que realizaram o projeto de pesquisa no Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões, em especial à Isabela, Valquíria, Pedro, Victor, Rita, Alinne e Luciano por confiar em mim e permitir que eu contribuísse com o trabalho de vocês. Aos alunos de iniciação científica e vivência curricular que eu coorientei, obrigada por permitir que eu passasse um pouquinho do conhecimento que eu adquiri ao longo desses anos para vocês, foi uma experiência de muito aprendizado para mim também.

À Eliane, não somente pelo trabalho em prol do experimento, mas principalmente pela parceria e amizade ao longo de todos esses anos juntas.

Ao frigorífico FrigoBet, por possibilitar que fizéssemos a coleta dos ovários com a frequência que o experimento demandou, disponibilizando toda a sua estrutura, instrumentos e remanejamento de funcionários para que a coleta fosse feita dentro dos padrões ideais. Ao Samuel, Médico Veterinário responsável técnico do estabelecimento, por autorizar que as coletas fossem realizadas. À Eliza, por toda ajuda e pelo carinho e alegria que tinha ao nos receber, mesmo em dias de trabalho pesado.

Aos meus amigos, pelo apoio e acolhimento nos momentos de aflição, por entenderem minha ausência durante os períodos mais pesados do experimento, por acreditarem em mim e por torcerem junto comigo para que tudo desse certo, nada seria possível sem vocês.

À Universidade Pontifícia Católica de Minas Gerais, à Universidade Salgado de Oliveira e à Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa por permitir que eu desse início à minha carreira acadêmica. Gostaria de agradecer, em especial, a todos os meus alunos que me fizeram ter a certeza de que eu amo lecionar, cada dia, cada aula é um novo aprendizado para mim.

*Para o Universo
até mesmo as coisas mais difíceis
acontecem espontaneamente.
A maior conquista
é composta de inúmeras partes minúsculas.
O mestre compreende que,
no Universo e na vida,
grandes feitos podem ser facilmente realizados
começando por ações pequenas.*

Lao Zi, Dao De Jing

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
RESUMO.....	19
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. HIPÓTESES	25
3. OBJETIVOS.....	25
4. Referências bibliográficas	26
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....	28
CAPÍTULO II – Atividade mitocondrial de oócitos bovinos submetidos à inibição meiótica com Butirolactona I	74
CAPÍTULO III –Ativação mitocondrial, deposição lipídica e ultraestrutura embrionária após exposição a choque térmico.....	97
CAPÍTULO IV –Apoptose e ultraestrutura de embriões produzidos <i>in vitro</i> após exposição a choque térmico nas fases pré-maturação, maturação oocitária e de blastocisto.....	126
CAPÍTULO V –ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO.....	148
ANEXO I - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA/UFMG – Experimentos 1, 2 e 3.....	161
ANEXO II - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA/UFMG – Experimento 4.....	162

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Configuração cromossômica (maturação nuclear) e padrão de distribuição mitocondrial (maturação citoplasmática) de oócitos bovinos imaturos cultivados em diferentes concentrações de Butirolactona I (BUT 10 μ M; BUT 25 μ M; BUT 50 μ M e BUT 100 μ M), e em oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais (Controle)..... 84

Tabela 2. Efeito da adição de diferentes concentrações de Butirolactona I ao meio de maturação, sobre os parâmetros relacionados à produção *in vitro* de embriões bovinos..... 90

CAPÍTULO III

Tabela 1. Configuração cromossômica (maturação nuclear) e padrão de distribuição mitocondrial (maturação citoplasmática) de oócitos bovinos imaturos, oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais (Controle; 38,5°C), mantidos em vesícula germinativa por 12 horas (VG), seguida de maturação convencional (38,5°C) e expostos a choque térmico (41°C) durante a pré-maturação (VGEC) ou maturação (MIVEC)..... 108

Tabela 2. Configuração cromossômica (maturação nuclear) e maturação citoplasmática de oócitos bovinos imaturos, oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais (Controle), mantidos em vesícula germinativa por 12 horas (VG), seguido de maturação convencional (38,5°C) e expostos a choque térmico (41°C) durante a pré-maturação (VGEC) ou maturação (MIVEC)..... 109

Tabela 3. Quantificação do metabolismo embrionário por meio da avaliação de mitocôndrias ativas e intensidade de fluorescência mitocondrial em células embrionárias de oócitos e embriões expostos a choque térmico (41°C) 111

Tabela 4. Morfometria embrionária e quantificação do estoque de lipídeos intracitoplasmáticos em embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos e embriões cultivados a 38,5 ou 41°C... 112

Tabela 5. Distribuição mitocondrial em blastocistos bovinos produzidos a partir de oócitos e embriões expostos a choque térmico, em diferentes fases do desenvolvimento *in vitro*..... 112

Tabela 6. Efeito da exposição a estresse térmico por calor de gametas e embriões bovinos, em diferentes estádios de desenvolvimento, sobre os parâmetros relacionados com o desenvolvimento <i>in vitro</i>	115
--	-----

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Número total de células embrionárias, número de células do trofoblasto, número de células do embrioblasto e porcentagem de blastômeros positivos para o teste de TUNEL (células apoptóticas) em blastocistos expandidos produzidos <i>in vitro</i> a partir de oócitos maturados ou embriões mantidos a 38,5 ou 41°C.....	135
--	-----

Tabela 2. Efeito da exposição de gametas e embriões bovinos, em diferentes estádios de desenvolvimento, a choque térmico, sobre parâmetros relacionados com o desenvolvimento embrionário.....	141
---	-----

CAPÍTULO V

Tabela 1. Taxa de clivagem embrionária, taxa de produção de blastocistos em relação ao número de embriões clivados e taxa de produção de blastocistos em relação ao total de oócitos inseminados, de acordo com cada grupo experimental.....	155
---	-----

Tabela 2. Taxas de reexpansão e eclosão dos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> e submetidos à vitrificação no sétimo dia de cultivo, de acordo com o grupo experimental.....	157
--	-----

Tabela 3. Taxa de reexpansão e eclosão de embriões bovinos em 24, 48 e 72 horas de cultivo pós desvitrificação, de acordo com o grupo experimental.....	158
--	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Influência do estresse térmico por calor sobre a fertilidade de fêmeas bovinas..... 30

CAPÍTULO II

Figura 1. Delineamento esquemático dos grupos experimentais.....81

Figura 2. Oócitos bovinos. Fotomicrografias obtidas em microscópio de epifluorescência das diversas fases da maturação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342. (a) Oócitos em vesícula germinativa (VG - Prófase I da meiose): cromossomos descondensados; (b) Quebra da vesícula germinativa (QVG); (c) Oócitos em metáfase I: cromossomos altamente condensados; (d) Oócitos em metáfase II: cromossomos condensados na placa metafásica e extrusão do primeiro corpúsculo polar (Aumento de 400x)..... 83

Figura 3. Taxas de bloqueio da retomada da meiose em oócitos bovinos cultivados em diferentes concentrações de Butirolactona I (BUT 10 μ M; BUT 25 μ M; BUT 50 μ M e BUT 100 μ M). Imaturo (Prófase I); Falha no bloqueio da maturação: oócitos em MI (Metáfase I) ou MII (Metáfase II).....85

Figura 4. Taxas de maturação citoplasmática em oócitos bovinos cultivados em diferentes concentrações de Butirolactona I (BUT 10 μ M; BUT 25 μ M; BUT 50 μ M e BUT 100 μ M). Imaturo (Distribuição homogênea ou periférica de mitocôndrias); Falha no bloqueio da maturação (Distribuição heterogênea de mitocôndrias). Letras diferentes indicam diferenças entre si ($P < 0,05$), de acordo com o teste Exato de Fisher..... 86

Figura 5. Oócitos bovinos. Fotomicrografia representativa da microscopia de fluorescência demonstrando oócitos na fase de Metáfase II. (a) Marcação da cromatina com Hoechst 33342, diferenciando os cromossomos condensados e a extrusão do corpúsculo polar; (b) Padrão de distribuição das mitocôndrias no interior do ooplasma; (c) Sobreposição das imagens (Aumento de 400x)..... 88

Figura 6. Atividade mitocondrial em oócitos bovinos cultivados em diferentes concentrações de Butirolactona I (BUT 10 μ M; BUT 25 μ M; BUT 50 μ M e BUT 100 μ M). Controle: oócitos submetidos à maturação sem pré-maturação prévia. Letras diferentes indicam diferenças entre si ($P < 0,05$), de acordo com o teste Newman Keuls..... 89

CAPÍTULO III

Figura 1. Quantificação do estoque intracitoplasmático de lipídeos por coloração com Sudan Black B em embriões bovinos provenientes da exposição ou não ao calor ambiental excessivo (41°C por 12 horas). À esquerda encontram-se os embriões de cada tratamento experimental apresentando gotículas lipídicas coradas por Sudan Black B e à direita a marcação do limiar de marcação padrão para todos os tratamentos. A e A' - Controle; B e B' - VG; C e C' - VGEC; D e D' - MIVEC; E e E' - D7EC. Imagem obtida por microscópio óptico com aumento de 400x..... 106

Figura 2. Mitocôndrias ativas em embriões bovinos pré-expostos a altas temperaturas de incubação na fase de crescimento folicular (VGEC), de maturação oocitária (MIVEC) ou pré-transferência de embrião (D7EC) em relação à oócitos cultivados em condições convencionais de temperatura (VG e Controle)..... 110

Figura 3. Eletromicrografia de blastocistos bovinos. **A e A'**: Controle - oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais; **B e B'**: **vesícula germinativa** - oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas, seguido de maturação convencional; **C e C'**: VGEC - oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas e expostos a estresse térmico por calor (EC) durante a pré-maturação; **D e D'**: MIVEC – oócitos submetidos a estresse térmico por calor por 12 horas durante a maturação; **E e E'**: D7EC - embriões produzidos em condições convencionais e submetidos à altas temperaturas por 12 horas às 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação..... 114

CAPÍTULO IV

Figura 1. Cortes semi-finos de embriões bovinos corados em azul de toluidina para preparação do material destinado à microscopia eletrônica de transmissão..... 132

Figura 2. Blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Fotomicrografias representativas de microscopia de fluorescência de embriões bovinos corados com Hoechst 33342 e TUNEL. (A) Contagem dos núcleos celulares marcados com Hoechst (azul); (B) Marcação de células com fragmentação do DNA nuclear com o TUNEL (verde)..... 134

Figura 3. Eletromicrografia de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em condições convencionais de temperatura (38,5°C) – tratamentos Controle e VG. (N) Núcleo; (*) Membrana nuclear; (M) Mitocôndria madura; (m) Mitocôndria imatura; (R) Ribossomos; (CG) Complexo de

Golgi; (RER) Retículo endoplasmático rugoso; (VS) vesícula de secreção; (MI) Microvilosidades; (EP) Espaço perivitelínico; (ZP) Zona pelúcida. A: mitocôndrias arredondadas perinucleares; A': citoplasma rico em organelas; A'': microvilosidades e espaço perivitelínico..... 136

Figura 4. Eletromicrografia de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* após exposição de oócitos imaturos ao calor ambiental excessivo (41°C por 12 horas) – tratamento VGEC. (N) Núcleo; (Bc) Blastocèle; (m) Mitocôndria imatura; (me) Mitocôndria edemaciada; (V) Vacúolo; (L) Gotícula lipídica; (R) Ribossomos; (CG) Complexo de Golgi; (RER) Retículo endoplasmático rugoso; (VS) vesícula de secreção; (Mi) Microvilosidades; (EP) Espaço perivitelínico; (REL) Retículo endoplasmático liso..... 138

Figura 5. Eletromicrografia de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* após exposição de oócitos ao calor ambiental excessivo (41°C por 12 horas) durante as 12 horas iniciais da maturação – tratamento MIVEC. (N) Núcleo; (Bc) Blastocèle; (m) Mitocôndria imatura; (me) Mitocôndria edemaciada; (mca) Mitocôndria com corpo apoptótico; (CA) Corpos apoptóticos; (V) Vacúolo; (L) Gotícula lipídica; (R) Ribossomos; (CG) Complexo de Golgi; (RER) Retículo endoplasmático rugoso; (VS) vesícula de secreção; (Mi) Microvilosidades; (EP) Espaço perivitelínico; (REL) Retículo endoplasmático liso..... 139

Figura 6. Eletromicrografia de blastocistos bovinos expostos ao calor ambiental excessivo (41°C por 12 horas) às 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação – tratamento D7EC. (N) Núcleo; (Bc) Blastocèle; (m) Mitocôndria imatura; (me) Mitocôndria edemaciada; (mca) Mitocôndria com corpo apoptótico; (mV) Mitocôndrias com vacúolos; (CA) Corpos apoptóticos; (V) Vacúolo; (L) Gotícula lipídica; (R) Ribossomos; (CG) Complexo de Golgi; (RER) Retículo endoplasmático rugoso; (VS) vesícula de secreção; (Mi) Microvilosidades; (EP) Espaço perivitelínico; (REL) Retículo endoplasmático liso..... 140

CAPÍTULO V

Figura 1. Quantificação lipídica de embriões bovinos por coloração com *Sudan Black B*. Imagem obtida por microscópio óptico com objetiva de 40x. (A) Embrião corado por *Sudan Black B*. (B) Conversão *color-threshold* para quantificação da área ocupada pelas gotículas lipídicas pelo software *Image J* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)..... 153

LISTA DE ABREVIATURAS

- Be - Blastocisto eclodido
- BE - Benzoato de estradiol
- Bi - Blastocisto inicial
- Bl - Blastocisto
- Bx - Blastocisto expandido
- BUT-I – Butirolactona I
- BUT 10 μ M - tratamento de pré-maturação no qual foi realizada a adição de 10 μ M de Butirolactona I durante 12 horas para impedir a retomada da meiose
- BUT 25 μ M - tratamento de pré-maturação no qual foi realizada a adição de 25 μ M de Butirolactona I durante 12 horas para impedir a retomada da meiose
- BUT 50 μ M - tratamento de pré-maturação no qual foi realizada a adição de 50 μ M de Butirolactona I durante 12 horas para impedir a retomada da meiose
- BUT 100 μ M - tratamento de pré-maturação no qual foi realizada a adição de 100 μ M de Butirolactona I durante 12 horas para impedir a retomada da meiose CE - Cipionato de estradiol
- CCOs - Complexo *cumulus-oophorus*
- CIV - Cultivo *in vitro* de embriões
- CLA – Ácido linoleico conjugado *trans-10, cis-12*
- D7EC - grupo experimental no qual os embriões foram expostos a choque térmico (cultivados por 12 horas à 41°C em estufa incubadora de CO₂), às 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação
- DAPI- *Fluoroshield com 4'6-diamidino-2-phenylindole*
- DMSO - Dimetil sulfóxido
- DPBS - *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*
- EC – Estresse térmico por calor
- eCG - Gonadotrofina coriônica equina
- EG - Etilenoglicol
- ERO - Espécies reativas de oxigênio
- FIV - Fecundação *in vitro* do complexo *cumulus-oophorus*
- FSH - Hormônio folículo estimulante
- GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas
- HM - *Holding Medium*
- HZ - Cruzamento Holandês X Zebu
- IETS - *International Embryo Transfer Society*
- IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
- ITU – Índice de temperatura e umidade
- LH – Hormônio luteinizante

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MI - Metáfase I

MII - Metáfase II

MIV - Maturação *in vitro* do complexo *cumulus-oophorus*

MIVEC - grupo experimental no qual os oócitos foram expostos a choque térmico (cultivados por 12 horas à 41°C em estufa incubadora de CO₂) durante as 12 horas iniciais da maturação *in vitro*

OPU - *Ovum Pick Up*

OPS - *Open pulled straw*

P4 - Progesterona

PES - Ethosulfato de fenazina

PGF_{2α} - Prostaglandina F_{2α}

PI – Prófase I

PIVE - Produção *in vitro* de embriões

PBS - Salina fosfatada tamponada

PVA- Polivinilpirrolidona ou álcool polivinílico

QVG – Quebra da vesícula germinativa

ROSCOV - Roscovitina

SFB - Soro fetal bovino

SOF - *Synthetic Oviduct Fluid Medium*

TALP - *Tyrode/albumin/sodium lactate/sodium pyruvate*

TCM - *Tissue Culture Medium*

TE - Transferência de embrião

TETF – Transferência de embrião em tempo fixo

TUNEL - *Terminal deoxinucleotil transferase mediated uracil nick end labeling*

VG - grupo experimental no qual os oócitos foram mantidos imaturos em estágio de vesícula germinativa durante 12 horas pela adição do bloqueador da meiose Butirolactona I

VGEC - grupo experimental no qual os oócitos foram mantidos imaturos em estágio de vesícula germinativa durante 12 horas pela adição do bloqueador da meiose Butirolactona I e expostos a choque térmico (cultivados por 12 horas à 41°C em estufa incubadora de CO₂)

1 RESUMO

2 O estresse térmico por calor (EC) provoca redução da fertilidade nas fêmeas bovinas, especialmente
3 nas vacas leiteiras. Sabe-se que a exposição a temperaturas ambientais elevadas afeta adversamente
4 a qualidade e competência de desenvolvimento de oócitos e embriões. Substâncias citoprotetoras,
5 quando adicionadas à alimentação animal ou a meios de produção de embrião, podem incrementar a
6 qualidade e a resistência embrionária a injúrias causadas por estresse térmico. A suplementação do
7 meio de cultivo de embriões bovinos com ácido linoleico *trans-10, cis-12* (CLA) exógeno pode
8 alterar o perfil lipídico das células embrionárias interferindo na competência de desenvolvimento
9 dos mesmos quando expostos a temperaturas adversas. O presente trabalho visa explorar fatores
10 determinantes de respostas à exposição de oócitos e embriões bovinos a temperatura de incubação
11 elevada, bem como estabelecer estratégias para diminuir danos do estresse térmico ao
12 desenvolvimento embrionário. No experimento 1 foi testado a concentração mais adequada de
13 Butirolactona I (BUT-I) para manter os oócitos em estágio de imaturidade, sem comprometer a
14 retomada da meiose posteriormente. Foram testadas quatro concentrações de BUT-I (10 μ M, 25 μ M,
15 50 μ M e 100 μ M), comparando-se com oócitos imaturos (tratamento Imaturo) e com oócitos
16 maturados (Controle). A concentração de 50 μ M de BUT-I mostrou-se mais adequada em promover
17 a inibição reversível da meiose, apresentando taxas de clivagem (92,5%) e de produção de embrião
18 (50,5%) superior à encontrada para as demais concentrações de BUT-I (P<0,05; Taxa de clivagem
19 60,6%, 31,3% e 64,2% respectivamente para BUT10 μ M, BUT25 μ M e BUT100 μ M; Taxa de
20 Produção de embrião de 32,1% para BUT10 μ M, 17,6% para BUT25 μ M e 34,4% para BUT100 μ M)
21 e semelhante ao controle nos oócitos submetidos à produção de embrião após o fim do bloqueio.
22 Nos experimentos 2 e 3 oócitos e embriões bovinos, divididos em cinco tratamentos, foram
23 submetidos a estresse térmico por calor (EC) por elevação da temperatura de incubação, em
24 diferentes estágios de desenvolvimento. No Controle, oócitos e embriões foram cultivados a 38,5°C
25 durante todas as etapas da produção *in vitro* de embriões (PIVE). No tratamento vesícula
26 germinativa (VG), oócitos foram mantidos por 12 horas em estágio de vesícula germinativa, por
27 indução farmacológica com Butirolactona-I (BUT-I) e, em seguida, foram submetidos à PIVE em
28 condições convencionais de temperatura (38,5°C). No tratamento VGEC, oócitos mantidos em
29 vesícula germinativa foram expostos a choque térmico (41°C por 12h) durante a pré-maturação e,
30 em seguida, submetidos à PIVE convencional. No tratamento MIVEC os oócitos foram submetidos
31 a choque térmico durante as primeiras 12 horas de maturação (41°C por 12h seguido de 38,5°C por
32 12h) e, em seguida, submetidos à fecundação e cultivo em condições de termoneutralidade (38,5°C).
33 No tratamento D7EC foram submetidos às 12h de choque térmico embriões de 144 horas de

34 desenvolvimento pós-inseminação, em seguida foram submetidos à 12h de cultivo em condições
35 convencionais de temperatura. Embriões produzidos a partir de oócitos imaturos expostos a calor
36 excessivo (VGEC) apresentaram menor atividade mitocondrial em relação a embriões submetidos à
37 EC no estágio de blastocisto ($P < 0,05$), entretanto se mostrou semelhante ao Controle e demais
38 tratamentos no parâmetro avaliado. Houve redução dos estoques citoplasmáticos de lipídeos em
39 embriões provenientes de oócitos ou embriões submetidos à EC (nº de gotículas lipídicas 964,6;
40 1.484,2; 788,1 para os tratamentos VGEC, MIVEC e D7EC, respectivamente) em relação aos
41 tratamentos Controle e VG ($P < 0,05$). Em relação ao percentual da área embrionária ocupada por
42 gotículas lipídicas o tratamento VGEC apresentou o menor teor de lipídeos entre os tratamentos
43 avaliados ($P < 0,05$; % área do embrião ocupada por lipídeos de 19,0% para Controle, 15,4% para
44 VG, 8,1% para VGEC, 16,5% para MIVEC e 17,1% para D7EC). Foram encontradas diversas
45 alterações morfofuncionais relacionadas com qualidade, metabolismo e implantação embrionária,
46 como alterações ultraestruturais de mitocôndrias e microvilosidades e aumento de vacuolizações
47 citoplasmáticas. O tratamento VGEC foi o mais afetado pelo choque térmico de acordo com os
48 parâmetros relacionados com o desenvolvimento embrionário, apresentando redução das taxa de
49 clivagem, produção de embrião e eclosão em relação ao Controle ($P < 0,05$). Os resultados
50 encontrados evidenciam que os oócitos de folículos ovarianos em estágios iniciais de crescimento
51 são especialmente sensíveis aos danos causados pelo calor excessivo. No experimento 4 foi
52 adicionado ao meio de cultivo *in vitro* o CLA com o objetivo de modular a deposição lipídica
53 intracitoplasmática e aumentar a resistência embrionária ao choque térmico. Os embriões cultivados
54 na presença do CLA apresentaram menor acúmulo de lipídeos ($P < 0,05$; área média ocupada por
55 lipídeos de 272.554,5; 301.960,7 e 413.124,9 para os grupos CLA, CLA+SFB e Controle,
56 respectivamente). Entretanto, o incremento na qualidade embrionária não foi suficiente para
57 aumentar a sobrevivência dos mesmos, demonstrado pela taxa de reexpansão embrionária superior
58 para o Controle (70,4%) em relação aos tratamentos SFB+CLA (43,3%) e CLA (47,1%). Oócitos e
59 embriões submetidos a choque térmico vivenciam alterações importantes na dinâmica
60 citoplasmática e na morfofuncionalidade de organelas como mitocôndrias e microvilosidades
61 embrionárias que podem estar diretamente relacionadas com a diminuição da sobrevivência
62 embrionária pós-exposição ao calor excessivo.

63

64 **Palavras-chave:** estresse térmico por calor, sobrevivência embrionária, metabolismo embrionário,
65 ácido linoleico conjugado *trans-10, cis-12*.

66

67 **ABSTRACT**

68 Heat stress (HS) causes reduced fertility in bovine females, especially in dairy cows. Exposure to
69 high environmental temperatures is known to adversely affect the quality and developmental
70 competence of oocytes and embryos. Cytoprotective substances, when added to animal feed or
71 embryo production media, can increase embryonic quality and resistance to injuries caused by heat
72 stress. Supplementation of the bovine embryo culture medium with exogenous conjugated linoleic
73 acid trans-10, cis-12 (CLA) can alter the lipid profile of embryonic cells, interfering with their
74 developmental competence when exposed to adverse temperatures. The present work aims to
75 explore determining factors of responses to the exposure of bovine oocytes and embryos to elevated
76 incubation temperature, as well as to establish strategies to reduce heat stress damage to embryonic
77 development. In experiment 1, the most appropriate concentration of Butyrolactone I (BUT-I) was
78 tested to keep the oocytes in an immature stage, without compromising the resumption of meiosis
79 later. Four concentrations of BUT-I (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M and 100 μ M) were tested, comparing with
80 immature oocytes (Immature Treatment) and matured oocytes (Control). The 50 μ M concentration
81 of BUT-I proved to be more adequate in promoting reversible inhibition of meiosis, with rates of
82 cleavage (92.5%) and embryo production (50.5%) higher than that found for the other
83 concentrations of BUT-I (P <0.05; Cleavage rate 60.6%, 31.3% and 64.2% respectively for
84 BUT10 μ M, BUT25 μ M and BUT100 μ M; Embryo production rate of 32.1% for BUT10 μ M, 17.6%
85 for BUT25 μ M and 34.4% for BUT100 μ M) and similar to the control in oocytes submitted to
86 embryo production after the end of the meiosis block. In experiments 2 and 3 oocytes and bovine
87 embryos, divided into five treatments, were subjected to heat stress by elevation of the incubation
88 temperature, at different stages of development. In Control, oocytes and embryos were cultured at
89 38.5°C during all stages of *in vitro* embryo production (IVEP). In the germinal vesicle treatment
90 (VG), oocytes were maintained for 12 hours in the germinal vesicle stage, by pharmacological
91 induction with Butyrolactone-I (BUT-I) and, then, they were submitted to IVEP under conventional
92 temperature conditions (38.5°C). In the VGEC treatment, oocytes maintained in a germinal vesicle
93 were exposed to thermal shock (41°C for 12h) during pre-maturation and then subjected to
94 conventional IVEP. In the MIVEC treatment, the oocytes were subjected to thermal shock during
95 the first 12 hours of maturation (41°C for 12h followed by 38.5°C for 12h) and then subjected to
96 fertilization and cultivation under thermoneutral conditions (38.5°C). In the D7EC treatment,
97 embryos with 144 hours post-insemination were subjected to 12 hours of thermal shock, followed
98 by 12 hours of culture under conventional temperature conditions. Embryos produced from
99 immature oocytes exposed to excessive heat (VGEC) showed less mitochondrial activity compared

100 to embryos submitted to HS at the blastocyst stage ($P < 0.05$), however it was shown to be similar to
101 the Control and other treatments in the evaluated parameter. There was a reduction in the
102 cytoplasmic lipids stocks in embryos from oocytes or embryos submitted to HS (number of lipid
103 droplets 964.6; 1,484.2; 788.1 for treatments VGEC, MIVEC and D7EC, respectively) compared to
104 treatments Control and VG ($P < 0.05$). Regarding the percentage of the embryonic area occupied by
105 lipid droplets, the VGEC treatment presented the lowest lipid content among the evaluated
106 treatments ($P < 0.05$; % embryo area occupied by lipids of 19.0% for Control, 15.4% for VG, 8.1%
107 for VGEC, 16.5% for MIVEC and 17.1% for D7EC). Several morphofunctional changes related to
108 quality, metabolism and embryonic implantation were found, such as ultrastructural changes in
109 mitochondria and microvilli and an increase in cytoplasmic vacuolations. The VGEC treatment was
110 the most affected by the thermal shock according to the parameters related to the embryonic
111 development, presenting a reduction in the rate of cleavage, embryo production and hatching in
112 relation to the Control ($P < 0.05$). The results found show that oocytes from ovarian follicles in the
113 early stages of growth are especially sensitive to damage caused by heat stress. In experiment 4,
114 CLA was added to the *in vitro* culture medium in order to modulate the intracytoplasmic lipid
115 deposition and increase the embryonic resistance to thermal shock. Embryos cultured in the
116 presence of CLA showed lower lipids accumulation ($P < 0.05$; average area occupied by lipids of
117 272,554.5; 301,960.7 and 413,124.9 for the CLA, CLA + SFB and Contole groups, respectively).
118 However, the increase in embryonic quality was not enough to increase their survival, demonstrated
119 by the superior embryonic reexpansion rate for the Control (70.4%) in relation to the SFB + CLA
120 (43.3%) and CLA (47,1%). Oocytes and embryos subjected to heat shock experience important
121 changes in the cytoplasmic dynamics and morphofunctionality of organelles such as embryonic
122 mitochondria and microvilli that can be directly related to decreased embryonic survival after
123 exposure to heat stress.

124

125 **Keywords:** heat stress, embryonic survival, embryo metabolism, conjugated linoleic acid *trans-10*,
126 *cis-12*.

127

1. INTRODUÇÃO

Tem crescido a preocupação com a intensificação do aquecimento global e suas consequências para o equilíbrio ambiental e para a biodiversidade. O calor tem sido um dos principais estressores avaliados pela ciência, principalmente em estudos que relacionam o efeito de altas temperaturas ambientais à saúde, atividade produtiva e fertilidade de vacas leiteiras, pois a alta demanda metabólica, associada à produção de calor endógeno, torna vacas leiteiras de alta produção particularmente sensíveis à exposição ao calor (Kadzere, *et al.*, 2002; Hansen, 2009; Polsky *et al.*, 2017). Os efeitos da alta temperatura podem ainda ser intensificados pela umidade do ar, se tornando muito difícil para o animal dissipar o calor e, com isso, o animal é submetido a um quadro de estresse térmico por calor. O trato reprodutivo é especialmente sensível à exposição crônica ao calor excessivo, devido a sua complexidade e a dos órgãos envolvidos no controle deste sistema (Jordan, 2003; Collier *et al.*, 2017; Wolferson e Roth, 2019). O comprometimento de qualquer um destes componentes afeta diretamente a eficiência reprodutiva de rebanhos bovinos.

Fêmeas bovinas apresentam redução da taxa de prenhez em períodos de temperatura ambiental elevada quando comparado a épocas de temperaturas mais amenas (Ulberg e Burfenning, 1967; Berman *et al.*, 1985; Zeron *et al.*, 2001; Al-Katanani *et al.*, 2002a; Al-Katanani *et al.*, 2002c; Sartori *et al.*, 2002; West *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013, 2017). A redução da taxa de prenhez observada em fêmeas submetidas ao estresse térmico por calor é de origem multifatorial. Perreira *et al.* (2017) encontraram que 2,8% das perdas de gestação estão relacionadas com falhas de ovulação, 5,1% ocorrem devido a alterações hormonais decorrentes do estresse térmico por calor, sendo que o restante das perdas está relacionado com a redução da qualidade de oócitos e embriões. Ainda existe uma lacuna de conhecimento sobre quais são as principais alterações de oócitos e embriões bovinos submetidos à hipertermia que justificam o insucesso da gestação.

Tendo em vista o impacto da pecuária para a economia brasileira, é importante conhecer cada vez mais os fatores limitantes para a produção e sobrevivência do conceito bovino, visando incrementar os índices reprodutivos dos rebanhos, bem como desenvolver estratégias para melhorar a sobrevivência embrionária. Com essa pesquisa propõe-se ampliar o conhecimento em relação à exposição de oócitos imaturos, maturados e blastocistos a elevadas temperaturas ambientais pode interferir no crescimento, desenvolvimento e na qualidade de oócitos e embriões bovinos.

Objetivou-se com a abordagem utilizada, fornecer mais informações sobre alterações celulares ocultas causadas pelo choque térmico em oócitos e blastocistos bovinos.

160

2. HIPÓTESES

- 161 • O oócito em estágio de vesícula germinativa é mais sensível a efeitos deletérios de estresse
162 térmico por calor do que oócitos após a ativação da retomada da meiose;
- 163 • O blastocisto de sete dias de desenvolvimento (D7) exposto à hipertermia materna,
164 independentemente de herança oocitária, sofre danos de estresse térmico por calor;
- 165 • A exposição de oócitos no estágio de vesícula germinativa, oócitos em maturação e de
166 blastocistos de sete dias de desenvolvimento a choque térmico interfere em parâmetros de
167 qualidade do embrião;
- 168 • A adição de ácido linoleico conjugado *trans*-10, *cis*-12 no meio de cultivo *in vitro* promove a
169 redução de gotículas intracelulares de lipídeos, incrementando a qualidade embrionária e a
170 resistência de embriões bovinos a choque térmico.

171

172

3. OBJETIVOS

173 **3.1 - Objetivos gerais**

- 174 • Avaliar alterações celulares causadas pelo estresse térmico por calor em oócitos e embriões
175 bovinos;
- 176 • Avaliar se a exposição de oócitos imaturos, de oócitos em maturação e de blastocistos a choque
177 térmico interfere em parâmetros de qualidade, avaliados por atividade mitocondrial, percentual
178 lipídico, fragmentação de DNA e eclodibilidade do embrião;
- 179 • Avaliar estratégias para incrementar a produção, qualidade e resistência a choque térmico em
180 embriões bovinos.

181

182 **3.2 - Experimento 1: Objetivos específicos**

- 183 • Avaliar concentração de Butirolactona-I para manter oócitos em estágio de imaturidade, sem
184 comprometer a retomada da meiose.

185

186 **3.3 - Experimento 2: Objetivos específicos**

- 187 • Avaliar o efeito da indução de estresse térmico por calor em oócitos bovinos imaturos mantidos
188 em estágio de vesícula germinativa (VG) e durante maturação, sobre maturação nuclear e

189 citoplasmática, atividade mitocondrial de células embrionárias, acúmulo de lipídeos e
190 ultraestrutura de mitocôndrias embrionárias, bem como no número de embriões clivados e total
191 de blastocistos produzidos *in vitro*;

192 • Avaliar o efeito da indução de estresse térmico por calor em blastocistos de sete dias de
193 desenvolvimento sobre morfofuncionalidade mitocondrial de células embrionárias, acúmulo de
194 lipídeos, bem como no número de embriões clivados e total de blastocistos produzidos *in vitro*;

195 • Avaliar em qual momento do desenvolvimento de oócitos e embriões a indução de estresse
196 térmico por calor *in vitro* prejudica mais intensamente a produção *in vitro* e a qualidade dos
197 embriões bovinos.

198

199 **3.4 - Experimento 3: Objetivos específicos**

200 • Avaliar o efeito da indução de estresse térmico por calor em oócitos bovinos imaturos mantidos
201 em estágio de vesícula germinativa (VG) e durante maturação, sobre número total de células
202 embrionárias, taxa de apoptose e ultraestrutura embrionária;

203 • Avaliar o efeito da indução de estresse térmico por calor em blastocistos de sete dias de
204 desenvolvimento, sobre número total de células embrionárias, taxa de apoptose, ultraestrutura
205 embrionária e eclodibilidade;

206 • Avaliar em qual momento do desenvolvimento de oócitos e embriões a indução de estresse
207 térmico por calor *in vitro* prejudica mais intensamente a produção *in vitro*, a integridade de
208 DNA dos blastômeros e ultraestrutura de embriões bovinos.

209

210 **3.5 - Experimento 4: Objetivos específicos**

211 • Avaliar se a adição de ácido linoleico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA) no meio de cultivo *in*
212 *vitro* seria uma estratégia para diminuir a quantidade de gotículas intracelulares de gordura
213 depositadas no embrião, de modo a incrementar a qualidade embrionária e resistência ao choque
214 térmico.

215

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

216

217 AL-KATANANI, Y. M., DROST, M., MONSON, R. L. *et al.* Pregnancy rates following timed
218 embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat
219 stress conditions. *Theriogenology*, v. 58, p. 171-182, 2002a.

220 AL-KATANANI, Y. M., PAULA-LOPES, F. F., HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to
221 heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 390-396, 2002c.

222 BERMAN, A., FOLMAN, Y., KAIM, M. *et al.* Upper critical temperatures and forced ventilation
223 effects for high-yielding dairy cows in subtropical climate. *J. Dairy Sci.*, v. 68, n. 1488-1495, 1985.

224 COLLIER, R. J., RENQUIST, B. J. e XIAO, Y. A 100-year review: stress physiology including
225 heat stress. *J. Dairy Sci.*, v. 100, p. 10367-10380, 2017. Disponível em: <doi.org/10.3168/jds.2017-
226 13676>.

227 HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, v. 364, p.
228 3341-3350, 2009.

229 JORDAN, E. R. Effect of heat stress on reproduction. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 104-114, 2003.
230 Disponível em: <doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74043-0>

231 KADZERE, C. T., MURPHY, M. R., SILANIKOVE, N. *et al.* Heat stress in lactating dairy cows:
232 A review. *Livest. Prod. Sci.*, v. 77, p. 59-91, 2002. Disponível em: <doi.org/10.1016/S0301-
233 6226(01)00330-X>.

234 PEREIRA, M. H. C., WILTBANK, M. C., GUIDA, T. G. *et al.* Comparison of 2 protocols to
235 increase circulating progesterone concentration before timed artificial insemination in lactating
236 dairy cows with or without elevated body temperature. *J. Dairy Sci.*, v. 100, p. 8455-8470, 2017.
237 Disponível em: <doi.org/10.3168/jds.2016-12145>.

238 PEREIRA, M. H. C., RODRIGUES, A. D. P., MARTINS, T. *et al.* Timed artificial insemination
239 programs during summer in lactating Dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an
240 estrogen/progesterone-based protocol. *J. Dairy Sci.*, v. 96, p. 6904-6914, 2013. Disponível em:
241 <doi.org/10.3168/jds.2012-6260>.

242 SARTORI, R., SARTOR-BERGFELT, R., MERTENS, J. N. *et al.* Fertilization and early embryonic
243 development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy*
244 *Sci.*, v. 85, p. 2803-2812, 2002.

245 STEWART, B. M., BLOCK, J., MORELLI, P. *et al.* Efficacy of embryo transfer in lactating dairy
246 cows during summer using fresh or vitrified embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. *J.*
247 *Dairy Sci.*, v. 94, p. 3437-3445, 2011.

248 ULBERG, L. D. e BURFENING, P. J. Embryo death resulting from adverse environment on
249 spermatozoa or ova. *J. Anim. Sci.*, v. 26, p. 571-577, 1967. Disponível em:
250 <doi.org/10.2527/jas1967.263571x>.

251 WEST, J. W. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 86, n. 6, p.
252 2131-2144, 2003.

253 WOLFERTON, D. e ROTH, Z. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Anim.*
254 *Front.*, v. 8, p. 32-38, 2019. Disponível em: <doi.org/10.1093/af/vfy027>.

255 ZERON, Y., OCHENRETNEY, A., KEDAR, O. *et al.* Seasonal changes in bovine fertility: relation
256 to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of
257 follicles. *Reproduction*, v. 121, p. 447-454, 2001.

258

259

5. CAPÍTULO I –

260

REVISÃO DE LITERATURA

261

262

263

264

265

266

267

268

269

Efeito do estresse térmico por calor na redução da fertilidade de fêmeas bovinas

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

Os efeitos de estresse térmico por calor na performance produtiva, reprodutiva e na saúde dos rebanhos bovinos vem sendo discutidos e se tornado alvo de pesquisas. Estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de explorar efeitos diretos da temperatura ambiental elevada, sobretudo quando associada à umidade e radiação solar, na fertilidade das fêmeas bovinas. A partir do conhecimento de determinantes da redução do desempenho reprodutivo nos sistemas de criação de bovinos será possível traçar estratégias mais específicas e eficientes para mitigar efeitos deletérios do estresse térmico por calor.

O clima é um dos componentes ambientais que mais interfere no bem-estar animal, representando fator determinante da produção e produtividade de rebanhos bovinos (Pereira, 2005). A percepção do calor externo é resultado da combinação da temperatura ambiental com a umidade relativa do ar, algumas vezes associada à intensidade de radiação solar e da velocidade do vento, que determina a sensação de desconforto ou conforto térmico. Ambientes quentes e úmidos, que são os predominantes no Brasil, podem afetar de maneira adversa a produção animal, em resposta aos efeitos da alta temperatura do ar, diminuindo a ingestão de alimentos, o ganho de peso (Allen *et al.*, 1963; Rhoads *et al.*, 2009; Wheelok *et al.*, 2010; Baumgard e Rhoads, 2012), a resistência a doenças (Baumgard *et al.*, 2015) e a fertilidade dos animais (Berman *et al.*, 1985; Zeron *et al.*, 2001; Al-Katanani *et al.*, 2002a; Al-Katanani *et al.*, 2002c; Sartori *et al.*, 2002; West *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2011). A redução da produção e das taxas de concepção durante a época do ano de temperatura mais elevada é um problema de extensão mundial já que, até mesmo em regiões de clima temperado, no verão as temperaturas se elevam acima da zona de termoneutralidade para vacas leiteiras (Veissier *et al.*, 2018).

284

285

286

287

288

289

A sobrevivência e atividade produtiva dos mamíferos dependem da sua capacidade de manter a temperatura corporal constante ou pouco variável, independente das alterações na temperatura ambiental, processo esse conhecido como homeotermia (Azevedo e Alves, 2009). Quando a temperatura externa aproxima-se da temperatura corporal interna do animal, os mecanismos fisiológicos de termorregulação ficam comprometidos (Hansen *et al.*, 2009; Baumgard *et al.*, 2015). O estresse pelo calor ocorre quando a temperatura do ar eleva-se de tal maneira que

290 ultrapassa a capacidade termorreguladora do animal, a ponto de comprometer funções celulares
291 (Hansen *et al.*, 2009).

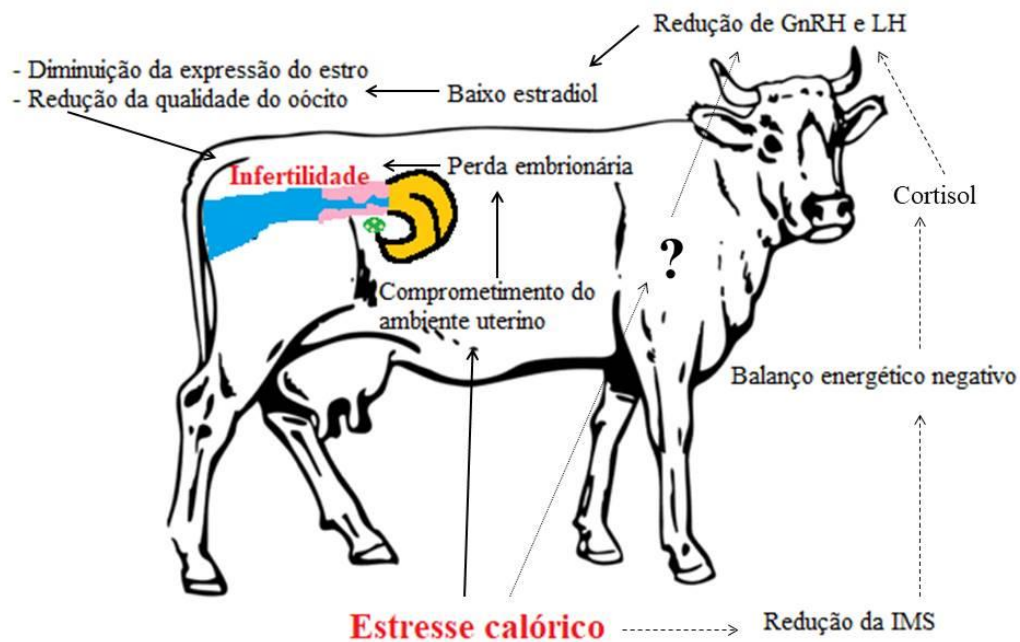
292 Diante de um estímulo estressor, que pode ser de origem interna ou externa, o organismo do
293 animal é estimulado a desencadear processos fisiológicos de reajustamento neuroendócrino e
294 metabólico que visam à estabilidade, como por exemplo, aumento da frequência cardíaca,
295 respiratória e da sudorese. O calor ou o frio desencadeiam estresse do tipo térmico, por isso podem
296 ser denominados como estresse térmico pelo calor ou simplesmente estresse calórico (EC) e
297 estresse térmico pelo frio (Pereira, 2005). Hansen (2009) adota a nomenclatura de estresse térmico
298 por calor para o processo que ocorre *in vivo*, e choque térmico às situações agressivas causadas pela
299 elevada temperatura de incubação *in vitro*.

300 Uma das formas de avaliar a adaptação do bovino à temperatura ambiental elevada é
301 realizando-se a mensuração da alteração de parâmetros vitais como a frequência cardio-respiratória
302 e a temperatura corporal (Cardoso *et al.*, 2015). Embora a elevação na temperatura retal seja um
303 sinal clínico importante de estresse térmico por calor em bovinos, esses dados nem sempre estão
304 disponíveis (Jordan, 2003).

305 A exposição a intenso calor ambiental, durante algumas horas ou até poucos dias, resulta em
306 quadro de estresse térmico por calor agudo. Essa informação é transmitida por neurônios aferentes
307 ao sistema nervoso central, que desencadeia resposta de adaptação ao calor ou aclimatação. Já em
308 casos de exposições prolongadas à temperatura ambiente adversa tem-se o quadro de estresse
309 térmico por calor crônico, que é impulsionado pelo sistema endócrino, alterando a sensibilidade dos
310 tecidos aos sinais homeostáticos, resultando em novo estado fisiológico (Bauman e Currie, 1980).

311 O ciclo estral é controlado pela flutuação na liberação dos hormônios sexuais que, por sua
312 vez, controlam as ondas de crescimento folicular. Durante estresse térmico por calor crônico,
313 hormônios relacionados com a fisiologia reprodutiva como LH, FSH, inibina, estrógeno e
314 progesterona estão alterados (Abilay *et al.*, 1975; Badinga *et al.*, 1993; Wolferson *et al.*, 1997;
315 Wilson *et al.*, 1998a, b; Collier *et al.*, 2017). Isso leva, entre outros fatores, à redução da
316 manifestação de estro, falha no desenvolvimento do folículo ovariano e redução da competência de
317 desenvolvimento de oócitos em embriões (West *et al.*, 2003; Beltran e Vasconcelos, 2008).
318 Conforme esquematizado na **Figura 1**, a redução da fertilidade de fêmeas bovinas submetidas a
319 estresse térmico por calor ocorre por influência direta e indireta do calor excessivo sobre o trato
320 reprodutivo.

321



322

323 **Figura 1.** Influência do estresse térmico por calor sobre a fertilidade de fêmeas bovinas. IMS – ingestão de
 324 matéria seca; GnRH – hormônio liberador de gonadotropinas; LH – hormônio luteinizante. Fonte: Adaptado
 325 de Vasconcelos, 2015.

326

327 Vacas leiteiras de alta produção têm metabolismo e produção de calor aumentados pela
 328 ingestão de alimentos com alto teor energético. O aumento da atividade metabólica, associado com
 329 elevada temperatura ambiente, pode resultar em estresse térmico por calor que prejudica a produção
 330 de leite e o desempenho reprodutivo (Pires *et al.*, 2002; West *et al.*, 2003; Beltran e Vasconcelos,
 331 2008). O embrião bovino recém-formado tem futuro incerto e seu destino é ditado, até certo ponto,
 332 por eventos que ocorrem antes da fecundação (Hansen, 2011; Geary, *et al.*, 2013). Em vacas
 333 leiteiras em lactação, menos de 40% dos zigotos sobrevivem ao período embrionário (Sartori *et al.*,
 334 2010; Hansen, 2011). A baixa sobrevivência embrionária em raças especializadas para a produção
 335 de leite pode ser resultante de herança do oócito ou dos espermatozoides de seus progenitores, de
 336 erros intrínsecos no desenvolvimento ou por alterações da fisiologia materna, como ocorre na
 337 exposição prolongada ao calor (Geary *et al.*, 2013; Hansen, *et al.*, 2013).

338 Durante os meses quentes do ano é observada queda acentuada na taxa de concepção de
 339 vacas e novilhas da raça Holandesa. Foi demonstrado que vacas com parição durante os meses mais
 340 quentes apresentam período de serviço mais longo, quando comparadas àquelas que pariram nos

341 meses mais frios. Isto ocorre devido à redução na competência do oócito em se desenvolver em
342 embrião, assim como o aumento das taxas de morte embrionária quando a vaca é submetida a
343 estresse térmico por calor. Zeron *et al.* (2001), avaliando 70.885 concepções em primíparas e
344 143.490 concepções em multíparas da raça Holandesa, observaram que a taxa de concepção média
345 de primíparas no verão foi de 15,6% e de 12,8% em multíparas. Contudo, no inverno as taxas foram
346 comparativamente superiores ($P < 0,05$) em ambos os grupos, encontrando-se taxas de concepção de
347 44,1% e 39,2%, para primíparas e multíparas, respectivamente. Adicionalmente, foi encontrado que
348 o número de folículos antrais de 3 a 8mm, presentes em cada ovário, foi maior no inverno (19,6
349 folículos) do que no verão (12,0 folículos). Os autores observaram ainda que o número de oócitos
350 com citoplasma escuro e homogêneo, o número de embriões clivados, e a produção total de mórulas
351 e blastocistos foi superior no inverno em comparação com o verão.

352 A redução do desempenho reprodutivo nas épocas mais quentes do ano não é um problema
353 recente. Essa observação vem sendo relatada há anos nas regiões que vivenciam a estação de verão,
354 caracterizada pelo calor intenso. Ulberg e Burfening (1967) foram um dos pioneiros em associar a
355 redução da fertilidade com a exposição ao calor ambiental excessivo. Foi encontrado que quando a
356 temperatura externa aumentava em 1°C após a inseminação artificial (IA), a taxa de concepção
357 apresentava redução de 61% para 45%. Além disso, vacas que apresentaram temperatura retal de
358 40°C, como resultado da exposição à temperatura ambiente de 32,2°C por 72 h após a IA tiveram
359 taxas de concepção de 0% em comparação com taxa de concepção de 48% em vacas com
360 temperatura retal de 38,5°C, expostas à temperatura de 21,1°C.

361 O estresse térmico por calor atualmente é um dos fatores de maior impacto econômico nos
362 sistemas de produção de leite. St-Pierre e colaboradores (2003) fizeram estudo visando estimar
363 quanto o desconforto ambiental custa ao produtor de leite e o resultado foi que, nos Estados Unidos,
364 as perdas com diminuição da produção de leite e eficiência reprodutiva geram prejuízo estimado de
365 900 milhões de dólares por ano. Nesse estudo foi encontrado que vacas submetidas ao calor
366 excessivo apresentavam diminuição na ingestão de matéria seca de 6 a 30%, decréscimo de 15 a
367 20% na produção de leite, redução de 40 a 50% da eficiência reprodutiva, além de aumento da
368 mortalidade e na incidência e severidade das mastites. Transpondo essas estimativas para nossa
369 realidade, utilizando-se das mesmas fórmulas matemáticas propostas por St-Pierre *et al.* (2003), e
370 considerando o preço médio pago por litro de leite no Brasil, bem como os custos com
371 medicamentos quando o cálculo foi realizado, o estresse térmico por calor resultaria em prejuízo
372 estimado de R\$ 1.527,00 por vaca/ano (considerando o valor do dólar em relação ao real na época
373 de 1 dólar = 2,90 reais).

374 *Sobrevivência embrionária após exposição a temperaturas ambientais elevadas*

375 Altas temperaturas ambientais prejudicam a produção de embriões, pois alteram o
376 crescimento dos oócitos, a formação de transcritos e síntese proteica (Al-Katanani *et al.*, 2002c). O
377 estresse térmico por calor provavelmente compromete a qualidade dos oócitos por alterar padrões
378 de desenvolvimento folicular, produção de hormônios esteroides e expressão gênica (Hansen,
379 2007). A diminuição da capacidade de desenvolvimento de oócitos submetidos a estresse térmico
380 por calor durante a maturação também pode estar associada com a alteração da composição
381 fosfolipídica da membrana oocitária (Zeron *et al.*, 2001).

382 O choque térmico (41°C) durante as primeiras 12 horas de maturação reduziu a taxa de
383 clivagem, o número de oócitos que se desenvolveram até o estágio de blastocisto e a porcentagem
384 de embriões clivados que se desenvolveram a blastocistos (Roth e Hansen, 2004a; Roth e Hansen,
385 2004b; Paes *et al.*, 2016). Por outro lado, Edwards e Hansen (1997) não encontraram efeitos
386 deletérios em oócitos incubados *in vitro* e à sua competência para fecundação após a exposição de
387 complexos *cumulus oophorus* (CCOs) a 41°C, nas primeiras 12 horas de maturação. Provavelmente,
388 as células do *cumulus* conferem proteção ao oócito contra danos causados por altas temperaturas,
389 pois a remoção das mesmas, durante a fertilização ou nas primeiras clivagens, aumentou a
390 sensibilidade embrionária às variações térmicas (Edwards e Hansen, 1997).

391 Durante o desenvolvimento embrionário inicial, previamente à ativação do genoma, o
392 embrião é sensível a diversas formas de estresse, incluindo exposição a calor excessivo (Paula-
393 Lopes e Hansen, 2002). Entretanto, o mecanismo pelo qual o estresse térmico por calor bloqueia o
394 desenvolvimento do embrião ainda não foi totalmente esclarecido (De Castro e Paula e Hansen,
395 2008). A exposição de embriões nos estádios de duas, quatro e oito células a 41°C por 12 horas
396 reduz o número de embriões que se desenvolvem até blastocisto. O estresse térmico por calor reduz
397 a produção embrionária 24 horas após o final da exposição de embriões de duas células à alta
398 temperatura de incubação. Por outro lado, o desenvolvimento de mórulas compactas permanece
399 inalterado. Também foi encontrado que embriões no estágio de duas células são mais sensíveis a
400 estresse térmico por calor do que os oócitos (Edwards e Hansen, 1997). Stewart *et al.* (2011)
401 expuseram zigotos, embriões de duas células, e mórulas à incubação a 40°C por 24 horas e
402 observaram decréscimo no desenvolvimento até o estágio de blastocisto nos zigotos e embriões de
403 duas células estressados, porém, o mesmo não ocorreu com as mórulas (P<0,05).

404 Inicialmente foi proposto que a sensibilidade de embriões em estádios precoces de
405 desenvolvimento, à temperatura ambiental elevada, ocorria devido a sua inabilidade de responder e
406 se adaptar a estresse térmico por calor, já que antes da ativação embrionária o indivíduo possui

407 baixa atividade transcricional (Barnes e First, 1991). Foi encontrado que os efeitos de estresse
408 térmico por calor diminuem à medida que os embriões se desenvolvem, ou seja, o embrião adquire
409 resistência a efeitos negativos de altas temperaturas com o passar do tempo (Ealy *et al.*, 1993). A
410 habilidade de embriões em estádios avançados de desenvolvimento sobreviverem à elevação da
411 temperatura pode estar relacionada com o maior número de suas células, em comparação com os
412 embriões iniciais. Caso o número de células remanescentes pós-estresse, que não sofreram
413 apoptose, for compatível com a continuidade de desenvolvimento, o embrião será capaz de
414 prosseguir seu crescimento e sobreviver. Portanto, quanto maior o número total de células
415 embrionárias, maior será a expectativa de sobrevivência (Edwards e Hansen, 1997).

416 Diversas pesquisas indicam que após a ativação do genoma embrionário o conceito torna-se
417 progressivamente mais resistente à hipertemia. Em contraste, foi encontrado que a transferência de
418 embriões sete dias após a fecundação *in vitro* resultou em taxa de gestação de 26,7% (n=20) para
419 receptoras expostas a altas temperaturas ambientais, enquanto que a taxa de gestação em trabalhos
420 semelhantes, realizados em condições ambientais mais amenas, variou entre 42% (n=89; Agca *et al.*,
421 1998) e 53% (n=1884; Hasler *et al.*, 1995), mostrando que o estresse térmico por calor também
422 interfere na sobrevivência embrionária em estádios mais tardios de desenvolvimento (Al-Katanani
423 *et al.*, 2002a). O estresse térmico por calor afeta não apenas o desenvolvimento do embrião inicial,
424 mas também pode reduzir o crescimento embrionário até o dia 17, que é um período de maior
425 produção de interferon-tau (IFN-tau) e do reconhecimento da gestação. Concentrações adequadas
426 de IFN-tau são fundamentais para reduzir a secreção pulsátil de prostaglandina F_{2α}, bloquear a
427 regressão do corpo lúteo e manter a prenhez. Foi encontrado que o estresse térmico por calor entre
428 os dias 8 a 16 reduziu o tamanho e o peso de embriões recuperados no dia 17 de vacas de corte.
429 Essa redução do tamanho do embrião foi associada à produção de quantidades inferiores de IFN-tau
430 (Biggers *et al.*, 1987).

431 Putney *et al.* (1988) incubaram embriões e explantes endometriais obtidos no dia 17 de
432 gestação em temperaturas de termoneutralidade (39°C durante 24 horas) ou estresse térmico por
433 calor (39°C durante 6 horas e 43°C durante 18 horas). As condições de estresse térmico por calor
434 resultaram em redução da síntese de proteínas e de IFN-tau em 71% dos embriões; entretanto, a
435 secreção endometrial de prostaglandina F_{2α} e a secreção embrionária de prostaglandina E₂
436 aumentaram 72% em resposta ao estresse. Estes estudos comprovam que tanto o embrião quanto o
437 ambiente uterino podem ser intensamente afetados pelo calor, após o período de ativação do
438 genoma embrionário.

439

440 *Respostas fisiológicas de fêmeas bovinas Bos taurus e Bos indicus ao calor*

441 O estabelecimento e a manutenção da gestação em bovinos dependem da comunicação
442 eficiente entre a mãe e o feto, durante toda a gestação. Sabe-se que a maioria das perdas de gestação
443 ocorre durante o período embrionário, e as razões biológicas incluem fatores embrionários,
444 maternos e ambientais, como a qualidade de ovócitos e embriões, função endometrial alterada,
445 falhas na comunicação materno-embrionária e fatores ambientais estressantes como o estresse
446 térmico por calor e as deficiências nutricionais (Pedersen *et al.*, 2017).

447 Em regiões tropicais, as condições ambientais são desafiadoras para que zebuínos e taurinos
448 expressem todo seu potencial genético produtivo (Pereira, 2005). Bovinos de raças zebuínas são
449 mais adaptados a estresse térmico por calor que bovinos das raças taurinas, e a adaptabilidade dos
450 zebuínos ao calor está relacionada à pele e pelagem escuras, maior superfície corporal (Pereira,
451 2005), e glândulas sudoríparas mais longas, largas e volumosas que conferem melhor capacidade de
452 sudação (Pan, 1963). O animal zebuíno sofre redução menos severa na ingestão alimentar (Allen *et*
453 *al.*, 1963), na taxa de crescimento (O'Bannon *et al.*, 1955), na produção de leite (Johnson, 1965) e
454 nas funções reprodutivas (Rocha *et al.*, 1998) em resposta a estresse térmico por calor, quando
455 comparado com animais taurinos. Para avaliar a resistência aos efeitos da temperatura ambiental
456 elevada foi realizado estudo na Índia, cuja temperatura no pico do verão variou de 37 a 45°C. Foi
457 comparada a resistência ao calor entre dois padrões raciais, a raça zebuína Sahiwal e animais
458 mestiços Frieswal. Observou-se que quando a temperatura ambiente foi superior a 37°C, os animais
459 mestiços apresentaram maior elevação da temperatura retal do que os zebuínos. Adicionalmente, os
460 zebuínos apresentaram maior expressão da proteína de choque térmico HSP90 do que os animais
461 mestiços, mostrando a importância dessa proteína na termoproteção (Deb *et al.*, 2014).

462 A faixa de temperatura que irá proporcionar o bem-estar para os animais varia de acordo
463 com a raça, peso, idade, estado fisiológico, condição nutricional e atividade produtiva. Para bovinos
464 de origem europeia (*Bos taurus taurus*) a zona de conforto térmico situa-se entre 0 e 16°C. O
465 consumo e produção de leite são afetados quando a temperatura ambiental é superior a 26°C, em
466 média. As raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) originaram-se de ambiente tropical e, por isso, vivem
467 confortavelmente em temperaturas entre 10 e 27°C, com temperatura crítica máxima de 35°C. Os
468 animais mestiços são capazes de produzir e reproduzir em ambientes com temperaturas variando
469 entre 5 e 31°C (Pereira, 2005).

470 As raças taurinas foram intensamente selecionadas para a produção de carne e leite em
471 comparação com zebuínos, no entanto, apesar de apresentarem alta eficiência produtiva eles não
472 estão bem adaptados aos ambientes tropicais, sofrendo uma redução mais acentuada no seu

473 potencial de produção nos trópicos em relação aos zebuínos. A reduzida fertilidade de vacas
474 leiteiras está relacionada com a pouca viabilidade dos embriões produzidos e com alterações no
475 trato genital materno durante o desenvolvimento embrionário inicial, traduzindo-se em morte
476 embrionária precoce e tardia (Al-Katanani *et al.*, 2002a; Hansen, 2011).

477 Os bovinos da subespécie zebuína são reconhecidos por sua rusticidade que, entre outros
478 aspectos, é caracterizada pela adaptabilidade a temperaturas ambientais elevadas. Isso é resultante
479 da produção reduzida de calor metabólico e maior capacidade de perda de calor para o ambiente
480 (Hansen, 2004). Considerando que a termorresistência é uma característica inerente à raça, a seleção
481 para resistência ao calor notavelmente foi ignorada nos últimos anos. Com isso, trabalhos recentes
482 têm demonstrado a redução da resistência dos animais da raça Gir ao calor ambiental excessivo
483 (Cardoso *et al.*, 2015; Santana Júnior *et al.*, 2015). Cardoso e colaboradores (2015) compararam a
484 resistência a estresse térmico por calor entre quatro raças zebuínas, Gir, Nelore, Sindhi e Indubrasil
485 e em mestiços Girolando. A raça Gir se mostrou a menos adaptada às condições climáticas em
486 todos os parâmetros avaliados (temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória) e, em contraste,
487 os animais Girolando e Sindhi apresentaram resposta fisiológicas mais adequadas a estresse térmico
488 por calor. Existe correlação genética inversa entre a produção de leite e a resistência ao calor. Foi
489 demonstrado que o período de maior produção de leite em vacas Gir (entre 60 e 120 dias em
490 lactação) coincide com o momento no qual esses animais são mais sensíveis à altas temperaturas
491 (Santana Júnior *et al.*, 2015).

492 Embriões zebuínos e taurinos produzidos *in vivo* apresentam diferenças nos mecanismos de
493 cavitação e acúmulo de líquidos que estão relacionados com a formação e expansão da blastocel.
494 Essas características podem estar relacionadas com as diferenças de viabilidade embrionária entre
495 as subespécies, após a exposição a condições estressantes como o choque osmótico de
496 criopreservação (Wohlres-Viana *et al.*, 2011). Em condições de estresse, como o estresse oxidativo,
497 por exemplo, embriões zebuínos da raça Gir respondem mais prontamente ao estresse produzindo
498 enzimas da família peroxiredoxina, quando comparados aos seus homólogos da raça Holandês,
499 reduzindo os possíveis efeitos prejudiciais quando estão em seu ambiente natural (Wohlres-Viana *et*
500 *al.*, 2011).

501

502

503

504 *Utilização da produção in vitro de embriões (PIVE) como modelo para estudar os efeitos*
505 *do estresse pelo calor em oócitos e embriões*

506 Nem sempre a utilização de animais vivos, em seu ambiente natural ou em ambientes
507 controlados, representa o melhor modelo de estudo. No caso do estudo do estresse térmico por calor
508 existem diversos fatores ambientais, fatores internos inerentes aos animais avaliados, e questões
509 técnicas ligadas ao desenho experimental que potencialmente causam viés nos resultados. O
510 desenvolvimento dos sistemas *in vitro* de produção de embriões bovinos representa uma ferramenta
511 importantíssima para estudar e melhor compreender os processos de maturação e fecundação
512 oocitária, desenvolvimento embrionário inicial e qualidade embrionária (Nagano, 2019). Diante
513 disso, os modelos *in vitro* são utilizados extensivamente para examinar efeitos deletérios das
514 temperaturas ambientais adversas sobre o desenvolvimento de oócitos e embriões bovinos.

515 De acordo com Roth e Hansen (2004b), danos causados a oócitos pelo choque térmico são
516 relevantes para compreender a redução da fertilidade causada pelo estresse térmico por calor *in*
517 *vivo*. Para testar a confiabilidade dos modelos de exposição de oócitos ao choque térmico,
518 Gendelman e Roth (2012) aspiraram oócitos de fêmeas bovinas nas estações de inverno e verão, e
519 compararam com a exposição de oócitos obtidos de matadouro, mantidos em estágio de vesícula
520 germinativa e submetidos a altas temperaturas *in vitro*. Os autores observaram que ambos modelos,
521 *in vivo* e *in vitro*, foram igualmente eficientes para estudar os efeitos do estresse térmico por calor,
522 pois tanto o número de embriões clivados quanto os demais parâmetros analisados foi semelhante
523 ($P>0,05$) nos dois modelos. O número de embriões de duas a quatro células, encontrado no inverno
524 no *in vivo*, e no cultivo a 38,5°C, no modelo *in vitro*, foi de $90,2 \pm 0,87\%$ e $85,0 \pm 3,1\%$,
525 respectivamente. Já no verão ou na incubação *in vitro* em temperaturas elevadas (41,2°C), o número
526 de embriões clivados foi de $78,2 \pm 2,2\%$ e $75,0 \pm 1,2\%$. Da mesma forma, em ambos modelos, *in*
527 *vivo* e *in vitro*, a exposição dos oócitos a temperaturas elevadas reduziu em 15% a porcentagem de
528 embriões clivados que se desenvolveram até o estágio de blastocisto. Foi encontrado ainda que a
529 abundância de transcritos de genes envolvidos na maturação oocitária e desenvolvimento
530 embrionário inicial (C-MOS, GDF-9, POU5F1 e GAPDH) foi superior em oócitos obtidos no
531 inverno ou submetidos à temperaturas convencionais de produção *in vitro* de embriões, quando
532 comparados a oócitos submetidos a estresse térmico por calor *in vivo* e *in vitro*.

533 A elevação da temperatura de cultivo *in vitro* de oócitos e embriões pode simular o estresse
534 térmico por calor moderado ou agudo, utilizando-se o binômio tempo X temperatura de 40°C por
535 uma hora, 41 ou 42°C por 80 minutos (Al-Katanani e Hansen, 2002b). O objetivo desse estudo foi
536 fazer exposição previa ao calor, sem afetar o desenvolvimento embrionário, para induzir a

537 termotolerância a estresse térmico por calor severo posteriormente (De Castro e Paula e Hansen,
538 2008). É possível simular estresse térmico por calor severo pela incubação de oócitos e embriões *in*
539 *vitro* a 41°C por 4, 5 e 6 horas (Al-Katanani e Hansen, 2002b), 9 horas (Paula-Lopes e Hansen,
540 2002; De castro e Paula e Hansen, 2008), 12 horas (Al-Katanani e Hansen, 2002b; Roth e Hansen,
541 2004a) e 16 horas (Gendelman e Roth, 2012), ou 43°C por 18 horas (Putney *et al.*, 1988).

542 Comparando-se a eficácia dos modelos *in vivo* e *in vitro* para avaliar os efeitos do estresse
543 térmico por calor sobre a produção e o desenvolvimento de embriões bovinos, Deb *et al.* (2014)
544 observaram que nos sistemas *in vivo* os efeitos deletérios da alta temperatura ambiental, sobre os
545 oócitos e embriões, foram observados a partir da temperatura ambiente de 37°C. Foi avaliado
546 temperatura retal de animais submetidos a temperaturas ambientais de 37, 39, 41 e 45°C,
547 encontrando-se temperatura retal média de 38,08 ± 0,34°C; 38,33 ± 0,34°C; 38,83 ± 0,31°C; 39,00 ±
548 0,29°C, para as respectivas temperaturas ambientais analisadas. *In vitro* as alterações puderam ser
549 observadas em temperaturas de incubação maiores ou iguais a 41°C, a partir desta temperatura
550 houve aumento significativo da expressão de RNAm para HSP90, e diminuição da viabilidade das
551 células expostas à alta temperatura de incubação (P<0,05).

552 Foi sugerido que o pré-cultivo *in vitro* dos CCOs com inibidores capazes de bloquear a
553 retomada da meiose pode ser utilizado para examinar os efeitos de vários estressores ambientais,
554 sobre oócitos em estágio de vesícula germinativa (Payton *et al.*, 2004), além de melhorar a
555 maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos, aumentando sua capacidade de desenvolvimento
556 (Eppig e Schroeder, 1989).

557

558 ***Maturação celular, citoplasmática e nuclear***

559 A maturação oocitária é um processo longo e complexo no qual ocorrem transformações no
560 gameta feminino, que são essenciais para a diferenciação do oócito, a fecundação e o
561 desenvolvimento embrionário inicial (Gilchrist *et al.*, 2008). Nas fêmeas bovinas a meiose tem
562 início na fase fetal, período no qual ocorre síntese de DNA e formação de pares de cromossomos
563 homólogos. Em seguida, os oócitos imaturos permanecem estacionados no estágio dictioto da
564 prófase I da meiose. O núcleo destes oócitos imaturos é denominado vesícula germinativa (VG),
565 estágio no qual o núcleo é mantido até pouco antes da ovulação, quando os gametas femininos são
566 estimulados a retomarem a divisão meiótica pelo pico de gonadotropinas (Bilodeau-Goeseels,
567 2012). Quando folículos pequenos, contendo oócitos imaturos, são estimulados a crescer, a
568 retomada da meiose até o estágio de metáfase II tem a duração de aproximadamente quatro dias

569 (Pavlok *et al.*, 1993).

570 A progressão da meiose é caracterizada por três eventos principais: 1) maturação nuclear no
571 qual os oócitos em vesícula germinativa são estimulados a retomarem a divisão meiótica, passando
572 de Prófase I para a Metáfase II; 2) maturação citoplasmática que é caracterizada pela redistribuição
573 das organelas citoplasmáticas, incluindo as mitocôndrias, e estocagem de RNAm que será utilizado
574 pós-fecundação e no início do desenvolvimento embrionário; e 3) maturação celular que está
575 associada ao desacoplamento das junções tipo *gap* entre o oócito e as células do *cumulus*,
576 resultando em maior espalhamento dessas células que é conhecido como expansão das células do
577 *cumulus* (Gottardi e Mingoti, 2009).

578 Quando o oócito é fisicamente retirado do folículo ovariano, a retomada da meiose ocorre
579 espontaneamente, independentemente de gonadotropinas, devido à ausência de fatores foliculares
580 inibidores deste processo. Em condições convencionais de maturação *in vitro*, a resolução da
581 meiose ocorre em um período mais curto do que o fisiológico durando, em média, 24 horas. Sabe-se
582 que altas concentrações intra-oocitárias de AMPc, que são acumuladas durante o crescimento e
583 desenvolvimento natural do folículo, estão associadas a oócitos com alta competência de
584 fecundação e sobrevivência embrionária subsequente (Luciano *et al.*, 1999). Por outro lado, após o
585 pico pré-ovulatório de LH ou a remoção mecânica do oócito do folículo ovariano, as concentrações
586 de AMPc são reduzidas gradativamente resultando na retirada do bloqueio da meiose (Richard e
587 Sirard, 1996). Além disso, de forma geral, a perda de interação do oócito com as células foliculares
588 resulta em prejuízos para a competência do oócito e para o desenvolvimento embrionário inicial,
589 decorrente da diminuição das trocas hormonais e moleculares realizadas entre as células foliculares
590 e o gameta.

591

592 ***Inibição da retomada da meiose em oócitos bovinos***

593 Estabelecer modelos *in vitro* para estudar os efeitos diretos da hipertermia materna sobre
594 oócitos em estágio de vesícula germinativa é um desafio, porque a remoção do oócito do folículo
595 antral induz a retomada espontânea da meiose (Pincus e Enzmann, 1935). A manutenção dos
596 ovários obtidos de matadouro em solução salina aquecida por 4 a 5 horas, antes da aspiração dos
597 CCOs, impede a retomada da meiose e melhora as taxas de blastocisto quando comparado à
598 obtenção dos oócitos imediatamente após a morte. Foi encontrado que deixar os CCOs nos ovários
599 por 4 a 5 horas resultou em taxa de produção de blastocistos de 51% e 41%, respectivamente,
600 enquanto que a aspiração após uma ou duas horas, decorridas do abate, produziu 29 e 18% de

601 blastocistos. Adicionalmente, o número de células embrionárias totais foi superior para os ovários
602 que permaneceram incubados em banho-maria por 4 horas. Porém, os ovários poderão ser mantidos
603 em temperatura de até 35°C, em solução salina, previamente à aspiração, e temperaturas superiores
604 afetam a qualidade e competência dos oócitos e a produção de embriões (Blondin *et al.*, 1997).

605 Foi hipotetizado que o impedimento da retomada da meiose, antes da maturação *in vitro*,
606 possibilitaria incremento na competência de desenvolvimento posterior. Por conseguinte, para
607 impedir o reinício voluntário da divisão meiótica é preciso manter altas concentrações intra-
608 oocitárias de AMPc (Conti *et al.*, 2012). Algumas estratégias farmacológicas podem ser utilizadas
609 para manter altas concentrações oocitárias de AMPc, impedindo a retomada da meiose.

610 Foi sugerido que o pré-cultivo *in vitro* dos CCOs com inibidores capazes de bloquear a
611 retomada da meiose pode melhorar a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos, aumentando
612 sua capacidade de desenvolvimento (Eppig e Schroeder, 1989). O bloqueio da retomada espontânea
613 da meiose também pode ser utilizado para examinar os efeitos de vários estressores ambientais
614 sobre oócitos em estágio de VG (Payton *et al.*, 2004).

615 Uma das possíveis abordagens farmacológicas para inibir o reinício da meiose após
616 aspiração dos folículos ovarianos é o cultivo prévio com 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX). O
617 IBMX mantém os oócitos na prófase I da meiose devido ao aumento da concentração de AMPc,
618 resultante da inibição da atividade da fosfodiesterase (Gendelman e Roth, 2012).

619 Dentre todas as drogas que podem ser utilizadas para o bloqueio da meiose, a Butirolactona I
620 (BUT-I) demonstrou ser a mais segura e eficiente (Gottardi e Mingoti, 2009). A BUT-I é um
621 inibidor seletivo de quinases dependentes de ciclina que promove o bloqueio da meiose por inibir
622 tanto a CDK1 quanto a CDC2 quinase. Este composto inibe a quebra da VG, porém, os oócitos
623 continuam sintetizando rRNA. A síntese de rRNA diminui apenas quando há compactação da
624 cromatina (Marques *et al.*, 2011). A Roscovitina (ROSCOV) é um derivado da purina, um inibidor
625 específico da quinase que forma o fator promotor da maturação (MPF), sendo utilizado para manter
626 oócitos bovinos em estágio de VG, quando em cultura por 24 horas. (Marques *et al.*, 2011).

627 Gendelman e Roth (2012) testaram quatro diferentes fármacos inibidores da meiose BL-I, R-
628 e S-Roscovitina e o 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), encontrando que o cultivo dos oócitos com
629 75µM de IBMX, por 16 horas, foi mais eficiente em manter os oócitos imaturos, de forma
630 reversível, e sem comprometer a clivagem e produção de embriões.

631 Visando melhorar a competência de oócitos nos programas de PIVE, foi realizada a pré-
632 maturação durante 24 horas com os inibidores da meiose ROSCOV (100µM) e ciclohexamida

633 (1µg/mL) e, em seguida, os CCOs foram submetidos à maturação *in vitro* por 22 horas. Nos CCOs
634 tratados com ROSCOV houve degeneração das células do *cumulus*, edema de mitocôndrias,
635 presença de poucos grânulos corticais e muitas vesículas contendo material eletro-denso.
636 Entretanto, no tratamento com ciclohexamida não ficaram evidentes sinais de degeneração ou
637 senescência celular. Apesar da ciclohexamida não ter afetado a maturação celular, neste trabalho
638 não foi avaliada a produção de embriões para verificar se a adição desta substância interfere na
639 qualidade e desenvolvimento dos embriões (Crocomo *et al.*, 2013).

640 Marques *et al.* (2011) avaliaram a maturação e o desenvolvimento embrionário de oócitos
641 bovinos que tiveram a maturação bloqueada com BL-1 e ROSCOV. Os autores observaram que a
642 BL-1, na concentração de 150µM, foi eficiente em manter os oócitos em estágio de VG durante as
643 24 horas de cultivo pré-maturação e, após a maturação, o número de oócitos que chegaram a
644 metáfase II foi semelhante ao grupo controle. Além disso, o número de embriões produzidos
645 também foi semelhante ao grupo controle. Porém, o mesmo não ocorreu com a ROSCOV que
646 apresentou menores índices de maturação oocitária e de desenvolvimento embrionário.

647 Maziero (2019) adicionou a BUT-I e roscovitina (ROSCOV) ao meio de maturação de
648 oócitos bovinos para bloquear temporariamente a retomada da meiose. Foi observado que o
649 bloqueio da meiose por 6 horas, seguido de 18 horas de maturação, utilizando-se para o bloqueio a
650 BUT-I na concentração de 50µM ou com a associação de BUT-I (25µM) e ROSCOV (6,25 µM),
651 foi eficiente em promover o bloqueio reversível da meiose nos oócitos e incrementou a produção
652 embrionária. Também, promoveu a diminuição do número de células apoptóticas. O bloqueio da
653 meiose pela BUT-I na concentração de 50µM, por 12 horas, não alterou a qualidade dos embriões
654 produzidos em relação ao controle e produziu taxas satisfatórias de blastocistos. Gendelman e Roth
655 (2012) também encontraram que a pré-maturação com 50µM e 75µM não alterou a qualidade e a
656 quantidade de embriões produzidos.

657 Apesar de muitos trabalhos utilizarem a BL-1 na concentração de 100µM no meio de
658 maturação, foi observado que quando o meio de maturação é suplementado com soro fetal bovino
659 (SFB), ao invés de albumina sérica bovina (BSA), a concentração de 150µM se mostrou mais
660 adequada para a inibição por 24 horas. Isso porque em meios contendo SFB ocorre perda parcial da
661 BL-1 por ligação a alguns componentes do soro (Marques *et al.*, 2011). Dentre todas as drogas que
662 podem ser utilizadas para o bloqueio da meiose, a BL-1 demonstrou ser a mais segura e eficiente
663 (Gottardi e Mingoti, 2009).

664 A oogênese é um processo longo levando, em média, 16 semanas para que os folículos
665 primordiais cresçam e se desenvolvam até se tornarem folículos antrais pré-ovulatórios. Já foi

666 observado que as altas temperaturas ambientais alteram a competência de oócitos imaturos, inclusos
667 nos folículos ovarianos, porém, ainda não está bem estabelecido a partir de qual momento o EC
668 pode interferir no crescimento e na qualidade dos oócitos (Hansen, 2013).

669 A exposição de oócitos em estágio de vesícula germinativa a 41,2°C por 16 horas reduziu a
670 clivagem e o desenvolvimento de oócitos até o estágio de blastocisto, em relação ao grupo controle,
671 cultivado a 38,5°C. Para os oócitos coletados no inverno, ou para aqueles mantidos em estado de
672 vesícula germinativa pela adição de fármacos inibidores da meiose ao meio de maturação e
673 submetidos ao estresse térmico por calor, houve redução da abundância de transcritos dos genes C-
674 MOS, GDF9, GAPDH, e POU5F1, que são genes envolvidos na maturação oocitária e no
675 desenvolvimento embrionário inicial (Gendelman e Roth, 2012).

676 Torres-Júnior *et al.* (2008) mantiveram cinco fêmeas bovinas da raça Gir em câmara
677 climatizada a 38°C e 80% de umidade relativa durante o dia, e 30°C durante a noite por 28 dias. Os
678 autores não verificaram efeitos imediatos do estresse térmico por calor sobre as funções
679 reprodutivas, porém, tardiamente (entre 1 e 21 dias após o estresse induzido), foram observados
680 efeitos deletérios no crescimento folicular ovariano, nas concentrações hormonais de progesterona,
681 na competência dos oócitos, e na produção de embriões. Houve, ainda, aumento no diâmetro do
682 primeiro e segundo maiores folículos, aumento de incidência de anestro e de ciclos estrais curtos.

683 Para estudar os efeitos das altas temperaturas ambientais em oócitos imaturos, vacas
684 Holandesas não lactantes foram mantidas em ambiente aberto com sombrite (n=14) durante 42 dias
685 no verão, em ambiente fechado com ventiladores e nebulizadores (n=14) ou em ambiente aberto
686 com sombrite durante o inverno (n=12). O tempo de 42 dias foi escolhido, pois representa o tempo
687 decorrido entre o crescimento do folículo antral inicial até o folículo dominante pré-ovulatório.
688 Entretanto, foi encontrado que nenhuma das estratégias de resfriamento, antes da aspiração dos
689 CCOs, durante os 42 dias de verão incrementaram a produção de embriões no verão, mostrando que
690 ou o EC prejudica o crescimento de folículos pré-antrais, ou que a diminuição sazonal da fertilidade
691 está ligada a outros fatores além do estresse térmico por calor (Al-Katanani *et al.*, 2002c).

692 O efeito da temperatura ambiental elevada em folículos pré-antrais ainda é menos conhecido
693 do que em folículos antrais em estágio de vesícula germinativa, porém, recentemente foi
694 demonstrado que os folículos pré-antrais são menos sensíveis ao estresse térmico por calor do que
695 os folículos antrais. Paes *et al.* (2016) incubaram fragmentos ovarianos, folículos pré-antrais
696 isolados, e CCOs a 41°C durante 12 horas para avaliar o efeito do EC sobre oócitos imaturos e
697 durante a maturação. Não foi observado nenhum efeito das altas temperaturas sobre os folículos

698 pré-antrais, entretanto houve alteração da oogênese e diminuição da produção de estrógeno em
699 CCOs estressados ($P < 0,05$).

700

701 *Alteração da expressão gênica de oócitos e embriões expostos a estresse térmico por calor*

702 Os bovinos, assim como outros animais homeotérmicos, são capazes de controlar sua
703 temperatura corporal interna pela troca de calor com o ambiente. Para auxiliar nas trocas de calor,
704 vários mecanismos celulares são ativados, e um destes mecanismos é a alteração da expressão de
705 genes relacionados com o estresse (Deb *et al.*, 2014).

706 Atualmente, estão sendo identificados alguns genes relacionados com o aumento da
707 sobrevivência após a transferência dos embriões produzidos *in vitro*. Os alelos FGF2 e STAT5A de
708 origem paterna foram relacionados com o aumento da qualidade embrionária (Khatib *et al.*, 2010).
709 Também foi encontrado que a expressão dos genes de origem materna GHR, PGR, PRLR e
710 SERPINA14 estão relacionados com aumento da capacidade de desenvolvimento de embriões
711 (Khatib *et al.*, 2008).

712 A resposta a estresse térmico por calor e a aquisição de termotolerância pelas células
713 submetidas a algum tipo de estresse envolve a síntese de moléculas citoprotetoras, como as
714 proteínas de choque térmico (HSPs). Nos mamíferos, a resposta ao estresse inclui alteração de
715 expressão gênica regulada pelo fator de transcrição de choque térmico (HSF), com uma rápida
716 indução de transcrição de HSPs, em uma grande variedade de células e tecidos. O gene HSF1 é
717 essencial para a resposta ao choque térmico, além de ser necessário para o desenvolvimento
718 adequado de embriões (Akerfelt *et al.*, 2007). Adicionalmente, o gene HSF1 também é fundamental
719 para a manutenção da integridade celular durante o estresse, o que pôde ser comprovado em ratos
720 com células *knock-out* para o gene HSF1, que perderam a habilidade de produzir HSPs (Zhang *et*
721 *al.*, 2002).

722 As HSPs são proteínas moleculares auxiliares que, quando são submetidas a vários tipos de
723 estresse, como o calor excessivo, por exemplo, são sintetizadas em quantidade maior do que o
724 normal. As HSPs estão envolvidas na remodelagem de proteínas desnaturadas e manutenção da
725 estrutura da proteína submetida ao estresse. As proteínas do choque térmico podem ser divididas em
726 três grupos, com funções ligeiramente diferentes: HSP60, HSP70 e HSP90. As HSP60 agem sobre
727 proteínas prontas que apresentem erros na estrutura terciária e, portanto, a função desse grupo de
728 HSP é o controle de qualidade. A HSP70 ajuda no enovelamento de proteínas celulares para
729 impedir que proteínas malformadas causem danos às células (Aggarwal e Upadhyay, 2013). A

730 HSP70 pode ser produzida em maior quantidade em células submetidas a estresse térmico por calor
731 induzido e, nesse caso, denomina-se HSP70i (Edwards e Hansen, 1997). As HSP90 atuam na
732 transdução de sinais, na manutenção da estrutura das proteínas, e na degradação de proteínas
733 alteradas. Este último grupo de proteínas também apresenta duas isoformas, uma constitutiva e a
734 outra induzível (Deb *et al.*, 2014).

735 Os principais genes envolvidos na ativação das HSPs em embriões são HSPA1A para a
736 HSP70, e HSP90AA1 para a HSP90 classe A1 (Stewart *et al.*, 2011). A expressão da proteína
737 HSP70 também pode ser regulada pelo gene HSPA1L (Ortega *et al.*, 2016). Durante a indução do
738 choque térmico pela incubação de zigotos, embriões de duas células, e mórulas a 40°C por 24 horas
739 houve aumento da expressão do gene HSPA1A, mas não de HSP90AA1 (Stewart *et al.*, 2011).

740 El-Sayed *et al.* (2006) identificaram grupos de genes relacionados com a sobrevivência
741 embrionária utilizando embriões produzidos *in vitro* que, quando transferidos para receptoras, não
742 produziram gestação ou levaram à gestação mas foram reabsorvidos em comparação com àqueles
743 relacionados a gestações bem sucedidas. Seis genes apresentaram maior expressão nos embriões
744 que resultaram em gestação, quando comparados aos embriões reabsorvidos, sugerindo que estes
745 genes podem ter papel fundamental no desenvolvimento inicial e na implantação dos embriões.
746 Dentre estes genes, pode-se citar o IFN-tau, CDX-2, PLAC8 e COX-2. O INF-tau é uma proteína
747 sinalizadora produzida pelo embrião para bloquear a regressão do corpo lúteo, por meio da redução
748 da secreção pulsátil de prostaglandina F_{2α}. O CDX-2 e o PLAC-8 são genes fundamentais para
749 implantação embrionária, estabelecimento da interação mãe-feto, e desenvolvimento da placenta.
750 Com função semelhante, o gene COX-2, produzido apenas pelas células do trofoblasto, está
751 relacionado com o alongamento embrionário e implantação. Avaliar a alteração na quantidade de
752 transcritos para genes relacionados com manutenção de altas taxas de concepção e sobrevivência
753 embrionária em oócitos e embriões expostos a estresse térmico por calor pode auxiliar na predição
754 da resistência destes à hipertermia materna.

755 Sakatani *et al.* (2012) mensuraram alterações na expressão de genes envolvidos no choque
756 térmico e no estresse oxidativo para determinar se os zigotos são mais suscetíveis ao choque
757 térmico devido à capacidade reduzida de transcrição. Foi encontrado que o choque térmico
758 aumentou as quantidades de RNAm para HSPA1A, mas não para HSP90AA, SOD1 ou CAT, estes
759 últimos dois genes estão relacionados com o estresse oxidativo. O aumento da expressão do gene
760 HSPA1L em zigotos expostos ao choque térmico foi associado a embriões mais sensíveis a estresse
761 térmico por calor, enquanto que a mutação de deleção no promotor de HSPA1L confere proteção ao
762 zigoto contra choque térmico (Ortega *et al.*, 2016). Camargo *et al.* (2019) também encontraram

763 aumento da expressão de HSPA1A em embriões produzidos a partir de oócitos submetidos ao
764 choque térmico. Embriões bovinos expostos ao choque térmico também apresentam alteração na
765 expressão do gene IFNT que regula a produção de interferon-tau (Hikman *et al.*, 2013).

766 A identificação de genes em indivíduos ou raças termotolerantes possibilita que,
767 futuramente, por meio de engenharia genética, esses genes sejam introduzidos em populações mais
768 sensíveis a altas temperaturas ambientais. Foi encontrado que o haplótipo SLICK encontrado com
769 alta frequência em bovinos da raça Senepol confere maior habilidade de regular a temperatura
770 corporal durante o estresse térmico por calor (Dikmen *et al.*, 2014).

771

772 ***Fragmentação de DNA no embrião***

773 As duas primeiras semanas pós-inseminação representam o período mais crítico para a
774 manutenção da gestação em bovinos, pois é o período no qual a porcentagem de perdas
775 embrionárias é mais elevada (Diskin *et al.*, 1980; Hansen, 2011; Spencer, 2013). O período pré-
776 implantação embrionária parece ser o mais sensível aos danos celulares, uma vez que após o fim do
777 estágio embrionário, ocorre redução significativa das perdas gestacionais (King, 1991; Hansen,
778 2011).

779 A avaliação do número de blastômeros, em morte celular programada, é um critério
780 amplamente utilizado para avaliar a qualidade embrionária (Gutiérrez *et al.*, 2012). A morte celular
781 pode ser total (necrose), que resulta na eliminação do embrião inteiro em casos de exposição a
782 estresse severo, ou parcial, caracterizada pela eliminação seletiva de blastômeros danificados,
783 possibilitando que as células remanescentes continuem seu desenvolvimento, sendo esse evento
784 conhecido como apoptose (Betts e King, 2001). Destaca-se que a apoptose é um importante
785 mecanismo de defesa celular, visto que a inibição do processo de remoção de células danificadas
786 reduz o desenvolvimento embrionário (Antunes *et al.*, 2009).

787 A apoptose, ou morte celular programada é um processo fisiológico ativo que pode ser
788 natural ou induzido por estressores ambientais, caracterizada pela condensação da cromatina,
789 redução do volume celular, formação de vesículas ou fragmentos conhecidos como corpos
790 apoptóticos, o que resulta na eliminação das células ou de todo tecido danificado (Betts e King,
791 2001). O estudo da fragmentação do DNA nuclear é um marcador bioquímico de apoptose em
792 vários tipos celulares e é amplamente utilizado para quantificação de morte celular em blastômeros
793 de embriões bovinos. O ensaio de *Terminal deoxinucleotil transferase mediated uracil nick end*

794 *labeling* (TUNEL) possibilita a confirmação *in situ* da fragmentação do DNA nuclear em
795 blastocistos bovinos (Neuber *et al.*, 2002).

796 Acredita-se que os blastocistos com maior número de células são mais propensos à
797 implantação, evoluindo para gestação bem sucedida e que culmina no nascimento de maior número
798 de descendentes vivos (Van Soom *et al.*, 1997). Por outro lado, blastocistos com número reduzido
799 de células têm incidência variável de fragmentação do DNA que, quando excede determinado
800 limiar, é prejudicial para o desenvolvimento embrionário (Hardy, 1999), resultando na eliminação
801 do conceito não-viável (Byrne *et al.*, 1999). Em embriões no estágio de blastocisto, as células que
802 sofrem apoptose são extrusadas na blastocele (Betts e King, 2001) ou no espaço perivitelínico
803 (Hardy, 1999), entre o trofoblasto e a zona pelúcida. Portanto, na avaliação microscópica, a
804 presença de células extrusas no espaço perivitelínico, indica que o embrião possui um número
805 elevado de células mortas e está relacionada com embriões de qualidade moderada a baixa
806 (Stringfellow e Givens, 2010).

807 A incidência de morte celular pode ser modulada por fatores ambientais, tal como o calor
808 excessivo (Betts e King, 2001). O estresse térmico por calor induz a apoptose e necrose celular,
809 mediado pela via mitocondrial de morte celular, na qual se observa diminuição da proporção Bcl-
810 2/Bax, diminuição do potencial de membrana e edema mitocondrial, aumento acentuado da
811 atividade de caspase-3 e danos ao DNA (Du *et al.*, 2008).

812

813 ***Avaliação morfológica de embriões***

814 Algumas características morfométricas de oócitos e embriões são utilizadas para avaliar a
815 qualidade e prever a capacidade de desenvolvimento dos mesmos. No manual da Sociedade
816 Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) estão algumas recomendações para classificação
817 de oócitos e embriões, baseado em características do ooplasma, no número de camadas de células
818 do *cumulus* que envolvem os oócitos, na presença de granulações ou vacúolos citoplasmáticos, na
819 morfologia dos blastômeros embrionários, na compatibilidade com a fase de desenvolvimento,
820 presença de células extrusas no espaço perivitelínico, entre outras características, sendo considerado
821 um método não invasivo de avaliação da qualidade embrionária (Stringfellow e Givens, 2010).

822 Alterações morfológicas e cromossômicas, que ocasionam anormalidades no
823 desenvolvimento embrionário ou disfunções placentárias, são as principais causas de perdas
824 embrionárias (Tveden-Nyborg *et al.*, 2005; Alexopoulos *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). Alguns
825 autores realizaram avaliações da ultraestrutura de oócitos e embriões bovinos visando explorar,

826 minunciosamente, a estrutura e algumas organelas celulares, na tentativa de explicar falhas para
827 atingir o estágio de blastocisto ou completar a fase embrionária (Fair *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*,
828 2012, 2015; Cavusoglu *et al.*, 2016).

829 Comparando-se embriões bovinos produzidos por diferentes técnicas (*in vivo*, *in vitro*,
830 transferência nuclear de células somáticas e partenogênese), Oliveira e colaboradores (2015)
831 encontraram que embriões de transferência nuclear ou partenogênese são menores, apresentam
832 morfologia anormal da massa celular interna, e suas organelas responsáveis pelos processos de
833 absorção, comunicação, crescimento e metabolismo celular, além de serem mais escassas,
834 apresentavam formato alterado, indicando que esses embriões não deverão apresentar
835 desenvolvimento normal. Já, os embriões produzidos *in vitro* não apresentaram alterações
836 morfológicas significativas, exibindo características microscópicas semelhantes aos embriões
837 produzidos naturalmente no trato reprodutivo da fêmea bovina.

838 A exposição de embriões a alguma fonte de estresse pode afetar de forma adversa a
839 qualidade embrionária, interferindo com a viabilidade dos mesmos. Os embriões bovinos
840 produzidos *in vivo* apresentam características estruturais que conferem a eles maior resistência a
841 crioprotetores e a criopreservação, em comparação com embriões produzidos *in vitro*. Após o
842 descongelamento, embriões produzidos *in vitro* apresentaram aumento do espaço perivitelínico,
843 com inúmeras vesículas presentes nesse espaço, diminuição de microvilosidades e de junções
844 intercelulares, aumento de vacúolos nas células do trofoblasto, e de gotas lipídicas intracelulares e
845 extrusas no espaço perivitelínico. Essas anormalidades justificam a maior sensibilidade desses
846 embriões à criopreservação (Fair *et al.*, 2001). Comparando-se ainda as técnicas de criopreservação
847 embrionária de vitrificação ou congelamento lento, na avaliação por microscopia eletrônica de
848 transmissão o congelamento lento resultou em aumento de degeneração mitocondrial, diminuição
849 da integridade das membranas nuclear e citoplasmática, redução da espessura e integridade da zona
850 pelúcida e danos ao citoesqueleto (Cavusoglu *et al.*, 2016).

851 As mitocôndrias são organelas dinâmicas que variam em quantidade e morfologia em
852 condições naturais de acordo com seu grau de maturidade ou nas diferentes fases do ciclo celular.
853 Condições anormais também ocasionam alterações mitocondriais, afetando não só a estrutura como
854 também a funcionalidade destas organelas (Youle e Karbowski, 2003).

855 O calor excessivo também é uma fonte de estresse que potencialmente gera danos à estrutura
856 de gametas e embriões. Dentre as alterações ultraestruturais resultantes da hipertermia que podem
857 ser encontradas nas células destaca-se cromatina condensada na periferia da borda nuclear, presença

858 de corpos apoptóticos, mitocôndrias edemaciadas e com vacúolos, presença de lisossomos próximos
859 às mitocôndrias e diminuição de retículo endoplasmático rugoso (Du *et al.*, 2008).

860

861 *Alterações no metabolismo lipídico de oócitos e embriões expostos a estresse térmico por* 862 *calor*

863 Os oócitos e embriões bovinos possuem a particularidade de apresentarem reservas
864 endógenas de substratos para produção de ATP, característica que garante vantagens na capacidade
865 de se desenvolverem em sistemas *in vitro*, em meios de cultivo relativamente simples. Em tese, o
866 gameta feminino e o conceito bovino possuem dois tipos de estoques energéticos, o glicogênio e os
867 lipídeos, porém, a concentração de glicogênio parece ser quase insignificante e é pouco descrita na
868 literatura (Thompson *et al.*, 1995; Sturme *et al.*, 2009). Os triglicerídeos representam a fonte mais
869 abundante de precursores energéticos para o desenvolvimento de embriões bovinos (Sturme *et al.*,
870 2009).

871 A densidade lipídica nos oócitos varia de acordo com a espécie. Em oócitos bovinos a
872 densidade é alta, comparado com outras espécies (Ferguson e Leese, 1999). A concentração de
873 ácidos graxos diminui gradativamente durante o crescimento e amadurecimento do oócito, bem
874 como no desenvolvimento embrionário inicial. A presença de estoques citoplasmáticos de lipídeos
875 em oócitos e embriões, pré-ativação do genoma embrionário, é uma importante fonte de energia,
876 visto que a adição do cofator de β -oxidação L-carnitina aumenta a produção de ATP e o
877 desenvolvimento embrionário (Sutton-McDowall *et al.*, 2012), ao passo que o bloqueio da enzima
878 mitocondrial palmitoiltransferase A reduz a capacidade de formação de blastocistos (Ferguson e
879 Leese, 2006). Em bovinos, a diminuição do estoque de lipídeos ao longo do desenvolvimento pode
880 ser explicada pelo aumento da concentração de lipase com a progressão da maturação (Ferguson e
881 Leese, 1999).

882 A qualidade do oócito determina o sucesso do desenvolvimento embrionário subsequente
883 (Eppig *et al.*, 1989; Hansen, 2002). Oócitos com citoplasma escuro (marrom) indica acúmulo de
884 estoque de lipídeos, que está associado a um bom potencial de desenvolvimento, enquanto
885 ooplasma pálido está associado à baixa densidade de organelas e potencial de desenvolvimento
886 reduzido (Nagano, 2019). Já em embriões, o aumento da concentração intracitoplasmática de
887 lipídeos é inversamente proporcional à qualidade dos mesmos. Na ausência do soro fetal bovino
888 (SFB), o conteúdo de triglicerídeos é semelhante entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, sendo
889 relativamente constante do estágio de duas células até blastocisto eclodido (Ferguson e Leese,

890 1999). Em embriões produzidos *in vitro*, a presença de SFB nos meios de cultivo foi associada ao
891 aumento da deposição lipídica no citoplasma embrionário (Ferguson e Leese, 1999; Abe *et al.*,
892 2002). Anormalidades no metabolismo energético embrionário também podem afetar a densidade
893 citoplasmática de lipídeos (Ferguson e Leese, 2006). Portanto, a quantificação dos estoques de
894 triglicerídeos intracitoplasmáticos pode prever tanto a qualidade quanto a taxa metabólica de
895 embriões bovinos.

896 Comparando-se o metabolismo de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, embriões
897 produzidos *in vivo* apresentam taxa metabólica mais baixa e alta capacidade de defesa antioxidante,
898 evidenciada pela menor produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). No caso de embriões
899 produzidos em sistemas *in vitro* contendo SFB, além do maior acúmulo de triglicerídeos, ocorre
900 desequilíbrio nos processos de oxi-redução prejudicando a função mitocondrial durante a β -
901 oxidação de complexos lipídicos (Abe *et al.*, 2002). Há também maior produção de lactato pelo
902 aumento do metabolismo glicolítico, em detrimento da β -oxidação, e maior produção de ERO
903 (Leese, 2002).

904 O estresse oxidativo é um termo utilizado para caracterizar a situação na qual a produção de
905 ERO, popularmente conhecidos como radicais livres, supera a capacidade das substâncias
906 antioxidantes de neutralizar e eliminar o excesso dos mesmos (Crocomo *et al.*, 2012; Agarwal *et al.*,
907 2014). As EROs são moléculas derivadas do oxigênio que aparecem como metabólitos da
908 respiração celular e, portanto, estão presentes em todos os tipos de células. As moléculas de ERO
909 possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita mais externa e, por isso, são altamente
910 instáveis e reativos. Dessa forma, quando entram em contato com outras moléculas, elas tendem a
911 remover elétrons da mesma para estabilizar sua carga. Consequentemente, quando uma ERO é
912 neutralizada, a molécula que perdeu um elétron torna-se um radical livre, gerando uma reação em
913 cadeia de auto-propagação de ERO. Em condições fisiológicas, as ERO e os antioxidantes
914 encontram-se em situação de equilíbrio e são importantes para diversas funções do organismo como
915 maturação oocitária, esteroidogênese, na manutenção da motilidade espermática, nas funções do
916 corpo lúteo, no funcionamento do sistema imune, e em alguns mecanismos de sinalização celular.
917 Entretanto, níveis excessivos de ERO, causados pelo aumento da produção de ERO e/ou pela
918 redução da disponibilidade de antioxidantes, impactam negativamente a função reprodutiva
919 (Agarwal *et al.*, 2005). À medida que as ERO continuam a reagir com outras moléculas, essas
920 moléculas sofrem modificações funcionais e estruturais que incluem peroxidação lipídica,
921 alterações mitocondriais, desnaturação proteica, bloqueio no desenvolvimento embrionário,
922 diminuição da motilidade espermática, danos ao fuso meiótico, esgotamento de ATP e apoptose

923 celular (Agarwal *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2014). Existem alguns fatores que predisõem a
924 ocorrência do estresse oxidativo, tal como a nutrição inadequada e a exposição dos animais a fatores
925 estressantes (Andrade *et al.*, 2010).

926 A avaliação da atividade mitocondrial possibilita a mensuração do metabolismo de oócitos e
927 embriões, pois as mitocôndrias são as organelas responsáveis pela metabolização da maior parte do
928 oxigênio demandado pelas células (Chance *et al.*, 1979). A atividade mitocondrial sofre alteração
929 sob efeito do choque térmico, devido à sensibilidade da cadeia respiratória a temperaturas elevadas,
930 resultando em diminuição do fluxo de elétrons, redução da respiração e, conseqüentemente, da
931 produção de ATP (Pobezhimova *et al.*, 1996). Além disso, o estresse térmico por calor desencadeia
932 aumento descontrolado na produção de ERO, resultando em alteração na estrutura de proteínas
933 (Stadtman *et al.*, 2000), lipídeos (Rubbo *et al.*, 1994), DNA (Richter *et al.*, 1988 retirado de Slimen
934 *et al.*, 2014) e ativação da via intrínseca da apoptose (Slimen *et al.*, 2014).

935 Em células submetidas a estresse térmico por calor, o aumento da produção de ERO causa
936 modificações inespecíficas na estrutura de lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos,
937 resultando em disfunção no metabolismo energético celular (Slimen *et al.*, 2014). O estresse
938 térmico por calor também induz ao aumento da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados,
939 aumentando a concentração de malonaldeído, produto do metabolismo lipídico, tanto no citosol
940 quanto no plasma sanguíneo (Mujahid *et al.*, 2007). Existem poucos trabalhos que avaliaram o
941 efeito do estresse térmico por calor no metabolismo intracitoplasmático de ácidos graxos em oócitos
942 e embriões pré-implantação. Faylon *et al.* (2015) demonstraram que o estresse térmico por calor
943 tem efeito direto na alteração da regulação tanto da lipólise quanto da lipogênese em adipócitos.

944

945 ***Estratégias para mitigação do efeito do estresse térmico por calor:***

946 ***1- Resfriamento de instalações***

947 Para amenizar os efeitos adversos oriundos da exposição à temperatura ambiente excessiva,
948 a modificação do ambiente físico onde as vacas vivem ou permanecem durante a maior parte do dia
949 é considerada a principal estratégia de mitigação do estresse térmico por calor. Existem dois tipos
950 básicos de estratégias para melhorar o conforto ambiental nos sistemas de criação de bovinos: (1)
951 modificações no ambiente para reduzir a intensidade de calor incidente; ou (2) métodos que
952 aumentem a taxa de resfriamento evaporativo ou a troca de calor por convecção (Fournel *et al.*,
953 2017).

954 A redução da radiação solar direta sobre os animais, pela disponibilização de área de
955 sombreamento natural ou artificial, é a alteração mais simples e barata de proteção contra a
956 hipertermia (Veissier *et al.*, 2018). Entretanto, a efetividade desse método é limitada já que não
957 interfere com a temperatura e umidade relativa do ar (West, 2003; Renaudeau *et al.*, 2012).

958 Em galpões de confinamento é possível promover a diminuição das temperaturas ambiental
959 e corporal com a associação de sombra, ventiladores e nebulizadores. Quando combinada com a
960 movimentação do ar, a água pode aumentar a capacidade de resfriamento da vaca (Fournel *et al.*,
961 2017).

962 No entanto, as estratégias de resfriamento de instalações ainda apresentam eficiência
963 limitada e, apesar de reduzirem os valores do índice de temperatura e umidade (ITU) e da
964 temperatura retal (Chen, *et al.*, 2016), nota-se que a fertilidade animal ainda diminui nos meses
965 mais quentes do ano, e as falhas na concepção se estendem por vários meses após as condições
966 ambientais ficarem mais amenas (Rodrigues *et al.*, 2010; Baumgard e Rhoads, 2012). Além disso, a
967 adoção dessa modalidade de resfriamento demanda investimento financeiro mais elevado, estando
968 associado ainda com maior ou menor grau de desperdício de água (Fournel *et al.*, 2017).

969 Flamenbaum e Galon (2010) compararam taxa de concepção e a produção de leite no
970 inverno e verão, em grupos com diferentes estratégias de resfriamento: intensivo (7,5 horas de
971 resfriamento/dia), moderado (4,5 horas/dia) e não resfriado (0 hora/dia). Vacas submetidas ao
972 manejo de resfriamento intensivo obtiveram produção de leite semelhantes no verão e no inverno; já
973 em relação a taxa de concepção foi encontrado 56% de concepção no inverno e 33,8% no verão, sob
974 o mesmo sistema de resfriamento; vacas com resfriamento moderado tiveram produção de leite
975 verão/inverno de 96%, e taxa de concepção no inverno de 53% e no verão 34,5%; vacas que não
976 foram resfriadas tiveram produção de leite verão/inverno 90%, e taxa de concepção no inverno de
977 54% e no verão de 15%.

978 Al-Katanani *et al.* (2002c) utilizaram estratégias de resfriamento para aumentar o conforto das
979 vacas durante 42 dias, previamente à coleta de oócitos para produção de embriões. Após esse
980 período, aspiraram oócitos desses animais e compararam a competência dos mesmos com oócitos
981 de animais submetidos a estresse térmico por calor. Os autores observaram que apesar da redução
982 da temperatura retal nos animais resfriados, não houve benefício do resfriamento na produção de
983 embrião, quando comparado com o grupo de animais estressados.

984

985

986

2- Antioxidantes

987 As espécies reativas de oxigênio (ERO) são neutralizadas por um eficiente sistema de defesa
988 que é constituído por antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Esse sistema deverá neutralizar
989 e eliminar o excesso de ERO, para evitar que esses causem efeitos nocivos ao organismo, mas, ao
990 mesmo tempo, deve manter quantidade fisiológica dos mesmos e reparar as lesões provocadas pelos
991 metabólitos oxidativos (Andrade *et al.*, 2010; Crocomo *et al.*, 2012; Agarwal, *et al.*, 2014). Os
992 antioxidantes enzimáticos são os antioxidantes naturais que, além de neutralizar as ERO, previnem
993 os danos causados por eles. O sistema antioxidante enzimático é composto pelas enzimas
994 superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutathione (GSH) e glutathione
995 peroxidase (GPx) (Andrade *et al.*, 2010). Já o sistema não enzimático é constituído por
996 antioxidantes sintéticos ou àqueles consumidos na dieta (Agarwal *et al.*, 2005). Esse sistema
997 enzimático atua tanto na eliminação do agente oxidante, quanto na reparação das lesões causadas
998 por eles. Fazem parte desse grupo vários compostos como vitamina C, vitamina E, selênio,
999 coenzima Q10, ácido lipóico e muitos outros antioxidantes naturais (Andrade *et al.*, 2010; Crocomo
1000 *et al.*, 2012; Hansen, 2013; Agarwal, *et al.*, 2014).

1001 A elevação da temperatura pelo calor aumenta o metabolismo celular, intensificando a
1002 produção de ERO ou radicais livres (Hansen, 2013). *In vivo*, os oócitos e embriões estão protegidos
1003 do estresse oxidativo pela presença de antioxidantes naturais no fluido folicular e na tuba uterina.
1004 Entretanto, nos sistemas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) a ocorrência do estresse oxidativo
1005 é favorecida pela alta tensão de oxigênio, associada à exposição prolongada a ambientes muito
1006 iluminados, à presença de espermatozoides e a ausência de proteção antioxidante materna
1007 (Crocomo *et al.*, 2012). Portanto, cuidados especiais, como a adição de antioxidantes ao meio de
1008 cultivo, devem ser tomados para evitar que o estresse oxidativo ocorra e reduza a eficiência da
1009 produção de embriões (Wang *et al.*, 2002).

1010 Algumas moléculas podem funcionar como antioxidantes em determinadas condições, e
1011 como pró-oxidantes em outras condições (Gutteridge e Halliwell, 2010). Além disso, alguns
1012 antioxidantes adicionados aos meios de PIVE são instáveis, exigindo, portanto, administrações
1013 periódicas ao meio de cultivo para conferir proteção contínua dos oócitos e embriões às ERO
1014 (Hansen, 2013). A avaliação de novas substâncias existentes na natureza com características
1015 antioxidantes, como moléculas extraídas de vegetais, por exemplo, pode contribuir para melhorar
1016 fertilidade animal. Entretanto, estas novas substâncias geralmente apresentam propriedades
1017 complexas e, portanto, são necessários mais estudos para estabelecer a concentração ideal e o
1018 melhor momento de adição (Hansen, 2013).

1019 O ditioneitol (DTT) extraído da batata-doce roxa é uma antocianina com ação antioxidante e
1020 forte ação redutora. Ele possui dois grupos tiol para realizar reações de permuta sequenciais de tiol-
1021 dissulfeto para eliminação das ERO, bem como regenerar a glutatona oxidada (GSSG) em
1022 glutatona reduzida (GSH). O DTT, na concentração de 500µM, incrementou a resistência de
1023 embriões de duas células cultivados em altas temperaturas e elevada concentração de oxigênio, mas
1024 não foi capaz de conferir a mesma proteção para embriões com mais de 16 células (De Castro e
1025 Paula e Hansen, 2008).

1026 A astaxantina é um carotenoide lipossolúvel derivado do óleo de peixe. A ação antioxidante
1027 da astaxantina em bloquear a peroxidação lipídica e eliminar os radicais peroxil é cerca de duas
1028 vezes maior que o β-caroteno e a vitamina E. A adição da astaxantina aos meios de PIVE melhorou
1029 o desenvolvimento embrionário, em resposta a estresse térmico por calor, por alterar a expressão
1030 dos genes SHC1 e SOD2, relacionados com o estresse (Namekawa *et al.*, 2010).

1031 Alguns polifenóis extraídos do chá verde (GTP) também apresentam forte atividade
1032 antioxidante (Lian *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). A adição dos GTPs aos meios de PIVE bovinos
1033 aumenta a concentração intracelular de GSH, aumenta a expressão de genes envolvidos na ativação
1034 de antioxidantes endógenos (SOD1, CAT e GPX), e aumentam a taxa de gestação após a
1035 transferência embrionária (Wang *et al.*, 2013).

1036 Visando incrementar o desenvolvimento de embriões bovinos PIVE, Sun *et al.* (2015)
1037 adicionaram a GSH exógena ao meio de cultivo. Foi observado que a adição de 3mM de GSH
1038 aumentou a produção de blastocistos, a qualidade embrionária e diminuiu a produção de ERO,
1039 provavelmente ocasionados pela habilidade do GSH em manter o balanço no redox. Porém, os
1040 resultados foram favoráveis apenas na adição de GSH durante o desenvolvimento de embriões de
1041 duas a quatro células, sendo que a suplementação no estágio de oito células ou de blastocistos não
1042 apresentou impacto significativo.

1043 A melatonina é um derivado do triptofano secretado pela glândula pineal e de ampla
1044 atividade antioxidante. A melatonina reduz os danos oxidativos nas células pela eliminação dos
1045 EROS e seus derivados, estimulação de enzimas antioxidantes, aumenta a concentração de GSH e
1046 inibe a ação de enzimas pró-oxidativas (Galano *et al.*, 2011). Celebrian-Serrano *et al.* (2013)
1047 avaliaram o efeito da adição da melatonina durante a maturação de oócitos submetidos ao EC. Foi
1048 encontrado que a adição de 10⁻⁴ M de melatonina no meio de maturação de oócitos incubados a
1049 41,5°C foi capaz de aliviar os efeitos do estresse sobre a produção de blastocisto. A adição de
1050 melatonina ao meio de maturação de oócitos não expostos a estresse térmico por calor não
1051 incrementou a produção de embriões. Além disso, foi encontrado que elevadas concentrações de

1052 melatonina (10^{-3} M) prejudicam o desenvolvimento embrionário. De maneira semelhante, Ascari *et*
1053 *al.* (2017) também encontrou que apesar da melatonina favorecer a maturação nuclear e reduzir a
1054 produção de ERO, a suplementação do meio de maturação com melatonina não incrementou a
1055 produção *in vitro* de embriões, quando os oócitos foram expostos à elevada temperatura de
1056 incubação.

1057 Nicolau (2012) suplementou com 50 ng/mL de melatonina os meios de maturação e cultivo
1058 *in vitro* de embriões submetidos à criopreservação, e não foi observado efeito desta substância sobre
1059 a tolerância dos embriões à vitrificação. Ao contrário do verificado anteriormente, Wang *et al.*
1060 (2014a) encontraram que a suplementação do meio de cultivo embrionário com 10^{-7} M de
1061 melatonina incrementou a taxa de clivagem e produção de blastocistos, acelerou o desenvolvimento
1062 embrionário, e melhorou a taxa de eclosão dos embriões após a criopreservação. Foi encontrado
1063 ainda que a melatonina aumentou a expressão de genes que favorecem o desenvolvimento
1064 embrionário (DNMT3A, OCC, CDH1), que diminuem a ocorrência de apoptose (APQ3), que
1065 conferem proteção a estresse térmico por calor (HSPA1A) e relacionados com a sobrevivência após
1066 a transferência de embriões (INF-tau).

1067 A quercetina é um antioxidante presente em altas concentrações no vinho tinto, mas também
1068 pode ser encontrada em frutas, vegetais, grãos e flores. A adição desta substância em meios de
1069 maturação oocitária aumenta a taxa de produção de blastocistos, a eclosão e o total de blastômeros.
1070 Entretanto, quando a ação antioxidante da quercetina foi comparada com a cisteamina, a cisteamina
1071 foi superior em aumentar os níveis de GSH intracelular (Gemra *et al.*, 2013).

1072 O resveratrol é composto de polifenóis que estão presentes principalmente em uvas e no
1073 vinho tinto, mas também pode ser encontrado em outros vegetais como na ameixa, amora, cacau,
1074 amendoim e em algumas raízes (Wang *et al.*, 2014b; Li *et al.*, 2016). O resveratrol é um potente
1075 antioxidante natural que apresenta comprovada eficiência em melhorar o desempenho de animais
1076 expostos à altas temperaturas ambientais (Sahian *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014), e melhorar o
1077 desenvolvimento e qualidade dos embriões produzidos *in vitro* de suínos (Lee *et al.*, 2010; Li *et al.*,
1078 2016) e bovinos (Wang *et al.*, 2014b). Entretanto, o efeito da suplementação do resveratrol em meio
1079 de PIVE da espécie bovina, expostos a estresse térmico por calor, ainda não foi avaliado.

1080 Galinhas *Black-boned* expostas a altas temperaturas ambientais foram suplementadas com
1081 resveratrol na dieta para avaliar o efeito da suplementação na performance dos animais, resistência
1082 imunológica e na expressão de proteínas do choque térmico. Os animais alimentados com o
1083 resveratrol apresentaram aumento da ingestão de alimentos, melhoraram o ganho de peso,
1084 aumentaram a concentração da glutathiona sérica, do hormônio do crescimento e do fator de

1085 crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), além de aumentarem a atividade de antioxidantes
1086 enzimáticos naturais (GSH-Px, SOD e CAT). O resveratrol ainda atenuou a expressão de proteínas
1087 que tiveram sua expressão aumentada pelo EC, incluindo HSP27, HSP70 e HSP90, sugerindo que o
1088 aditivo foi capaz de modular a expressão dos genes envolvidos no choque térmico (Liu *et al.*, 2014).
1089 De maneira semelhante, Sahian *et al.* (2012) encontraram que a suplementação com resveratrol na
1090 dieta de codornas Japonesas, submetidas ao EC, foi eficiente em reduzir os efeitos do estresse
1091 oxidativo e em modular a transcrição de proteínas do choque térmico.

1092 Em relação aos efeitos do resveratrol na PIVE, Lee *et al.* (2010) foram pioneiros na
1093 demonstração dos efeitos positivos da suplementação com 0,5 μ M de resveratrol no aumento da
1094 produção e da qualidade de embriões de suínos, com conseqüente diminuição da apoptose. Wang *et*
1095 *al.* (2014b) encontraram que a suplementação do meio de maturação de oócitos bovinos com 1,0 μ M
1096 de resveratrol aumentou a secreção de progesterona pelas células do *cumulus*, ativou a cascata
1097 MAPK em oócitos, incrementou a expansão do CCOs, aumentou a taxa de eclosão dos blastocistos
1098 e aumentou o número de células embrionárias totais. Além disso, foi observado aumento do GSH e
1099 diminuição de EROS no meio de cultivo.

1100 O resveratrol tem sido amplamente testado também na criopreservação de embriões bovinos
1101 produzidos *in vitro*. Salzano *et al.* (2014) testaram se a adição de 0,5 μ M de resveratrol no meio de
1102 cultivo seria capaz de incrementar o desenvolvimento embrionário, a criotolerância e o número de
1103 blastômeros. Os autores observaram aumento da sobrevivência embrionária e eclosão após o
1104 aquecimento de embriões tratados com resveratrol. Adicionalmente, foi testada a adição do
1105 resveratrol no meio de aquecimento, após a vitrificação ou no meio de transferência de embriões.
1106 Neste caso, o resveratrol incrementou a taxa de eclosão e diminuiu a produção de ERO (Silva,
1107 2015).

1108

1109 ***3- Suplementação dos meios de cultivo in vitro de embriões com substância*** 1110 ***citoprotetoras ou termoprotetoras***

1111 Algumas moléculas regulatórias presentes no trato reprodutivo feminino, tais como
1112 hormônios, fatores de crescimento, citocinas e inibidores da apoptose possuem potencial de
1113 proteger e/ou reverter os danos celulares causados pelo estresse térmico por calor em oócitos e
1114 embriões (Block *et al.*, 2011; Paula-Lopes *et al.*, 2013).

1115 O estresse térmico por calor (EC) pode induzir a apoptose em vários tipos celulares,
1116 inclusive em embriões pré-implantação. A apoptose desempenha papel de controle de qualidade

1117 muito importante para o desenvolvimento embrionário, eliminando as células danificadas, não-
1118 funcionais, anormais e ectópicas. Para testar essa hipótese foi adicionado inibidor de caspases do
1119 grupo II, o z-DEVD-fmk, no meio de cultivo de embriões estressados pelo calor pela incubação a
1120 41°C por 9 horas, no quarto dia de desenvolvimento (≥ 16 células). Foi encontrado que o z-DEVD-
1121 fmk intensificou os efeitos do EC na redução do desenvolvimento embrionário, confirmando a
1122 teoria de que a apoptose desempenha papel adaptativo na resistência embrionária ao estresse (Paula-
1123 Lopes e Hansen, 2002). Em contrapartida, Roth e Hansen (2004b) encontraram que a adição do z-
1124 DEVD-fmk ao meio de maturação oocitária bloqueou completamente os efeitos deletérios do
1125 choque térmico na clivagem e desenvolvimento de blastocistos. Possivelmente, neste caso a
1126 apoptose representa processo de seleção no qual apenas os oócitos mais saudáveis e viáveis
1127 sobrevivem ao estresse causado pela exposição à altas temperaturas.

1128 A esfingosina-1-fosfato (S1P) é um metabólito resultante da hidrólise de esfingolípídeos das
1129 membranas celulares que pode bloquear a apoptose pela neutralização da ceramida, um segundo
1130 mensageiro da cascata de apoptose. A adição de 50nM de S1P ao meio de maturação não teve efeito
1131 sobre oócitos maturados a 38,5°C, mas houve aumento da clivagem e desenvolvimento embrionário
1132 de oócitos submetidos ao EC. Além disso, a adição N1N-Dimetilesfingosina, um inibidor da S1P,
1133 ao meio de maturação de oócitos incubados em temperaturas elevadas ou a 38,5°C reduziu o
1134 número de clivados e de embriões produzidos, sugerindo que a S1P está envolvida no processo de
1135 maturação. Foi sugerido também que o efeito termoprotetivo da S1P está associado a sua ação anti-
1136 apoptótica (Roth e Hansen, 2004a).

1137 Acredita-se que a maior produtividade e resistência a EC de embriões zebuínos PIVE possa
1138 estar associada com a maior concentração do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
1139 (IGF-1; Satrapa, 2011). Os IGFs foram identificados no líquido folicular, em secreções uterinas, no
1140 trato reprodutivo feminino (Geisert *et al.*, 1991), assim como em oócitos e embriões bovinos
1141 (Lonergan *et al.*, 2000), sugerindo a importância deste fator de crescimento na função oocitária e
1142 embrionária.

1143 Spanos *et al.* (2000) sugeriram que o IGF-1 presente nas células do *cumulus* estimulam a
1144 ativação de termoprotetores extracelulares ou a produção moléculas regulatórias que causam a
1145 ativação de mecanismos de proteção térmica do oócito. Satrapa (2011) demonstrou que o emprego
1146 de IGF-I, no meio de cultivo de embriões bovinos, melhorou a produção embrionária e diminuiu a
1147 incidência de morte celular por apoptose. Além de minimizar a apoptose espontânea, o IGF-I
1148 alterou a expressão gênica embrionária e previniu que as células expostas ao estresse entrem em

1149 apoptose, reduzindo os efeitos deletérios do EC (Spanos *et al.*, 2000; Bonilla *et al.*, 2011; Lima *et*
1150 *al.*, 2012).

1151 A suplementação do meio de cultivo *in vitro* (CIV) com 100ng/mL de IGF-I tornou os
1152 blastocistos mais resistentes ao EC, aumentado a taxa de gestação após a transferência de embriões
1153 produzidos *in vitro* para vacas Holandesas em lactação, submetidas à temperatura ambiental
1154 elevada. Porém, foi demonstrado que a adição de IGF-1 ao meio de CIV somente incrementou a
1155 sobrevivência após a transferência em receptoras submetidas a EC (Block e Hansen, 2007).

1156 Bonilla *et al.* (2011) encontraram que o tratamento de embriões bovinos com 100ng/mL de
1157 IGF-I minimizou os efeitos do EC em embriões com mais de 16 células, porém, o mesmo não foi
1158 observado em embriões de duas células. Foi sugerindo que a termoproteção conferida pelo IGF-1
1159 pode ser dependente do estado de desenvolvimento embrionário, ou que o IGF-1 não é capaz de
1160 interferir na resistência de estruturas com baixa atividade de transcrição.

1161 Ascari *et al.* (2017) testou o efeito da adição de IGF-1 no meio de maturação de oócitos
1162 submetidos a EC. Foi encontrado que o IGF-1 melhorou a qualidade dos embriões produzidos,
1163 avaliado pela atividade mitocondrial, produção de ERO, e taxa de células apoptóticas, porém, não
1164 foi observado aumento da resistência a EC. Entretanto, no trabalho foi encontrado que não houve
1165 diminuição na produção de embriões, quando a concentração de IGF-1 utilizada foi de 25ng/mL. A
1166 maioria dos trabalhos que buscam avaliar os efeitos do IGF-1 na mitigação dos danos causados pelo
1167 estresse térmico por calor utilizaram a concentração de 100ng/mL, porém, foi encontrado que a
1168 concentração fisiológica de IGF-1 nos folículos ovarianos é de aproximadamente 17ng/mL.
1169 Portanto, foi sugerido que a utilização de concentrações de IGF-1 mais semelhante ao fisiológico
1170 (25ng/mL) pode apresentar efeitos de termoproteção mais promissores na qualidade de oócitos,
1171 embriões e na sobrevivência.

1172 O fator estimulador de colônias tipo 2 (CSF-2) é um importante regulador do
1173 desenvolvimento embrionário (Block *et al.*, 2011; Loureiro *et al.*, 2009; 2011a; 2011b). Foi
1174 observado que o CSF-2 aumenta a produção de blastocistos, aumenta o número de células
1175 embrionárias, melhora a proporção de células na massa celular interna em relação ao trofoblasto
1176 (Loureiro *et al.*, 2009), e diminui a expressão de genes relacionados com a apoptose (Loureiro *et*
1177 *al.*, 2011a). Adicionalmente, a adição do CSF-2 entre os dias 5 e 7 do cultivo *in vitro* melhorou a
1178 sobrevivência após a transferência de embriões (Loureiro *et al.*, 2011b). A adição de CSF-2 ao meio
1179 de cultivo não incrementou a sobrevivência embrionária quando os embriões foram transferidos
1180 para vacas em lactação durante o verão, porém, não foi o objetivo do estudo avaliar o efeito da

1181 adição do CSF-2 em vacas submetidas à altas temperaturas e, por isso, mais estudos são necessários
1182 para avaliar esta interação (Block *et al.*, 2011; Loureiro *et al.*, 2011b).

1183 O ácido hialurônico (HA) é outra molécula com potencial de melhorar a viabilidade de
1184 embriões bovinos produzidos *in vitro*. O HA está presente nos fluidos da tuba uterina e do útero, e
1185 os embriões pré-implantação apresentam receptores de HA. Esta substância participa da proliferação
1186 celular, migração, adesão e sinalização entre células (Block *et al.*, 2011; Marei *et al.*, 2016). Block
1187 *et al.* (2009) encontraram que a adição do HA nos meios de CIV incrementa a sobrevivência
1188 embrionária pós-transferência, a taxa de gestação e a sobrevivência pós-criopreservação. Alguns
1189 trabalhos encontraram resultados controversos sobre a utilização do HA na produção *in vitro* de
1190 embriões. Isso porque a expressão da hialuronidase, enzima que degrada o HA, só é expressa a
1191 partir dos estádios de mórula e blastocisto. Diante disso, Marei e colaboradores (2016) cultivaram
1192 embriões na presença de HA, ou da associação de HA com Hyal2, uma hialurorinase que quebra a
1193 HA em fragmentos de 20kDa, ou apenas com Hyal2. Os embriões cultivados apenas com Hyal2
1194 apresentaram maior desenvolvimento até o estágio de blastocisto, maior taxa de eclosão, aumento
1195 do número de células embrionárias, bem como aumento na expressão dos genes HSP70, IGF2 e
1196 IGFBP2. Portanto, neste trabalho foi observado que a adição hialuronidase ao meio de CIV é
1197 melhor do que o HA para o desenvolvimento de embriões PIVE. O efeito da HA ou da
1198 hialuronidase em embriões submetidos a estresse térmico por calor ainda não foi testado, porém, já
1199 existem evidências que a HA favorece o desenvolvimento de embriões submetidos ao estresse
1200 térmico pelo frio (Block *et al.*, 2009).

1201 O ácido linoleico é um composto natural proveniente de alimentos origem animal e seus
1202 derivados. O composto possui diversos isômeros, sendo que os mais abundantes são as formas *cis*-
1203 *9*, *trans*-*11* e o *trans*-*10*, *cis*-*12*. A concentração dos isômeros nos lácteos ou produtos cárneos
1204 normalmente sofre influência da dieta fornecida na alimentação animal, mas geralmente o isômero
1205 *cis*-*9*, *trans*-*11* é encontrado em maior abundância nos alimentos de origem animal (Pariza *et al.*,
1206 2001). Ambos isômeros do ácido linoleico supracitados são substância biologicamente ativas, cada
1207 um dos quais participa de diferentes processos fisiológicos. O isômero *cis*-*9*, *trans*-*10* possui um
1208 papel importante no controle da eficiência alimentar e crescimento. Já o *trans*-*10*, *cis*-*12* atua
1209 principalmente no controle da composição corporal, regulando o metabolismo lipídico (Pariza *et al.*,
1210 2001).

1211 O *trans*-*10*, *cis*-*12* (CLA) também apresenta outras funções como: atividade anti-
1212 carcinogênica (Bocca *et al.*, 2010), anti-arterosclerótica, anti-obesidade e inibidora da expressão de

1213 genes codificadores da produção de enzimas que estimulam a síntese de lipídeos nos adipócitos
1214 (Mitchell e McLeod, 2008).

1215 Conforme relatado anteriormente, sabe-se que o acúmulo de lipídios nos embriões está
1216 relacionado ao baixo desenvolvimento embrionário. Foi demonstrado que embriões bovinos que
1217 estocam grande quantidade de lipídeos apresentam baixa resistência à criopreservação (Abe *et al.*,
1218 2002; Pereira *et al.*, 2008; Sudano *et al.*, 2011). Adicionalmente, o acúmulo excessivo de lipídios
1219 citoplasmáticos em embriões bovinos tem sido associado a mitocôndrias anormais ou imaturas,
1220 microvilosidades mais curtas e menos numerosas, complexos juncionais pouco desenvolvidos,
1221 interrupção de genes responsivos ao estresse que prejudicam a qualidade do embrião (Abe *et al.*,
1222 2002).

1223 Diante disso, substâncias que promovam a redução, ou modulem a deposição de lipídeos são
1224 considerados importantes citoprotetores, pelo potencial de aumentar a resistência embrionária a
1225 choque térmico. Foi sugerido que a suplementação de meios de cultivo *in vitro* com este composto
1226 promova modificações na membrana celular dos blastômeros e altere a expressão de genes
1227 relacionados com a adipogênese, diminuindo a deposição de gordura intracelular nos embriões
1228 (Batista *et al.*, 2014). Leite e colaboradores (2017) encontraram que a adição do CLA nos meios de
1229 cultivo embrionário induz a diminuição dos estoques de lipídeos intracitoplasmáticos,
1230 incrementando a qualidade dos embriões.

1231 Adicionalmente, foi demonstrado que o CLA apresenta atividade antioxidante e de
1232 eliminação de EROs (Yu, *et al.*, 2002), propriedades que também podem justificar os efeitos
1233 benéficos do CLA, embora os mecanismos responsáveis por esses efeitos benéficos do CLA ainda
1234 não foram esclarecidos. Abazakiria *et al.* (2020) suplementaram o meio de maturação *in vitro* de
1235 oócitos submetidos ao choque térmico por calor com o isômero trans 10, cis 12 de CLA, foi
1236 encontrado que o CLA protege os oócitos do estresse oxidativo por reduzir as concentrações de ERO
1237 e aumentar o GSH intracelular. No entanto, o CLA não interferiu na intensidade de expressão de
1238 BAX e BCL2 e, portanto, não conseguiu impedir a apoptose dos blastocistos produzidos a partir de
1239 oócitos expostos ao calor.

1240

1241 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1242 ABAZKIRIA, A. M., ZHANDI, M. SHAKERI, M. *et al.* *In vitro* supplementation of trans-10, cis-12
1243 conjugated linoleic acid ameliorated deleterious effect of heat stress on bovine oocyte

1244 developmental competence. *Theriogenology*, v. 142, p. 296-302, 2020. Disponível em:
1245 <doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.028>.

1246 ABE, H., YAMASHITA, S., SATOH, T. *et al.* Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine
1247 embryos and criotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or
1248 serum containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 61, p. 57-66, 2002.

1249 ABILAY, T. A., JOHNSON, H. D. e MADAN, M. Influence of environmental heat on peripheral
1250 plasma progesterone and cortisol during the bovine estrous cycle. *J. Dairy Sci.*, v. 58, p. 1836–1840,
1251 1975.

1252 AGCA, Y., MONSON, R. L., NORTHEY, D. L. *et al.* Transfer of fresh and cryopreserved IVP
1253 bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*, v. 50, p. 147-
1254 162, 1998.

1255 AGARWAL, A., DURAIRAJANAYAGAM, D., VIRK, G. e DUPLESSIS, S. S. Strategies to
1256 ameliorate oxidative stress during assisted reproduction. Springer Briefs in Reproductive Biology, 67
1257 p., 2014.

1258 AGGARWAL, A., UPDYAY, R. Heat stress and animal productivity. Springer India, 188p., 2013.

1259 AGARWAL. A., GUPTA, S. e SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction.
1260 *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v. 3 p. 1-21, 2005.

1261 AKERFELT, M., TROUILLET, D., MEZGER, V. *et al.* Heat shock factors at a crossroad between
1262 stress and development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 1113, p. 15-27, 2007.

1263 ALEXOPOULUS, N. I., MADOX-HYTTEL, P., TVEDEN-NYBORG, P. *et al.* Developmental
1264 disparity between *in vitro* produced and somatic cell nuclear transfer bovine days 14 and 21
1265 embryos implication for embryonic loss. *Reproduction*, v. 136, p. 433-445, 2008.

1266 AL-KATANANI, Y. M., DROST, M., MONSON, R. L. *et al.* Pregnancy rates following timed
1267 embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat
1268 stress conditions. *Theriogenology*, v. 58, p. 171-182, 2002a.

1269 AL-KATANANI, Y. M., HANSEN, P. J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and
1270 the role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 62, p. 174-180,
1271 2002b.

1272 AL-KATANANI, Y. M., PAULA-LOPES, F. F., HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to
1273 heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 390-396, 2002c.

1274 ALLEN, T. E., PAN, Y. S., HAYMAN, R. The effect of feeding on the evaporative heat lass and
1275 body temperature in Zebu and Jersey heifers. *J. Agric. Res.*, v. 14, p. 580-593, 1963.

1276 AMBROSE, J. D., DROST, R. L. MONSON, J. J. *et al.* Efficacy of timed embryo transfer with
1277 fresh and frozen *in vitro* produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed cattle. *J.*
1278 *Dairy Sci.*, v. 82, p. 2369–2376, 1999.

1279 ANDRADE, E. R., MELO-STERZA, F. A., SENEDA, M.M. *et al.* Consequências da produção das
1280 espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev. Bras.*
1281 *Reprod. Anim.*, v. 34, p. 79-85, 2010.

1282 ANTUNES, G., CHAVEIRO, A., SANTOS, P. *et al.* Influence of apoptosis in bovine embryo's
1283 development. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 45, p. 26-32, 2010. Disponível em: <doi.org/ 10.1111/j.1439-
1284 0531.2008.01131.x>.

1285 ASCARI, I. J., ALVES, N. G., JASMIN, J. *et al.* Addition of insulin-like growth factor I to the
1286 maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive
1287 oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v. 60, p. 50-
1288 60, 2017. Disponível em: <doi.org/10.1016/j.domaniend.2017.03.003>.

1289 AZEVEDO, D. M. M. R. e ALVES, A. A. Bioclimatologia aplicada à produção de bovinos leiteiros
1290 nos trópicos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio-Norte, Teresina, 83 p.,
1291 2009.

1292 BADINGA, L., THATCHER, W. W., DIAZ, T. *et al.* Effect of environmental heat stress on
1293 follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v. 39, p. 797–
1294 810, 1993.

1295 BARNES, F. L., FIRST, N. L. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. *Mol.*
1296 *Reprod. Dev.*, v. 2, n. 2, p. 117-123, 1991.

1297 BATISTA, R. I. T. P., RAPOSO, N. R. B., CAMPOS-JUNIOR, P. H. A. *et al.* Trans-10, cis-12
1298 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of *in vitro*-
1299 produced crossbred bovine embryos. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, v.5, p. 1-8, 2014.

1300 BAUMAN, D. E. e CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A
1301 review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.*, v. 63, p. 1514–1529,
1302 1980.

1303 BAUMGARD, L. H., KEATING, A., ROSS, J. W. *et al.* Effects of heat stress on the immune
1304 system, metabolism and nutrient partitioning: implications on reproductive success. *Rev. Bras.*
1305 *Reprod. Anim.*, v. 39, p.173-183, 2015.

1306 BAUMGARD, L. H., RHOADS, R. P. Ruminant production and metabolic responses to heat stress.
1307 *J. Anim. Sci.*, v. 90, p. 1855-1865, 2012.

1308 BELTRAN, M. P. e VASCONCELOS, J. L. M. Conception rate in Holstein cows treated with
1309 GnRH or hCG on fifth day post artificial insemination during summer. *Arq. Bras. Med. Vet.*
1310 *Zootec.*, 60:580-6, 2008.

1311 BERMAN, A., FOLMAN, Y., KAIM, M. *et al.* Upper critical temperatures and forced ventilation
1312 effects for high-yielding dairy cows in subtropical climate. *J. Dairy Sci.*, v. 68, n. 1488-1495, 1985.

1313 BETTS, D. H. e KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*,
1314 v. 55, p. 171-191, 2001.

1315 BIGGERS, B. G., GEISERT, R. P., WETTEMAN, R. P. *et al.* Effect of heat stress on early
1316 embryonic cow. *J. Anim. Sci.*, v. 64, p. 1512-1518, 1987.

1317 BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its
1318 value to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence?. *Reprod. Dom.*
1319 *Anim.*, v. 47, p. 687-693, 2012. Disponível em: <[https://doi.org/10.1111/j.1439-](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01924.x)
1320 [0531.2011.01924.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01924.x)>.

1321 BLOCK, J., HANSEN, P. J., LOUREIRO, B. *et al.* Improving post-transfer survival of bovine
1322 embryos produced *in vitro*: actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and
1323 hyaluronan. *Theriogenology*, v. 76, p. 1602-1609, 2011.

1324 BLOCK, J. e HANSEN, P. J. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-
1325 1 on survival of *in vitro* produced embryos following transfer to lactating dairy cows.
1326 *Theriogenology*, v.67, p.1518-29, 2007.

1327 BLONDIN, P., GUILBAULT, L. A., SIRARD, M. A. The time interval between FSH-P
1328 administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer.
1329 *Theriogenology*, v. 48, p. 803-813, 1997.

1330 BÓ, G. A., MAPLETOFT, R. J. Classificação e avaliação de embriões bovinos. *Anim. Reprod.*,
1331 v.10, n.3, p. 244-248, 2013.

1332 BONILLA, A. Q. S., OLIVEIRA, L. J., OZAWA, M. *et al.* Developmental changes in
1333 thermoprotective actions of insulin-like growth fator-1 on preimplantation bovine embryo. *Mol.*
1334 *Cel. Endocrinol.*, v. 332, p. 170-179, 2011.

1335 BYRNE, A. T., SOUTHGATE, J., BRISON, D. R. *et al.* Analysis of apoptosis in the
1336 preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J. Reprod. Fertil.*, v. 117, p. 97-105, 1999.

1337 CAMARGO, L. S. A., COSTA, F. Q., MUNK, M. *et al.* Contrasting effects of heat shock during *in*
1338 *vitro* maturation on development of *in vitro*-fertilized and parthenogenetic bovine embryos. *Reprod.*
1339 *Dom.Anim.*, v. 54, p. 1357-1365, 2019. Disponível em: <doi.org/10.1111/rda.13544>.

1340 CAVUSOGLU, T., POPKEN, J., GUENGOER, T. *et al.* Ultra-structural alterations in *in vitro*
1341 produced four-cell bovine embryos following controlled slow freezing or vitrification. *Anat. Histol.*
1342 *Embryol.*, v. 45, p. 291-307, 2016. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1111/ah.12197](https://doi.org/10.1111/ah.12197)>
1343 CARDOSO, C. C., PEROPOLLI, V., AMADOR, S. A. *et al.* Physiological and thermographic
1344 response to heat stress in zebu cattle. *Livest. Sci.*, v. 182, p. 83-92, 2015. Disponível em:
1345 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.10.022>>
1346 CELEBRIAN-SERRANO, A., SALVADOR, I., RAGA, I. *et al.* Beneficial effect of melatonina on
1347 blastocisto *in vitro* production from heat-stressed bovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 48, p.
1348 738-746, 2013. Disponível em: <doi.org/10.1111/rda.12154>.
1349 CHANCE, B., SIES, H., BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol.*
1350 *Rev.*, v. 59, p. 527-604, 1979.
1351 CHEN, J. M., SCHUTZ, K. E. e TUCKER, C. B. Cooling cows efficiently with water spray:
1352 Behavioral, physiological, and production responses t sprinklers at the feed bunk. *J. Dairy Sci.*, v.
1353 99, p. 4607-4618, 2016. Disponível em: <[dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10714](https://doi.org/10.3168/jds.2015-10714)>.
1354 COCHRAN, S. D., COLE, J. B., NULL, D. J. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in candidate
1355 genes associated with fertilizing ability of sperm and subsequent embryonic development in cattle.
1356 *Biol. Reprod.*, v.89 p. 1-7, 2013.
1357 COLLIER, R. J., RENQUIST, B. J. e XIAO, Y. A 100-year review: stress physiology including
1358 heat stress. *J. Dairy Sci.*, v. 100, p. 10367-10380, 2017. Disponível em: <[doi.org/10.3168/jds.2017-](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13676)
1359 [13676](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13676)>.
1360 CONTI, M., HSIEH, M., ZAMAH, A. M., OH, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary
1361 during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell Endocrinol.*, v. 356, p. 65-73, 2012. Disponível
1362 em: <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.002>>.
1363 CROCOMO, L. F., MARQUES FILHO, W. C., LANDIM-ALVARENGA, F. C. *et al.* Produção de
1364 embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. *Vet. Zootec.*, v. 19, n.4, p. 470-479, 2012.
1365 DEB, R., SAJJANAR, B., SUSHIL KUMAR, U. S. *et al.* Effect of heat stress on the expression
1366 profile of HSP90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Friesal (*Bos indicus* X *Bos taurus*) breed of
1367 cattle: a comparative study. *Gene*, v. 536, p. 435-440, 2014.
1368 DE CASTRO E PAULA, L. A. e HANSEN, P. J. Modification of actions of heat shock on
1369 development and apoptosis of cultured preimplantation bovine embryos by oxygen concentration
1370 and dithiothreitol. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 75, p. 1338-1350, 2008. Disponível em:
1371 <doi.org/10.1002/mrd.20866>.
1372 DIAZ-CUETO, L. e GERTON, G. L. The influence of growth factors on the development of
1373 preimplantation mammalian embryos. *Arch. Med. Research*, v. 32, p. 619-626, 2001.

1374 DIKMEN, S., KHAN, F. A., HUSON, H. J. *et al.* The *SLICK* locus derived from Senepol cattle
1375 confers thermotolerance to intensively managed lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 97, p.
1376 5508–5520, 2014. Disponível em: <doi.org/10.3168/JDS.2014-8087>.

1377 DISKIN, M. G. e SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after
1378 artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.*, v. 59, p. 463-468, 1980.

1379 DU, J., DI, H., GUO, L. *et al.* Hyperthermia causes bovine mammary epithelial cell death by a
1380 mitochondrial-induced pathway. *J. Therm. Biol.*, v.33, p. 37-47, 2008. Disponível em:
1381 <10.1016/j.jtherbio.2007.06.002>.

1382 EALY, A.D., DROST, M., HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to
1383 adverse effects of maternal stress in cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.2899-2905, 1993.

1384 EDWARDS, J., HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation
1385 embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 46, p. 138-145, 1997.

1386 EL-SAYED, A., HOELKER, M., RINGS, F. *et al.* Large-scale transcriptional analysis of bovine
1387 embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol. Genomics*, v.
1388 28, p. 84-96, 2006.

1389 EPPIG, J. J., SCHROEDER, A. C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo
1390 embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*.
1391 *Biol. Reprod.*, v. 41, p. 268-276, 1989.

1392 FAIR, T., HYTTEL, P., MOTLIK, J. *et al.* Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes *in vitro*
1393 using Butyrolactone I: Effects on oocyte ultrastructure and nucleolus function. *Mol. Reprod. Dev.*,
1394 v. 62, p. 375-386, 2002. Disponível em: <doi.org/10.1002/mrd.10096>.

1395 FAIR, T., LONERGAN, P., DINNYES, A. *et al.* Ultrastructure of bovine blastocysts following
1396 cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 58, p. 186-195,
1397 2001. Disponível em: <doi.org/10.1002/1098-2795(200102)58:2<186::AID-MRD8>3.0.CO;2-N>.

1398 FAYLON, M. P., BAUMGARD, L. H., RHOADS R. P. *et al.* Effects of acute heat stress on lipid
1399 metabolism of bovine primary adipocytes. *J. Dairy Sci.*, v. 98, p. 8732-8740, 2015. Disponível em:
1400 <dx.doi.org/ 10.3168/jds.2015-9692>.

1401 FERGUSON, E. M. e LEESE, H. J. A potential role for triglyceride as an energy source during
1402 bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 73, p. 1195-1201,
1403 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.20494>.

1404 FERGUSON, E. M. e LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J.*
1405 *Reprod. Fertil.*, v. 116, p. 373-378, 1999. Disponível em: <doi: 10.1530/jrf.0.1160373>.

1406 FLAMENBAUM, I. e GALON, N. Management of heat stress to improve fertility in dairy cows in
1407 Israel. *J. Reprod. Dev.*, v. 56, p. 36-41, 2010.

1408 FOURNEL, S., OUELLET, V. e CHARBONNEAU, E. Practices for alleviating heat stress of dairy
1409 cows in humid continental climates. *Animals*, v. 37, p. 1-23, 2017. Disponível em:
1410 <doi:10.3390/ani7050037>.

1411 GALANO, A., TAN, D. X. e REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a
1412 physicochemical examination. *J. Pineal Res.*, v. 51, p. 1-16, 2011.

1413 GEARY, T.W., SMITH, M. F., MACNEIL, M. D. *et al.* Influence of follicular characteristics at
1414 ovulation on early embryonic survival. *J. Anim. Sci.*, v. 91, p. 3014-3021, 2013.

1415 GEISERT, R. D., LEE, C. Y., SIMMEN, F. A. *et al.* Expression of messenger RNAs encoding
1416 insulin-like growth factor I, II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine
1417 endometrium during the *oestrus* cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.*, v. 45, p. 975-983, 1991.

1418 GEMRA, S., MONZANI, P. S., SANTOS, E. S. *et al.* Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em
1419 meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. *Arq. Bras.*
1420 *Med. Vet. Zootec.*, v. 65, p. 1616-1624, 2013.

1421 GENDELMAN, M. e ROTH, Z. *In vivo* vs. *in vitro* models for studying the effects of elevated
1422 temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression.
1423 *Anim. Reprod. Sci.*, v.134, p. 125-134, 2012.

1424 GILBERT, I., MACAULAY, A., ROBERT, C. Oocyte developmental competence and embryo
1425 quality: distinction and new perspectives. *Anim. Reprod.*, v. 12, n. 3, p. 397-407, 2015.

1426 GILCHRIST, R., LANE, M., THOMPSON, J. *et al.* Oocyte-secreted factors: Regulators of *cumulus*
1427 cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update*, v. 14, p. 159-177, 2008. Disponível em:
1428 <doi.org/10.1093/humupd/dmm040>.

1429 GOTTARDI, F. P. e MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da
1430 competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 33, n. 2, p. 82-94,
1431 2009.

1432 GUTIÉRREZ, M. E., GALINA, C. S., MORENO-MENDONZA, N. *et al.* Observation of fresh *Bos*
1433 *indicus* embryos comparing stereoscopic and phase contrast microscopy. *Zygote*, v. 22, p. 187-194,
1434 2012. Disponível em: <doi.org/ 10.1017/S0967199412000421>.

1435 GUTTERIDGE, J. M. e HALLIWELL, B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths.
1436 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 393, p. 561-564, 2010.

1437 HANSEN, P. J. Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on
1438 embryonic development in cattle. *Anim. Reprod.*, v. 10, n. 3, p. 322-333, 2013.

1439 HANSEN, P. J. Challenges to fertility in dairy cattle: from ovulation to the fetal stage of pregnancy.
1440 *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 35, n. 2, p. 229-238, 2011.

1441 HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, v. 364, p.
1442 3341-3350, 2009.

1443 HANSEN, P. J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to
1444 elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress.
1445 *Theriogenology*, v. 68, p. 242-249, 2007. Disponível em: <doi.org/
1446 10.1016/j.theriogenology.2007.04.008>.

1447 HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim.*
1448 *Reprod. Sci.*, v.82, p. 349-360, 2004. Disponível em: <doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.011>.

1449 HANSEN, P. J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *J. Anim. Sci.*, v. 80, p.
1450 33-44, 2002.

1451 HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. *Rev. Reprod.*, v. 4, p. 125-134, 1999.

1452 HASLER, J. F., HENDERSON, W. B., HURTGEM, P. J. *et al.* Production, freezing and transfer of
1453 bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v. 43, p. 141-153, 1995.
1454 Disponível em: <doi.org/10.1016/0093-691X(94)00020-U>.

1455 HICKMAN, C. F., CLINTON, M., AINSLIE, A. *et al.* Heat shock induces interferon-TAU gene
1456 expression by *in vitro* produced bovine blastocysts. *Amer. J. Reprod. Immunol.*, v. 70, p. 177-181,
1457 2013. Disponível em: <doi.org/10.1111/aji.12131>.

1458 HUANG, W., NAGANO, M., KANG, S.S. *et al.* Effects of *in vitro* growth culture duration and
1459 prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived
1460 from early antral follicles. *Theriogenology*, v. 80, p. 793-799, 2013. Disponível em:
1461 <doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.004.07.004>.

1462 IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Relevo e Clima www.ibge.gov.br. Acessado
1463 em 18 de julho de 2019.

1464 JESETA, M., CTVRTLIKOVA KNITLOVA, D., HANZALOVA, K. *et al.* Mitochondrial patterns in
1465 bovine oocytes with different meiotic competence related to their *in vitro* maturation. *Reprod. Dom.*
1466 *Anim.*, v. 49, p.467-475, 2014.

1467 JOHNSON, H. D. Environmental temperature and lactation (with special reference to cattle). *Int. J.*
1468 *Biometeorol.*, v. 9, p. 103-116, 1965.

1469 JORDAN, E. R. Effect of heat stress on reproduction. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 104-114, 2003.
1470 Disponível em: <doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74043-0>

1471 KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L., ALM, H., TORNER, H. *et al.* Mitochondrial aggregation patterns
1472 and activity in *in vitro* cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles.
1473 *Theriogenology*, v.75, p.662-670, 2011.

1474 KHATIB, H., MONSON, R. L., HUANG, W. *et al.* Short communication: Validation of *in vitro*
1475 fertility genes in a Holstein bull population. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p. 2244-2249, 2010.

1476 KHATIB, H., MONSON, R. L., SCHUTZKUS, V. *et al.* Mutations in the STAT5A gene are
1477 associated with embryonic survival and milk composition in cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 91, p. 784-793,
1478 2008.

1479 KING, W. A. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. *Can. Vet. J.*, V. 32, P.99-103, 1991.

1480 LEE, K., WANG, C., CHAILLE, J. M. *et al.* Effect of Resveratrol on the development of porcine
1481 embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Dev.*, v. 56, n. 3, p. 330-335, 2010.

1482 LEESE, H. J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability.
1483 *Bioessays*, v. 24, p. 845- 849, 2002. Disponível em: <doi: 10.1002/bies.10137>.

1484 LEITE, A. C., ANDRADE, V. B., SILVA, E. B. M. *et al.* Efeito da adição do ácido linoleico
1485 conjugado no cultivo *in vitro* de embriões F1 Holandês x Zebu na sobrevivência pós-vitrificação.
1486 *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 69, n.6, p.1385-1392, 2017. Disponível em:
1487 <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9238>>.

1488 LI, Y., WANG, J., ZHANG, Z. *et al.* Resveratrol compares with melatonin in improving *in vitro*
1489 porcine oocyte maturation under heat stress. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, v. 7, n. 33, p. 1-10, 2016.

1490 LIAN, H. Y., GAO, Y., JIAO, G. Z. *et al.* Antioxidant supplementation overcomes the deleterious
1491 effects of maternal restraint stress-induced oxidative stress on mouse oocytes. *Reproduction*, v. 146,
1492 p. 559-568, 2013.

1493 LIMA, S.R. O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do
1494 choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa. Mestrado em Ciências
1495 Biológicas (Dissertação), Instituto de Biociência de Botucatu. Universidade Estadual Paulista
1496 UNESP. Botucatu, 138 p., 2012.

1497 LIU, L. L., HE, J. H. XIE, H. B. *et al.* Resveratrol induces antioxidant and heat shock protein RNAm
1498 expression in response to heat stress in black-boned chickens. *Poult. Sci.*, n. 93, p. 54-62, 2014.

1499 LONERGAN. P., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., PINTADO, B. *et al.* Relationship between time of first
1500 cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in
1501 bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. *Mol Reprod Dev.*, v.57, p.146-152, 2000.

1502 LOUREIRO, B., OLIVEIRA, L. J., FAVORETO, M. G. *et al.* Colony-stimulating factor 2 inhibits
1503 induction of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *American J. Reprod. Immunol.*, v. 65,
1504 n. 6, p. 578-588, 2011a.

1505 LOUREIRO, B., BLOCK, J., FAVORETO, M. G. *et al.* Consequences of conceptus exposure to
1506 colony-stimulating factor 2 on survival, elongation, interferon-tau secretion and gene expression.
1507 *Reproduction*, v. 141, p. 617-624, 2011b.

1508 LOUREIRO, B., BONILLA, L., BLOCK, J. *et al.* Colony-stimulating factor 2 (CSF-2) improves
1509 development and post transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*. *Endocrinology*, v. 150,
1510 p. 5046–5054, 2009.

1511 LUCIANO, A. M., POCAR, P., MILANESI, E. *et al.* Effect of different levels of intracellular
1512 cAMP on the *in vitro* maturation of cattle oocytes and their subsequent development following *in*
1513 *vitro* fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 54, p. 86-91, 1999.

1514 MAREI, W. F. A., RAHEEM, K. A., SALAVATI, M. *et al.* Hyaluronan and hyaluronidase, with is
1515 better for embryo development? *Theriogenology*, v. 86, p. 940-948, 2016.

1516 MARQUES, M. G., MELLO, M R. B., TAVARES, L. M. T. *et al.* Maturação e desenvolvimento
1517 embrionário *in vitro* de oócitos bovinos após bloqueio da meiose com inibidores da MPF. *Braz. J.*
1518 *Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 48, n. 6, p. 468-477, 2011.

1519 MAZIERO, R. R. D., GUAITOLINI, C. R. F., PASCHOAL, D. M. *et al.* Treatment with roscovitine
1520 and butyrolactone I prior to *in vitro* maturation alters blastocyst production. *Zygote*, v. 11, p. 1-8,
1521 2019. Disponível em: <doi.org/10.1017/S0967199419000571 >.

1522 MEDEIROS, L. F. D., VIEIRA, D. H. *Bioclimatologia Animal*. Ministério da Educação e Cultura,
1523 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

1524 MITCHELL, P. L., McLEOD, R. S. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal
1525 models. *Biochem. Cell Biol.*, v. 86, p. 293–301, 2008.

1526 MUJAHID, A., PUMFORD, N. R., BOTTJE, W. *et al.* Mitochondrial oxidative damage in chicken
1527 skeletal muscle induced by acute heat stress. *J. Poult. Sci.*, v. 44, p. 439–445, 2007.

1528 NAGANO, M. Acquisition of developmental competence and *in vitro* growth culture of bovine
1529 oocytes. *J. Reprod. Dev.*, v. 65, p. 195-201, 2019.

1530 NAMEKAWA, T., IKEDA, S., SUGIMOTO, M. *et al.* Effects of astaxantin-containing oil on
1531 developmental and stress-related gene expression. Of bovine oocyte exposed to heat stress. *Reprod.*
1532 *Dom. Anim.*, v. 45, p. 387-391, 2010. Disponível em: <doi.org/ 10.1111/j.1439-
1533 0531.2010.01584.x>.

1534 NEUBER, E., LUETJENS, C. M., CHAN, A. W. S. *et al.* Analysis of DNA fragmentation of *in*
1535 *vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. *Theriogenology*, v. 57, p. 2193-2202, 2002.

1536 NICOLAU, S. S. Estudo da ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos frescos e
1537 criopreservados produzidos *in vitro*. Mestrado em Reprodução Animal (Dissertação), Universidade
1538 de São Paulo, São Paulo/SP, 100 p., 2012.

1539 O'BANNON, E. B., CORNELISON, P. R., RAGSDALE, A. C. *et al.* Relative growth rates at 80 and
1540 50 °F of Santa Gertrudis, Brahman and Shorthorn heifers. *J. Anim. Sci.*, v. 14, p. 1187-1188, 1955.

1541 OLIVEIRA, F. D., SANGALLI, J. R., MEIRELLES, F. V. *et al.* Bovine conceptus *Bos indicus*
1542 produced by somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis present morphological variations
1543 since blastocyst stage. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 67, p. 1483-1491, 2015. Disponível em:
1544 <[dx.doi.org/10.1590/1678-4162-7647](https://doi.org/10.1590/1678-4162-7647)>.

1545 OLIVEIRA, F. D., PERECIN, F., MEIRELLES, F. V. *et al.* Comparative ultrastructure of *in vitro*-
1546 produced bovine blastocysts (*Bos indicus*) derived from *in vitro* fertilization, SNC, and
1547 parthenogenesis. *Reprod. Fertil. Develop.*, v.25, p. 200-201, 2012. Disponível em:
1548 <doi.org/10.1071/RDv25n1Ab105>.

1549 ORTEGA, M. S., ROCHA-FRIGONI, N. A. S., MINGOTI, G. Z. *et al.* Modification of embryonic
1550 resistance to heat shock in cattle by melatonina and genetic variation in HSPA1L. *J. Dairy Sci.*, v.
1551 99, p. 9152-9164, 2016. Disponível em: <doi.org/10.3168/jds.2016-11501>.

1552 PAES, V. M., VIEIRA, L. A., CORREIA, H. H. V. *et al.* Effect of heat stress on the survival and
1553 development of *in vitro* cultured bovine preantral follicles and on *in vitro* maturation of *cumulus*-
1554 oocyte complex. *Theriogenology*, v. 86, p. 994-1003, 2016.

1555 PAN, Y. S. Quantitative and morphological variation of sweat glands, skin thickness, and skin
1556 shrinkage over various body regions of Sahiwal and Jersey cattle. *Journal of Agricultural Research*,
1557 v. 14, n. 3, p. 424-437, 1963.

1558 PARIZA, M. W., PARK, Y., COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic
1559 acid. *Prog. Lipid Reas.*, v. 40, p. 283-298, 2001. Disponível em: <[doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00016-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00016-3)>.

1560 PAULA-LOPES, F. F., LIMA, R. S., SATRAPA, R. A. *et al.* Physiology and endocrinology
1561 symposium: Influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation
1562 embryo resistance to increased temperature. *J. Anim. Sci.*, v. 91, p. 1143-1153, 2013.

1563 PAULA-LOPES, F. F. e HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine
1564 preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem. Biophys. Research*
1565 *Com.*, v.295, p.37-42, 2002.

1566 PAVLOK, A., KOPECNY, V., LUCAS-HAHN, A. *et al.* Transcriptional activity and nuclear
1567 ultrastructure of 8-cell bovine embryos developed by *in vitro* maturation and fertilization of oocytes
1568 from different growth categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 35, p. 233-243, 1993.
1569 Disponível em: <doi.org/10.1002/mrd.1080350304>.

1570 PAYTON, R. R., ROMAR, R., COY, P. *et al.* Susceptibility of bovine germinal vesicle stage
1571 oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v. 71, p. 1303-
1572 1308, 2004.

1573 PEDERSEN, H. S., MAZZONI, G., STROEBECH, L. *et al.* Basic and practical aspects of
1574 pregnancy establishment in cattle. *Anim. Reprod.*, v. 14, n.3, p. 581-588, 2017.

1575 PEREIRA, M. M., MACHADO, M. A., COSTA, F. Q. *et al.* Effect of oxygen tension and serum
1576 during IVM on developmental competence of bovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.22, p.1074-
1577 1082, 2010.

1578 PEREIRA, R. M., CARVALHAIS, I., PIMENTA, J. *et al.* Biopsed and vitrified bovine embryos
1579 viability is improved by tras10, cis12 conjugated linoleic acid supplementations during *in vitro*
1580 embryo culture. *Anim. Reprod. Sci.*, v.106, p.322-332, 2008. Disponível em:
1581 <doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.05.008>.

1582 PEREIRA, J. C. C. Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal. Editora
1583 FEPMVZ, Belo Horizonte, 195 p., 2005.

1584 PINCUS, G., ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*:
1585 I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, v. 62, p. 665–675, 1935.

1586 PIRES, M. F. A., FERREIRA, A. M., SATURNINO, H. M. *et al.* Gestation rate in Holstein cows
1587 confined on free-stall, during the summer and winter. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 1, p. 108-119,
1588 2002.

1589 POBEZHIMOVA, T., VOINIKOV, V. e VARAKINA, N. Inactivation of complex I of the
1590 respiratory chain of maize mitochondria incubated *in vitro* by elevated temperature. *J. Them. Biol.*,
1591 v. 21, p. 283-288, 1996.

1592 PUTNEY, D.J., THATCHER, W.W., DROST, M. *et al.* Influence of environmental temperature on
1593 reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in the Southwest region of the
1594 United States. *Theriogenology*, v.30, p.905-922, 1988.

1595 RENAUDEAU, D., COLLIN, A., YAHAV, S. *et al.* Adaptation to hot climate and strategies to
1596 alleviate heat stress in livestock production. *Animal*, v. 6, p. 707–728, 2012. Disponível em:
1597 <doi.org/10.1017/S1751731111002448>.

1598 RHOADS, M. L., R. P. RHOADS, M. J. VANBAALE, R. J. *et al.* Effects of heat stress and plane
1599 of nutrition on lactating Holstein cows: I. production, metabolism and aspects of circulating
1600 somatotropin. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p. 1986–1997, 2009.

1601 RICHARD, F. J. e SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell
1602 inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v. 54, p. 22-28, 1996.

1603 RICHTER, C., PARK, J. W., AMES, B. N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear
1604 DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 6465–6467, 1988.

1605 ROCHA, A., RANDEL, R. D., BROUSSARD, J. R. *et al.* High environmental temperature and
1606 humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, v. 49,
1607 p. 657-665, 1998.

1608 RODRIGUES, A. L., SUZA, B. B., PEREIRA FILHO, J. M. Influência do sombreamento e dos
1609 sistemas de resfriamento no conforto térmico de vacas leiteiras. *Agropec. Cien. Semi-Árido*, v. 6, n. 2,
1610 p. 14-22, 2010.

1611 ROTH, Z. e HANSEN, P. J. Shingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during
1612 maturation. *Biol. Reprod.*, v. 71, n. 2072-2078, 2004a.

1613 ROTH, Z. e HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of
1614 bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.*, v. 71, p. 1898-1906, 2004b.

1615 RUBBO, H., RADI, R., TRUJILLO, M. *et al.* Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite
1616 dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J.*
1617 *Biol. Chem.*, v. 269, p. 26066–26075, 1994.

1618 SAHIAN, K., ORHAN, C., AKDEMIR, F. *et al.* Resveratrol protects quail hepatocytes against heat
1619 stress: modulation of the NRF2 transcription factor and heat shock proteins. *J. Anim. Physiol. Anim.*
1620 *Nutrit.*, v. 96, p. 66-74, 2012.

1621 SAKATANI, M., ALVAREZ, N. V., TAKAHASHI, M. *et al.* Consequences of physiological heat
1622 shock beginning at zygote stage on embryonic development and expression. Of stress response genes
1623 in cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 95, p. 3080-3091, 2012. Disponível em: <doi.org/ 10.3168/jds.2011-4986>.

1624 SALZANO, A., ALBERO, G., ZULLO, G. *et al.* Effect of Resveratrol supplementation during
1625 culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 151, p.
1626 91-96, 2014.

1627 SANTANA JÚNIOR, M. L., PEREIRA, R. J., BIGNARDI, A. B. *et al.* Detrimental effect of
1628 selection for milk yield on genetic tolerance to heat stress in purebred Zebu cattle: Genetic
1629 parameters and trends. *J. Dairy Sci.*, v. 98, p. 9035–9043, 2015. Disponível em:
1630 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9817>

1631 SARTORI, R., BASTOS, M., BARUSELLI, P. *et al.* Physiological differences and implications to
1632 reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. *Soc.*
1633 *Reprod. Fertil.*, v. 67, p. 357-375, 2010. Disponível em: <doi.org/10.5661/RDR-VII-357 >.

1634 SARTORI, R., SARTOR-BERGFELT, R., MERTENS, J. N. *et al.* Fertilization and early embryonic
1635 development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy*
1636 *Sci.*, v. 85, p. 2803-2812, 2002.

1637 SATRAPA, R. A. Influência dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-I e II), seus
1638 receptores (IGFR-I e II), proteínas ligantes (IGFBP-2 e 4) e PAPP-A na aquisição de tolerância ao
1639 estresse térmico de embriões bovinos (NELORE vs HOLANDÊS) produzidos *in vitro*. 2011. 94 f.
1640 Doutorado em Ciências Biológicas (Tese). Instituto de Biociência de Botucatu. Universidade
1641 Estadual Paulista UNESP. Botucatu, 2011.

1642 SILVA, A. R. N. Efeito do Resveratrol na qualidade e desenvolvimento de embriões bovinos
1643 criopreservados ou conservados em meio *holding*. Mestrado em Zootecnia (Dissertação), Escola de
1644 Veterinária da Universidade de Goiás, Goiânia/GO, 51 p., 2015.

1645 SLIMEN, I., NAJAR, T., GHRAM, A. *et al.* Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-
1646 induced mitochondrial damage. A review. *Int. J. Hyperthermia*, v. 30, p.513-523, 2014. Disponível
1647 em: <doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>.

1648 SPANOS, S., BECKER, D.L., WINSTON, R.M., HARDY, K. Anti-apoptotic action of insulin-like
1649 growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol. Reprod.*, v.63, p.1413-20,
1650 2000.

1651 SPENCER, T. E. Early pregnancy: Concepts, challenges, and potential solutions. *Anim. Front.*, v. 3,
1652 p. 48-55, 2013. Disponível em: <doi.org/10.2527/af.2013-0033>.

1653 STADTMAN, E. R. e LEVINE, R. L. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 899, p. 191–208,
1654 2000.

1655 STEWART, B. M., BLOCK, J., MORELLI, P. *et al.* Efficacy of embryo transfer in lactating dairy
1656 cows during summer using fresh or vitrified embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. *J.*
1657 *Dairy Sci.*, v. 94, p. 3437-3445, 2011.

1658 ST-PIERRE, N. R., COBANOV, B. e SCHNITKEY, G. Economic losses from heat stress by US
1659 livestock industries. *J. Dairy Sci.*, v. 86 (suppl. E), p. E52-E77, 2003. Disponível em:
1660 <10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5>

1661 STRINGFELLOW, D. A. e GIVENS, M. D. Manual of the International Embryo Transfer Society.
1662 A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing
1663 sanitary procedures. 4th Ed., Champaign, IL, EUA, 151 p., 2010. ISBN: 978-0-9662386-3-1.

1664 STURMEY, R. G., REIS, A., LEESE, H. J. *et al.* Role of fatty acids in energy provision during
1665 oocyte maturation and early embryo development. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 44, p. 50-58, 2009.
1666 Disponível em: < doi: 10.1111/j.1439 0531.2009.01402.x>.

1667 SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., RASCADO, T. S. *et al.* Lipid content and apoptosis of *in*
1668 *vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*,
1669 v.75, p.1211-1220, 2011.

1670 SUN, W. J., PANG, Y. W., LIU, P. *et al.* Exogenous glutathione supplementation in culture
1671 medium improves the bovine embryo development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, v.
1672 84, p. 716-723, 2015.

1673 SUTTON-MCDOWALL, M., FEIL, D., ROBKER, R. L. *et al.* Utilization of endogenous fatty acid
1674 stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, v. 77, p. 1632-
1675 1641, 2012. Disponível em: < doi:10.1016/j.Theriogenology.2011.12.008>.

1676 THOMPSON, J. G., BELL, A. C. S., TERVIT, H. R. Partitioning of glucose carbon in post-
1677 compaction ovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 38, p. 119-126, 1995. Disponível em: <doi:
1678 10.1016/0378-4320(94)01350-U>.

1679 TORRES-JÚNIOR, J. R. S., PIRES, M. F. A., SÁ, W. F. *et al.* Effect of maternal heat-stress on
1680 follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v. 69, p. 155-166,
1681 2008.

1682 TVDEN-NYBORG, P., PEURA, T. T., HARTWICH, K. M. *et al.* Morphological characterization
1683 of pre and peri-implantation *in vitro* cultured, somatic cell nuclear transfer and *in vivo* derived
1684 embryos. *Reproduction*, v. 130, p. 681-694, 2005.

1685 ULBERG, L. D. e BURFENING, P. J. Embryo death resulting from adverse environment on
1686 spermatozoa or ova. *J. Anim. Sci.*, v. 26, p. 571-577, 1967. Disponível em:
1687 <doi.org/10.2527/jas1967.263571x>.

1688 VAN SOOM, V., YSEBAERT, M., DE KRUIF, A. Relationship between timing of development,
1689 morula morphology and cell allocation of the inner cell mass and trophoectoderm in *in vitro*
1690 produced embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 47, p. 47-56, 1997.

1691 VASCONCELOS, J. L. M. Prejuízos evidentes na reprodução. *Rev. Leite Integ.*, 2015. Disponível
1692 em: < <http://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/prejuizos-evidentes-na-reproducao>>

1693 VEISSIER, I., VAN IAER, E., PALME, R. *et al.* Heat stress in cows at pasture and benefit of
1694 shade in a temperate climate region. *Int. J. Biometeorol.*, v. 62, p. 585-595, 2018. Disponível em:
1695 <doi.org/10.1007/s00484-017-1468-0>.

1696 WANG, F., TIAN, X., ZHOU, D. *et al.* Melatonin improves the quality of *in vitro* produced (IVP)
1697 bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance and modifications of
1698 relevant gene expression. *Plos ONE*, v. 9, p. 1-8, 2014a.

1699 WANG, F., TIAN, X., ZHANG, L. *et al.* Beneficial effect of Resveratrol on bovine oocyte
1700 maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, v. 101,
1701 2014b.

1702 WANG, Z., FU, C. e YU, S. Green tea polyphenols added to IVM and IVC media affect transcript
1703 abundance, apoptosis and pregnancy rates in bovine embryos. *Theriogenology*, v. 79, p. 186-192,
1704 2013.

1705 WANG, X., FALCONE, T., ATTARAN, M. *et al.* Vitamin C and Vitamin E supplementation
1706 reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate.
1707 *Fertil. Steril.*, v.78, p.1272-1277, 2002.

1708 WEST, J. W. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 86, n. 6, p.
1709 2131-2144, 2003.

1710 WHEELOCK, J. B., R. P., RHOADS, M. J., VANBAALE, S. R. *et al.* Effects of heat stress on
1711 energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p. 644–655, 2010.

1712 WOHLRES-VIANA, S., PEREIRA, M. M., VIANA, J. H. M. *et al.* Comparison of gene expression
1713 in *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Livestock Sci.*, v. 140, p. 62-67,
1714 2011.

1715 WILSON, S. J., MARION, R. S., SPAIN, J. N. *et al.* Effects of controlled heat stress on ovarian
1716 function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 2124–2131, 1998a.

1717 WILSON, S. J., KIRBY, C. J., KOENIGSFELD, A. T. *et al.* Effects of controlled heat stress on
1718 ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 2132–2138, 1998b.

1719 WOLFENSON, D., LEW, B. J., THATCHER, W. W. *et al.* Seasonal and acute heat stress effects
1720 on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 47, p. 9–19, 1997.

1721 YU, L., ADAMS, D., GABEL, M. Conjugated linoleic acid isomers differ in their free radical
1722 scavenging properties. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 4135-4140, 2002.

1723 ZERON, Y., OCHENRETNEY, A., KEDAR, O. *et al.* Seasonal changes in bovine fertility: relation
1724 to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of
1725 follicles. *Reproduction*, v. 121, p. 447-454, 2001.

1726 ZHANG, Y., HUANG, L., ZHANG, J. *et al.* Targeted disruption of HSF1 leads to lack of
1727 thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress inducible HSP molecular
1728 chaperones. *J. Cell. Biochem.*, v. 86, p. 376-393, 2002.

1729 ZHAO, K., REN, J., DU, W. *et al.* Effect of 5-aza-2'-deoxydyne on methylation of the putative
1730 imprinted control region of H19 during the *in vitro* development of vitrified bovine two-cell
1731 embryos. *Fert. Steril.*, v. 98, n. 1, p. 222-227, 2012.

1732 ZHOU, W., XIANG, T., WALKER, S. *et al.* Global gene expression analysis of bovine blastocysts
1733 produced by multiple methods. *Mol. Rep. Dev.*, v. 75, p. 744-758, 2008.

1734

6. CAPÍTULO II –

ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE OÓCITOS BOVINOS SUBMETIDOS A INIBIÇÃO MEIÓTICA COM BUTIROLACTONA I

Mitochondrial activity of bovine oocytes submitted to meiotic inhibition with Butyrolactone I

Ana Carolina Leite, Eliane Beatriz da Silva Magalhães, Teresa Rodrigues Passos, Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Alan Maia Borges

RESUMO

A qualidade do oócito bovino e a capacidade de sistemas de maturação *in vitro* de mimetizarem eventos fisiológicos são fatores determinantes da eficiência de produção de embriões *ex-vivo* e da sobrevivência pós-transferência. A pré-maturação *in vitro* com bloqueadores da meiose pode oferecer mais tempo para os oócitos acumularem moléculas importantes para o desenvolvimento embrionário inicial, melhorando potencialmente a eficiência de produção *in vitro* de embriões. Entretanto, a utilização de fármacos bloqueadores de meiose pode resultar em danos estruturais aos oócitos. No presente estudo, objetivou-se avaliar a concentração mais adequada de Butirolactona-I (BUT-I), inibidor da maturação espontânea *in vitro*, em promover o bloqueio reversível da meiose na pré-maturação e avaliar o efeito da distribuição e atividade de mitocôndrias em oócitos que tiveram a meiose bloqueada sobre os parâmetros relacionados com o desenvolvimento embrionário. Oócitos bovinos imaturos foram mantidos em estágio de vesícula germinativa (VG) por 12 horas, pela adição de BUT-I nas concentrações de 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M, respectivamente. Em seguida os oócitos foram submetidos à maturação *in vitro* por 24 horas em condições convencionais (38,5°C e 5% de CO₂). Na avaliação da maturação nuclear todas as concentrações de BUT-I avaliadas foram eficientes em manter os oócitos em prófase I durante as 12 horas de pré-maturação. Na maturação citoplasmática, apenas os tratamentos BUT 10 μ M e BUT 50 μ M conseguiram manter baixo percentual de oócitos com distribuição heterogênea de mitocôndrias, conforme esperado para oócitos imaturos. Quanto a avaliação da atividade mitocondrial de oócitos, os tratamentos BUT 50 μ M e BUT 100 μ M apresentaram padrão esperado para oócitos imaturos enquanto os tratamentos Controle no qual não houve bloqueio da maturação, BUT 10 μ M e BUT 25 μ M evidenciaram mitocôndrias mais ativas (18.094 \pm 6.611 px., 19.813 \pm 8.397 px., 36.809 \pm 15.682 px., 27.910 \pm 9.145 px. e 31.052 \pm 11.873 px. para os tratamentos BUT 50 μ M, BUT 100 μ M, Controle, BUT 10 μ M e BUT 25 μ M, respectivamente). A clivagem embrionária no tratamento BUT 50 μ M (92,5%) foi superior (P<0,05) às demais concentrações de BUT-I (60,6% para BUT 10 μ M; 31,29% para BUT

1767 25 μ M e 64,15% para BUT 100 μ M) e semelhante ao grupo Controle ($P>0,05$; 92,39%). Na
1768 produção de embriões em relação ao total de oócitos, o grupo Controle apresentou o maior
1769 desempenho ($P<0,05$; 62,6%), seguido pelo tratamento BUT 50 μ M que produziu mais embriões do
1770 que os outros tratamentos avaliados ($P<0,05$; 32,1% para BUT10 μ M, 17,6% para BUT25 μ M,
1771 50,5% para BUT50 μ M e 34,4% para BUT100 μ M). Apesar do encurtamento da maturação, como
1772 ocorre nos sistemas de produção *in vitro*, potencialmente derivar em danos estruturais aos oócitos, a
1773 inibição da maturação pela BUT-I na concentração de 50 μ M não incrementou a produção de
1774 embriões, resultando em taxas de blastocistos ligeiramente inferiores aos oócitos não submetidos à
1775 pré-maturação. As demais concentrações de BUT-I, apesar de terem sido eficientes em promover o
1776 bloqueio da maturação nuclear, resultam em menores taxas de produção de embrião. Destaca-se a
1777 mensuração da atividade mitocondrial como parâmetro para avaliação de inibição da meiose em
1778 oócitos bovinos.

1779

1780 **Palavras-chave:** bloqueio da meiose, Butirolactona I, desenvolvimento embrionário, maturação *in*
1781 *vitro*, oócito bovino.

1782

1783 **ABSTRACT**

1784 The quality of the bovine oocyte and the ability of in vitro maturation systems to mimic
1785 physiological events are determining factors in the efficiency of production of ex-vivo embryos and
1786 post-transfer survival. In vitro pre-maturation with meiosis blockers may offer more time for
1787 oocytes to accumulate important molecules for early embryonic development, potentially improving
1788 the efficiency of in vitro embryo production. However, the use of meiosis blocking drugs can result
1789 in structural damage to oocytes. In the present study, the objective was to evaluate the most
1790 appropriate concentration of Butyrolactone-I (BUT-I), an inhibitor of spontaneous in vitro
1791 maturation, in promoting reversible blocking of meiosis in pre-maturation and evaluating the effect
1792 of the distribution and activity of mitochondria in oocytes that had meiosis blocked on parameters
1793 related to embryonic development. Immature bovine oocytes were maintained in a germinal vesicle
1794 stage (GV) for 12 hours, by the addition of BUT-I in concentrations of 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M and
1795 100 μ M, respectively. Then the oocytes were subjected to in vitro maturation for 24 hours under
1796 conventional conditions (38.5°C and 5% CO₂). In the rating of nuclear maturation, all
1797 concentrations of BUT-I evaluated were efficient in maintaining oocytes in prophase I during the 12
1798 hours of pre-maturation. In cytoplasmic maturation, only the BUT 10 μ M and BUT 50 μ M
1799 treatments managed to maintain a low percentage of oocytes with heterogeneous distribution of
1800 mitochondria, as expected for immature oocytes. Regarding the assessment of mitochondrial
1801 activity of oocytes, the BUT 50 μ M and BUT 100 μ M treatments showed an expected pattern for
1802 immature oocytes while the Control treatments in which there was no maturation block, BUT 10 μ M
1803 and BUT 25 μ M showed more active mitochondria (18,094 \pm 6,611 px., 19,813 \pm 8,397 px., 36,809
1804 \pm 15,682 px., 27,910 \pm 9,145 px. And 31,052 \pm 11,873 px. For treatments BUT 50 μ M, BUT
1805 100 μ M, Control, BUT 10 μ M and BUT 25 μ M, respectively). Embryonic cleavage in the 50 μ M
1806 BUT treatment (92.5%) was higher (P <0.05) than the other BUT-I concentrations (60.6% for
1807 10 μ M BUT; 31.29% for 25 μ M BUT and 64.15% for 100 μ M BUT) and similar to Control group
1808 (P > 0.05; 92.39%). In the production of embryos in relation to the total oocytes, the Control group
1809 had the highest performance (P <0.05; 62.6%), followed by the BUT 50 μ M treatment that produced
1810 more embryos than the other treatments evaluated (P <0.05; 32.1% for BUT10 μ M, 17.6% for
1811 BUT25 μ M, 50.5% for BUT50 μ M and 34.4% for BUT100 μ M). Despite the shortening of
1812 maturation, as occurs in in vitro production systems, potentially resulting in structural damage to
1813 oocytes, the inhibition of maturation by BUT-I at a concentration of 50 μ M did not increase embryo
1814 production, resulting in blastocyst rates slightly lower than oocytes not subjected to pre-maturation.
1815 The other concentrations of BUT-I, despite being efficient in promoting the blocking of nuclear

1816 maturation, result in lower rates of embryo production. The measurement of mitochondrial activity
1817 stands out as a parameter for the evaluation of meiosis inhibition in bovine oocytes.

1818

1819 **Keywords:** *bovine oocyte, Butyrolactone I, embryo development, inhibition of meiosis, in vitro*
1820 *maturation.*

1821

1822 INTRODUÇÃO

1823 A maturação oocitária é um processo longo e complexo no qual ocorrem transformações no
1824 gameta feminino que são essenciais para diferenciação do oócito, fecundação e desenvolvimento
1825 embrionário inicial (Gilchrist *et al.*, 2008). Nas fêmeas bovinas a meiose tem início na fase fetal,
1826 período no qual ocorre síntese de DNA e formação de pares de cromossomos homólogos. Em
1827 seguida, oócitos imaturos permanecem estacionados no estágio dictiata da prófase I da meiose. O
1828 núcleo desses oócitos imaturos é denominado vesícula germinativa (VG), estágio no qual o núcleo é
1829 mantido até pouco antes da ovulação, quando os gametas femininos são estimulados a retomarem a
1830 divisão meiótica pelo pico de gonadotropinas (Bilodeau-Goeseels, 2012). Quando folículos
1831 pequenos, contendo oócitos imaturos, são estimulados a crescer, a retomada da meiose até o estágio
1832 de metáfase II tem a duração de aproximadamente quatro dias (Pavlok *et al.*, 1992).

1833 A progressão da meiose é caracterizada por três eventos principais: 1) maturação nuclear, no
1834 qual oócitos em vesícula germinativa são estimulados a retomarem a divisão meiótica, passando de
1835 Prófase I para a Metáfase II; 2) maturação citoplasmática, que é caracterizada pela redistribuição de
1836 organelas citoplasmáticas, incluindo mitocôndrias e estocagem de RNAm, que serão utilizados pós-
1837 fecundação e no início do desenvolvimento embrionário; e 3) maturação celular, que está associada
1838 ao desacoplamento das junções tipo *gap* entre o oócito e as células do *cumulus*, resultando em
1839 maior espalhamento dessas células, que é conhecido como expansão das células do *cumulus*
1840 (Gottardi e Mingoti, 2009).

1841 Quando o oócito é fisicamente retirado do folículo, a retomada da meiose ocorre
1842 espontaneamente, independentemente de gonadotropinas, devido à ausência de fatores foliculares
1843 inibidores deste processo. Em condições convencionais de maturação *in vitro*, a resolução da
1844 meiose ocorre em um período mais curto do que o fisiológico durando, em média, 24 horas. Sabe-se
1845 que altas concentrações intra-oocitárias de AMPc, que são acumuladas durante o crescimento e
1846 desenvolvimento natural do folículo, estão associadas a oócitos com alta competência de
1847 fecundação e sobrevivência embrionária subsequente (Luciano *et al.*, 1999). Por outro lado, após o
1848 pico pré-ovulatório de LH ou a remoção mecânica do oócito do folículo, concentrações de AMPc
1849 são reduzidas gradativamente resultando no fim do bloqueio da meiose (Richard e Sirard, 1996).
1850 Além disso, a perda de interação do oócito com as células foliculares resulta em prejuízos para a
1851 competência do oócito e para o desenvolvimento embrionário inicial, decorrente da diminuição das
1852 trocas hormonais e moleculares realizadas entre as células foliculares e o gameta.

1853 Foi hipotetizado que o impedimento da retomada da meiose, antes da maturação *in vitro*,
1854 possibilitaria incremento na competência de desenvolvimento posterior. Por conseguinte, para

1855 impedir o reinício voluntário da divisão meiótica é preciso manter altas concentrações intra-
1856 oocitárias de AMPc (Conti *et al.*, 2012). Algumas estratégias farmacológicas podem ser utilizadas
1857 para manter altas concentrações oocitárias de AMPc, impedindo a retomada da meiose. Dentre as
1858 drogas que podem ser utilizadas para o bloqueio da meiose, a Butirolactona I (BUT-I) demonstrou
1859 ser a mais segura e eficiente (Gottardi e Mingoti, 2009). A BUT-I é um metabólito secundário
1860 produzido pelo fungo *Aspergillus terreus* (Schimmel *et al.*, 1998) e, em mamíferos, ela atua como
1861 inibidor seletivo de quinases dependentes de ciclina, que promove o bloqueio da meiose por inibir
1862 tanto a CDK1 quanto a CDC2 quinase. Este composto inibe a quebra da vesícula germinativa,
1863 porém, os oócitos continuam sintetizando RNAr, e a síntese diminui apenas quando há compactação
1864 da cromatina (Marques *et al.*, 2011).

1865 Muitos trabalhos demonstraram a eficiência da BUT-I em promover o bloqueio reversível da
1866 meiose, porém não houve incremento significativo da produção ou qualidade embrionária (Kubelka
1867 *et al.*, 2000; Ponderato *et al.*, 2001; Adona *et al.*, 2008; Maziero *et al.*, 2019). Loonergan *et al.*
1868 (2003) demonstraram que o bloqueio da meiose com fármacos inibidores de quinases dependentes
1869 de ciclina (CDK) podem causar danos ultraestruturais em oócitos. Diante disso, visando
1870 incrementar a produção de embriões a partir de oócitos submetidos à pré-maturação com BUT-I,
1871 torna-se necessário determinar uma concentração de BUT-I que seja eficiente no bloqueio da
1872 meiose sem danificar a distribuição, estrutura e funcionalidade de organelas citoplasmáticas.

1873 Os objetivos desse trabalho foram determinar a concentração de BUT-I mais adequada para
1874 promover o bloqueio reversível da meiose, possibilitando mais tempo para os oócitos acumularem
1875 moléculas importantes para o desenvolvimento embrionário inicial, melhorando potencialmente a
1876 eficiência de produção *in vitro* de embriões bovinos. Especificamente o presente estudo visa avaliar
1877 o efeito da distribuição e atividade de mitocôndrias de oócitos que tiveram a meiose bloqueada
1878 sobre os parâmetros relacionados com a reversão do bloqueio e o desenvolvimento embrionário
1879 subsequente.

1880

1881 MATERIAL E MÉTODOS

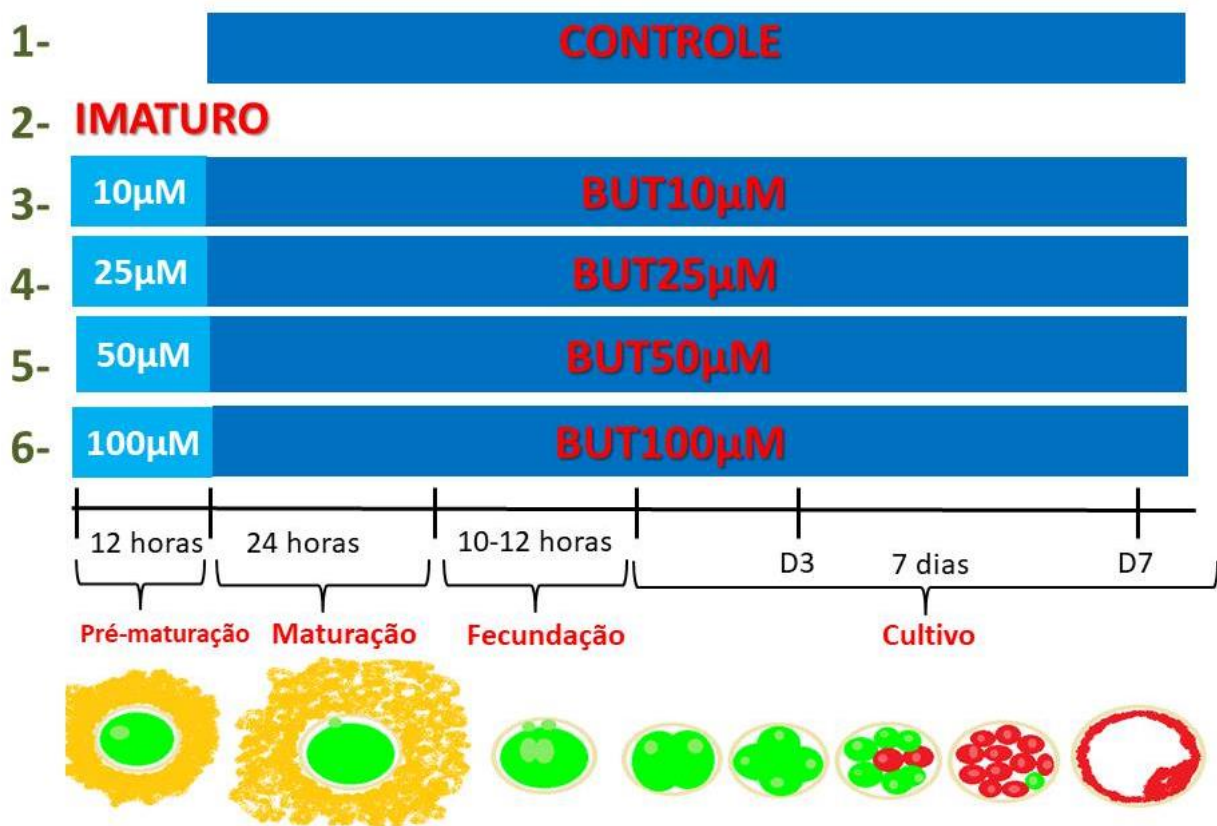
1882 O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões da Escola de
1883 Veterinária da UFMG, durante o período de junho de 2017 a fevereiro de 2018. Todos os
1884 procedimentos adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG
1885 (Protocolo nº 129/2017). Todos os reagentes utilizados no trabalho foram adquiridos da Sigma®
1886 Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), exceto quando explicitado.

1887 Foram utilizados oócitos bovinos obtidos de ovários provenientes de fêmeas mestiças
1888 leiteiras, coletados em abatedouro da região metropolitana de Belo Horizonte, com habilitação do
1889 Serviço de Inspeção Federal. Os ovários coletados foram transportados até o laboratório em solução
1890 fisiológica (0,9% de NaCl) aquecida entre 30 e 35°C, em tempo não superior a quatro horas após o
1891 término do abate. Os folículos com diâmetro entre 3 e 8mm foram puncionados com o auxílio de
1892 seringa e agulha descartáveis. O líquido folicular, recuperado da aspiração, foi colocado em tubo
1893 cônico de 50mL e mantido em banho-maria a 37°C para sedimentação dos complexos *cumulus-*
1894 *oophorus* (CCOs) por dez minutos. Em seguida, os CCOs foram rastreados e classificados em
1895 relação à qualidade do citoplasma (homogeneidade, coloração e presença de granulações) e número
1896 de camadas de células do *cumulus*, com auxílio de um microscópio estereoscópico.

1897 CCOs graus I e II selecionados para a maturação foram lavados em meio TCM-199 Hepes
1898 (Gibco® Life Technologies, Grand Island, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino
1899 (SFB - Gibco® Life Technologies, Grand Island, USA), 83,4 µg/mL de amicacina, e 22µg/mL de
1900 piruvato, e sequencialmente foram distribuídos em seis grupos: Grupo Controle, no qual os oócitos
1901 foram submetidos à *maturação in vitro* (MIV) por 24 horas em estufa incubadora a 38,5°C, com 5%
1902 de CO₂ em ar atmosférico e umidade saturada, em meio base de TCM-199 bicarbonato (Gibco®
1903 Life Technologies, Grand Island, USA) acrescido de 10% de SFB, 0,5µg/mL de FSH (Folltropin-
1904 V®, Bioniche Inc., Canadá), 5g/mL de LH (Lutropin-V®, Bioniche Inc., Canadá), 10µg/mL de
1905 estradiol, 22µg/mL de piruvato e 83,4µg/mL de amicacina; grupo Imaturo no qual os oócitos foram
1906 fixados em formaldeído 3,7% imediatamente após a aspiração, não sendo submetidos à maturação e
1907 produção de embrião; e os grupos BUT 10µM; BUT 25µM; BUT 50µM e BUT 100µM que foram
1908 compostos por oócitos imaturos mantidos por 12 horas em meio de maturação (Maziero, *et al.*,
1909 2019) adicionado de 10µM, 25µM, 50µM e 100µM de Butirolactona I (BUT-I; Enzo® Life
1910 Sciences, PA, USA - ML-CC210-1000), respectivamente, para inibição da maturação nuclear. Em
1911 seguida os oócitos foram submetidos à maturação por 24 horas em condições convencionais,
1912 conforme descrito anteriormente para o tratamento Controle. Os tratamentos experimentais foram
1913 representados na Figura 1.

1914

1915



1916

1917 **Figura 1.** Delineamento esquemático dos grupos experimentais.

1918

1919 Para a fecundação *in vitro* (FIV) utilizou-se sêmen de touro da raça Holandesa, previamente
 1920 avaliado quanto à fertilidade em sistemas de produção *in vitro*. Foi utilizado apenas um touro e uma
 1921 partida de sêmen durante todo o experimento. A seleção de espermatozoides viáveis para a FIV foi
 1922 realizada utilizando-se o método do gradiente descontínuo de *Percoll* e o *pellet* resultante da
 1923 centrifugação foi lavado em meio de capacitação espermática (TALP), e a concentração foi ajustada
 1924 para 1×10^6 espermatozoides/mL para a fecundação de grupos de 20 a 25 oócitos. O meio de FIV
 1925 utilizado foi constituído por FERT-TALP (Parrish *et al.*, 1995) suplementado com amicacina
 1926 (83,4µg/mL), penicilamina (27µg/mL), hipotaurina (1µg/mL), epinefrina (0,3µg/mL), albumina
 1927 sérica bovina (5µg/mL), piruvato (22µg/mL) e heparina (10µg/mL). Os CCOs foram fecundados e
 1928 incubados nas mesmas condições da MIV, por um período de 10 a 12 horas, sendo o dia da
 1929 fecundação considerado o D0.

1930 Após a FIV, os prováveis zigotos foram debridados das células do *cumulus*, utilizando-se
 1931 micropipeta automática e, posteriormente, estes foram submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV), em
 1932 meio *Synthetic Oviduct Fluid Medium* (SOF) suplementado com 0,5% de albumina sérica bovina

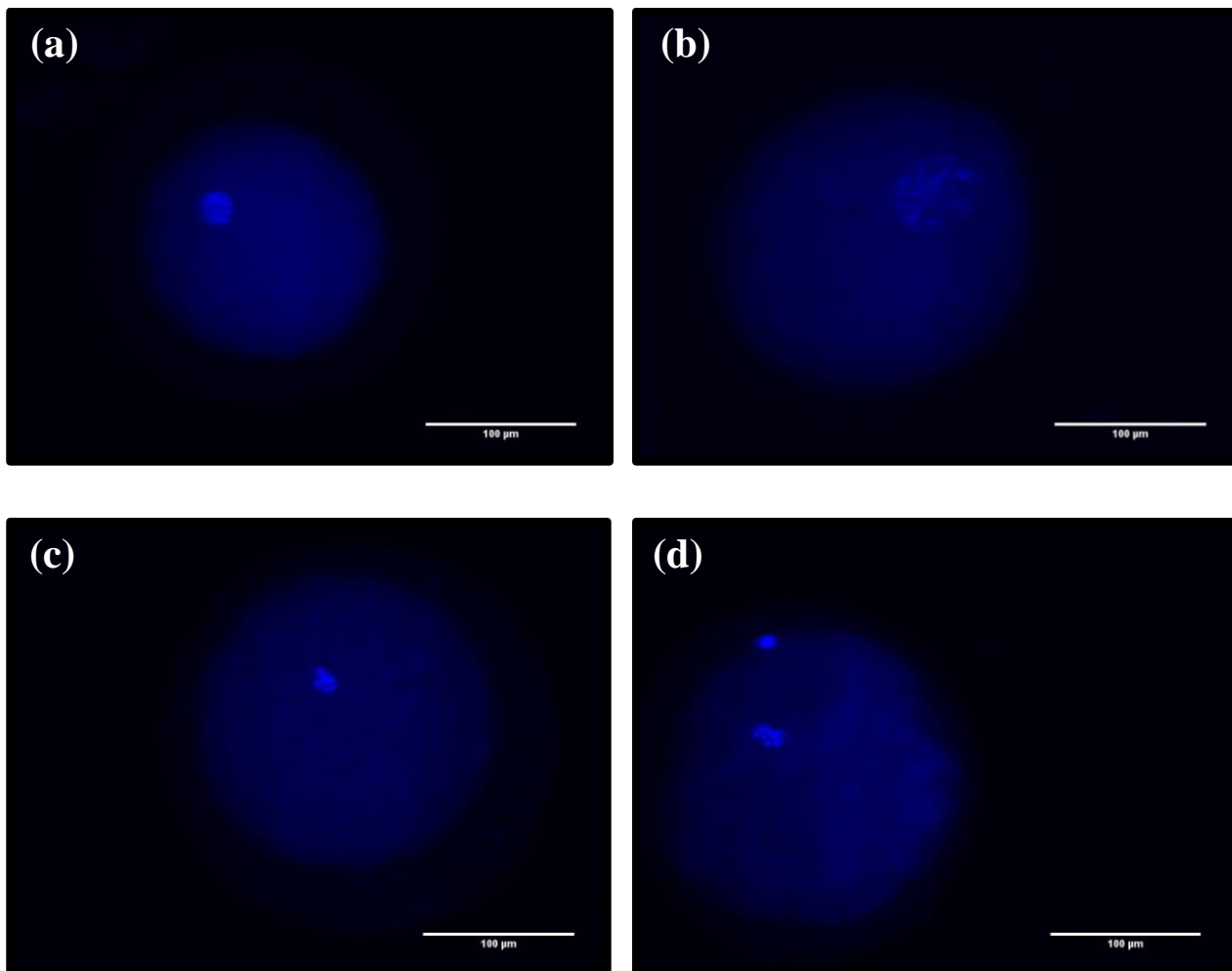
1933 (BSA) e 2,5% de soro fetal bovino (SFB). No D3 foi avaliada a taxa de clivagem e no D7 foi
1934 avaliada a produção de blastocistos de cada tratamento.

1935 Para avaliação da taxa de maturação oocitária foi realizada a verificação da expansão das
1936 células do *cumulus*, da configuração cromossômica e do padrão de distribuição mitocondrial,
1937 seguindo os parâmetros adotados pela *International Embryo Technology Society* (IETS – Stringfellow
1938 e Givens, 2010).

1939 Para a verificação da eficiência das diferentes concentrações de Butirolactona I em
1940 bloquearem a retomada da meiose, foi realizada a coloração dos oócitos para determinar a
1941 maturação nuclear e citoplasmática, de acordo com a metodologia proposta por Jeseta *et al.* (2014).
1942 Para tal, os oócitos foram incubados por 30 minutos à 38,5°C a 5% CO₂ com *Dulbecco Phosphate*
1943 *Buffered Saline* (DPBS) suplementado com 4mg/mL de BSA e 280nM de *Mitotracker Orange*
1944 (Life® Technologies, Carlsbad, CA, USA). Na técnica de avaliação utilizada no trabalho, apenas
1945 mitocôndrias fisiologicamente ativas são coradas. Após a lavagem, os oócitos passaram pelo
1946 processo de remoção das células do *cumulus* por agitação mecânica. Em seguida os oócitos foram
1947 fixados em formaldeído 3,7%, por 60 minutos, à temperatura ambiente. Após a fixação, os oócitos
1948 foram lavados novamente e colocados sobre lâmina e, em seguida, foram cobertos com gota de
1949 meio de montagem de lâmina contendo 10µg/mL de Hoechst 33342 em glicerol, objetivando
1950 marcar a configuração cromossômica para determinação da maturação nuclear.

1951 A configuração da cromatina foi avaliada em microscópio de epifluorescência Leica
1952 DM4000 B (Leica® Microsystems versão 4.8.0, Suíça), com filtro de excitação de 365nm e de
1953 emissão de 420nm. Os oócitos foram classificados em Prófase I (PI), Metáfase I (MI), Metáfase II
1954 (MII), conforme demonstrado na figura 1. Para determinação da atividade mitocondrial, os oócitos
1955 foram avaliados em microscópio confocal Zeiss LSM 5 Live (Carl Zeiss®, Jena, Thuringia,
1956 Germany - onda emissão de 543nm e onda de excitação de 585 a 649nm). O padrão de distribuição
1957 mitocondrial foi definido como: distribuição homogênea das mitocôndrias por todo oócito,
1958 distribuição heterogênea das mitocôndrias pelo citoplasma e distribuição periférica das
1959 mitocôndrias, seguindo o padrão adotado por Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2011).

1960



1961 **Figura 2.** Oócitos bovinos. Fotomicrografias obtidas em microscópio de epifluorescência das diversas fases
1962 da maturação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342. (a) Oócitos em vesícula germinativa
1963 (VG - Prófase I da meiose): cromossomos descondensados; (b) Quebra da vesícula germinativa (QVG); (c)
1964 Oócitos em metáfase I: cromossomos altamente condensados; (d) Oócitos em metáfase II: cromossomos
1965 condensados na placa metafásica e extrusão do primeiro corpúsculo polar.
1966

1967 Os oócitos foram considerados unidades experimentais e cada bateria de maturação ou
1968 produção de embrião foi considerada uma repetição. As fontes de variação no modelo, incluindo
1969 tratamento e réplicas, foi considerado efeito fixo e aleatório, respectivamente. Os resultados de
1970 taxas de clivagem e de produção de embrião, segundo rotina laboratorial, foram considerados
1971 réplicas, enquanto as avaliações de maturação oocitária (configuração cromossômica e distribuição
1972 mitocondrial) foram analisadas para cada oócito separadamente. Os dados foram submetidos aos
1973 testes Kolmogorov-Smirnov e Cochran e Bartlett para verificação de normalidade e
1974 homocedasticidade, respectivamente, antes de serem submetidos à análise de variância, utilizando-
1975 se o nível de significância de 5%. O programa de estatística utilizado para comparação dos

1976 resultados obtidos no presente trabalho foi o *GraphPad Instat*[®] 3.0. Para os resultados de embriões
 1977 clivados, produção de embriões em relação ao total de clivados, e produção de embriões em relação
 1978 ao total de oócitos inseminados foi utilizado o teste Qui-quadrado. Para as avaliações de maturação
 1979 oocitária foi utilizado o teste Exato de Fisher.

1980

1981 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1982 A tabela 1 contém os resultados de maturação nuclear, avaliada por meio da configuração
 1983 cromossômica dos oócitos, e da maturação citoplasmática obtida pela distribuição de mitocôndrias
 1984 ativas no gameta feminino. Todas as concentrações de BUT-I testadas foram eficientes em
 1985 manterem os oócitos em Prófase I da meiose, assim como observado no controle negativo (grupo
 1986 imaturo). Adicionalmente, foi encontrado que o tratamento BUT 50µM não apresentou nenhum
 1987 oócito maduro ao fim do período de bloqueio da meiose, assim como o grupo de imaturo (P>0,05),
 1988 refletindo a eficiência desta concentração da BUT-I em promover o bloqueio da divisão meiótica.

1989

1990 **Tabela 1.** Configuração cromossômica (maturação nuclear) e padrão de distribuição mitocondrial
 1991 (maturação citoplasmática) de oócitos bovinos imaturos cultivados em diferentes concentrações de
 1992 Butirolactona I (BUT 10µM; BUT 25µM; BUT 50µM e BUT 100µM), e em oócitos submetidos à maturação
 1993 *in vitro* em condições convencionais (Controle).

Tratamento	Maturação Nuclear			Maturação Citoplasmática		
	PI	MI	MII	Homogênea	Heterogênea	Periférica
Controle (n=24)	0,0% b	12,5%	87,5% c	0,0% b	94,4% c	5,6% a
Imaturo (n=15)	80,0% a	20,0%	0,0% a	0,0% b	28,6% a,b	71,4% c
BUT 10µM (n=14)	42,8% a	28,6%	28,6% b	41,7% a	16,6% a	41,7% b,c
BUT 25µM (n=16)	56,3% a	31,2%	12,5% a,b	13,3% a,b	46,7% b,c	40,0% b,c
BUT 50µM (n=15)	80,0% a	20,0%	0,0% a	41,7% a	16,6% a	41,7% b,c
BUT 100µM (n=13)	46,1% a	38,5%	15,4% a,b	25,0% a,b	66,7% b,c	8,3% a

1994

1995 Dados foram expressos em porcentagem (número oócitos classificados/total analisados).

1996 PI (Prófase I); MI (Metáfase I); MII (Metáfase II); Homogênea (Distribuição homogênea das mitocôndrias);
 1997 Heterogênea (Distribuição heterogênea das mitocôndrias); Periférica (Distribuição periférica das
 1998 mitocôndrias); FEF (Frac emissão de fluorescência).

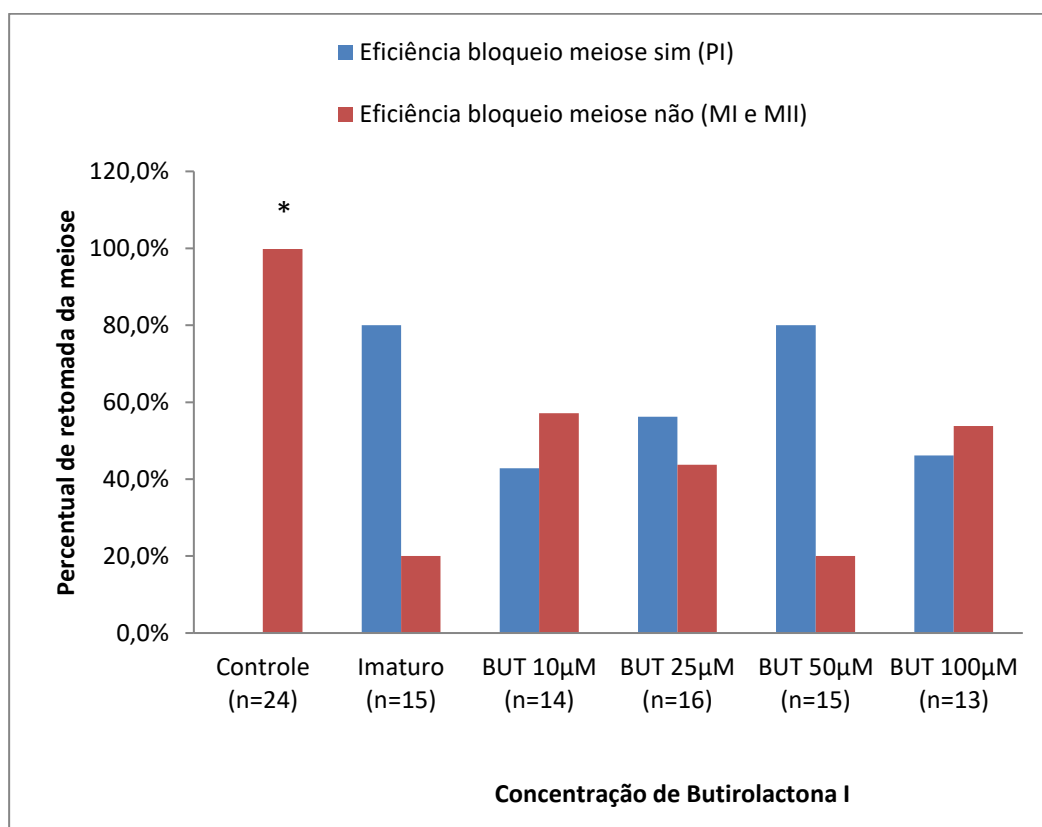
1999 Distribuição de mitocôndrias homogênea ou periférica = oócito imaturo; Distribuição heterogênea de
 2000 mitocôndrias= oócito maturado;

2001 BUT 10 μ M, BUT 25 μ M, BUT 50 μ M e BUT 100 μ M: oócitos cultivados durante 12 horas em meio de
2002 maturação acrescido respectivamente de 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M de Butirolactona I (Enzo® Life
2003 Sciences, PA, USA).
2004 Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre si (P<0,05), de acordo com o teste Exato de
2005 Fisher.

2006

2007 A figura 3 demonstra a eficiência da inibição da retomada da meiose dos oócitos e a Figura
2008 4 representa a eficiência de manutenção dos oócitos com distribuição de mitocôndrias característica
2009 de imaturidade, por meio de meios contendo diferentes concentrações de BUT-I.

2010



2011

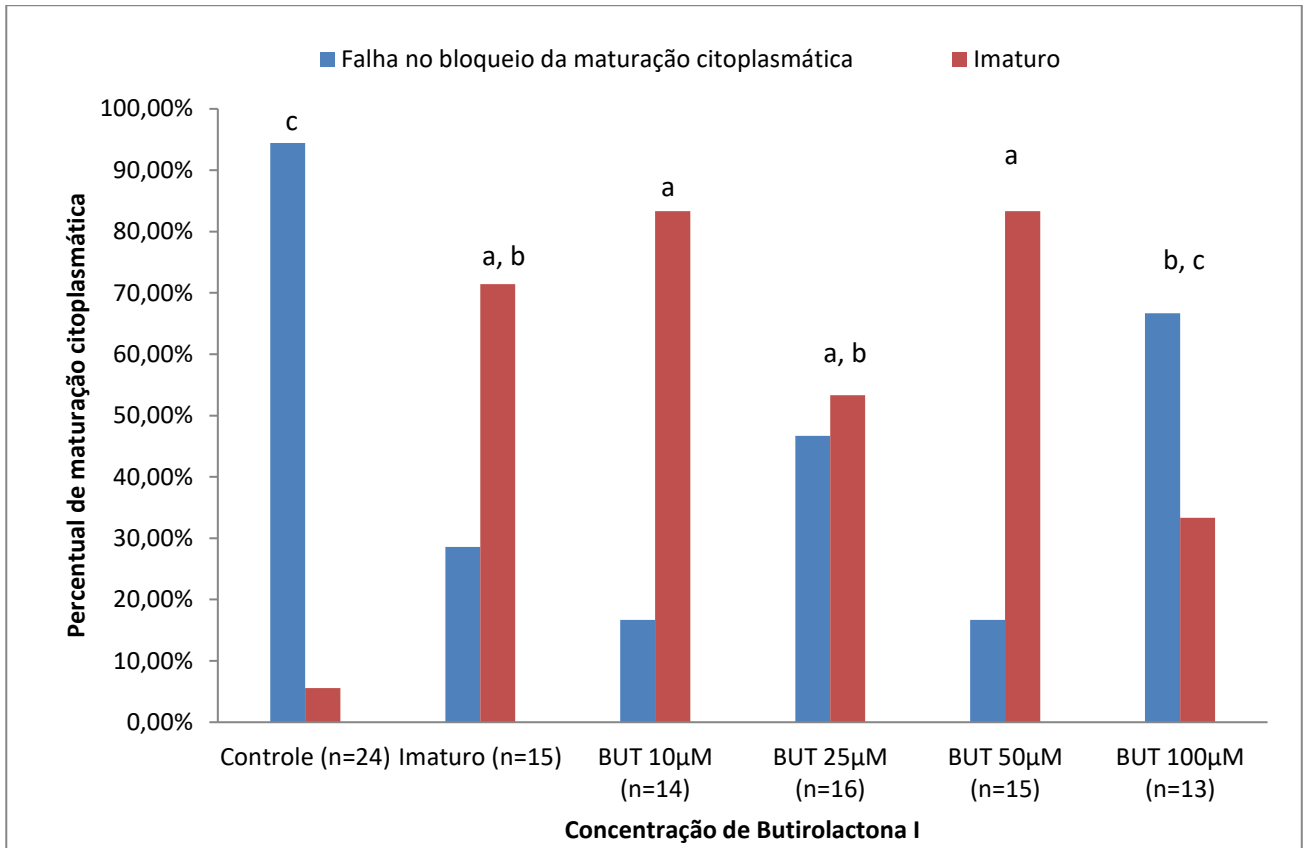
2012 **Figura 3.** Taxas de bloqueio da retomada da meiose em oócitos bovinos cultivados em diferentes
2013 concentrações de Butirolactona I (BUT 10 μ M; BUT 25 μ M; BUT 50 μ M e BUT 100 μ M). Imaturo (Prófase
2014 I); Falha no bloqueio da maturação: oócitos em MI (Metáfase I) ou MII (Metáfase II). O asterisco indica que
2015 o resultado diferiu dos demais (P<0,05), de acordo com o teste Exato de Fisher.

2016

2017 Em relação à maturação nuclear, todas as concentrações de BUT-I avaliadas apresentaram
2018 desempenho semelhante na manutenção dos oócitos em Profase I da meiose (P>0,05). Foi
2019 considerado como falha no bloqueio da maturação quando os oócitos avaliados foram encontrados

2020 no estágio de Metáfase I ou Metáfase II. Também não houve diferença entre os tratamentos
2021 (Imaturo, BUT 10 μ M, BUT 25 μ M, BUT 50 μ M e BUT 100 μ M) em relação à falha no bloqueio da
2022 maturação.

2023



2024

2025 **Figura 4.** Taxas de maturação citoplasmática em oócitos bovinos cultivados em diferentes concentrações de
2026 Butirolactona I (BUT 10 μ M; BUT 25 μ M; BUT 50 μ M e BUT 100 μ M). Imaturo (Distribuição homogênea ou
2027 periférica de mitocôndrias); Falha no bloqueio da maturação (Distribuição heterogênea de mitocôndrias).
2028 Letras diferentes indicam diferenças entre si (P<0,05), de acordo com o teste Exato de Fisher.

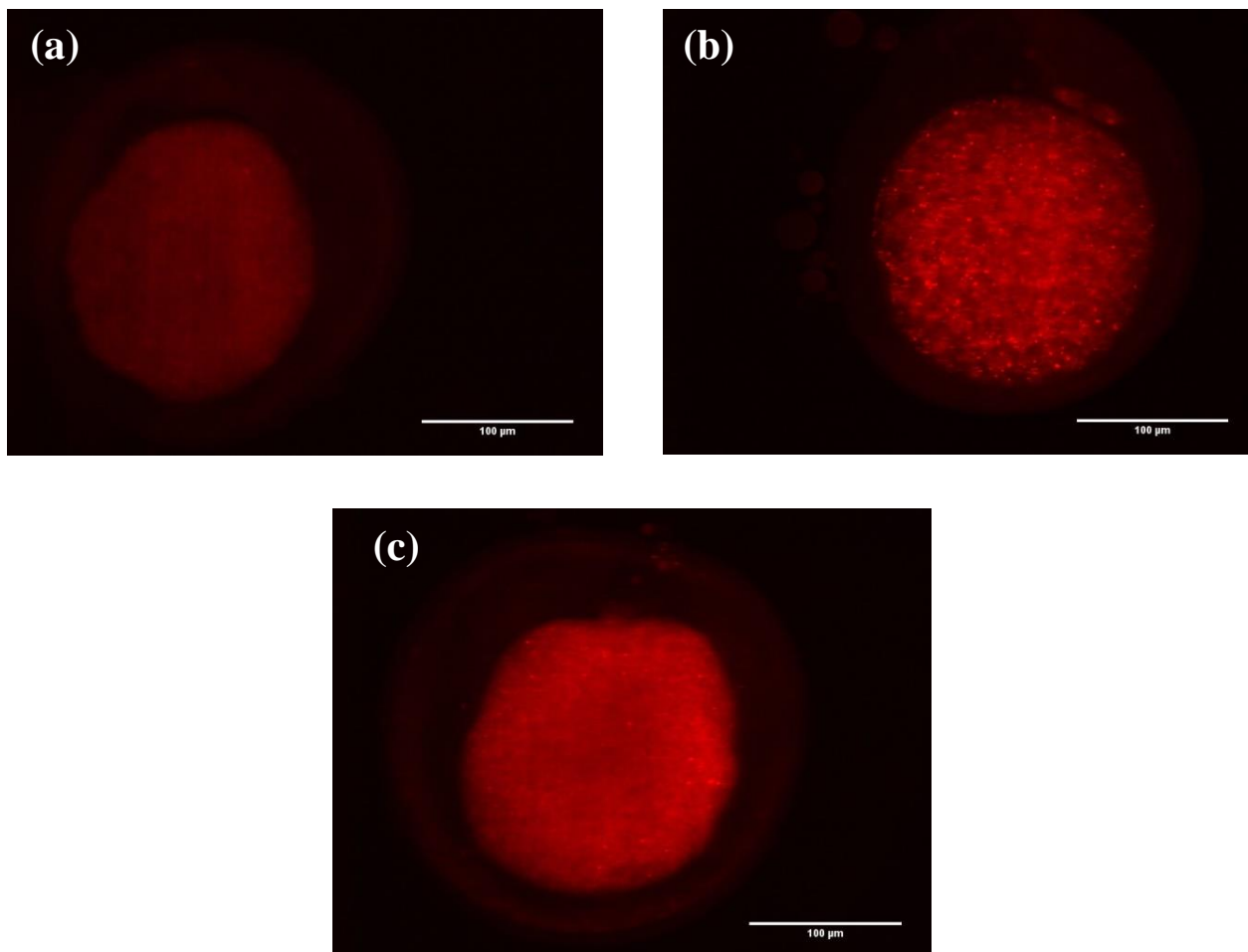
2029

2030 Na maturação citoplasmática os tratamentos BUT 10 μ M e BUT 50 μ M foram mais eficientes
2031 em manter distribuição de mitocôndrias esperada para oócitos imaturos, apresentando um elevado
2032 número de oócitos com distribuição homogênea ou periférica de mitocôndrias, associado a reduzido
2033 número de oócitos com mitocôndrias dispersas no citoplasma. O padrão de distribuição de
2034 mitocôndrias, característico de oócitos imaturos e maturados, pode ser visualizado nas figuras 4 e 5.

2035 Foi sugerido que para promover o bloqueio reversível da meiose em oócitos bovinos é
2036 necessário adicionar doses elevadas (100 μ M) de BUT-I ao meio de cultivo (Lonergan *et al.*, 2003).
2037 No entanto, assim como o encontrado no presente estudo, Kubelka *et al.* (2000) encontraram que o
2038 bloqueio da meiose com 100 μ M de BUT-I não preveniu a condensação cromossômica. Ponderato *et*

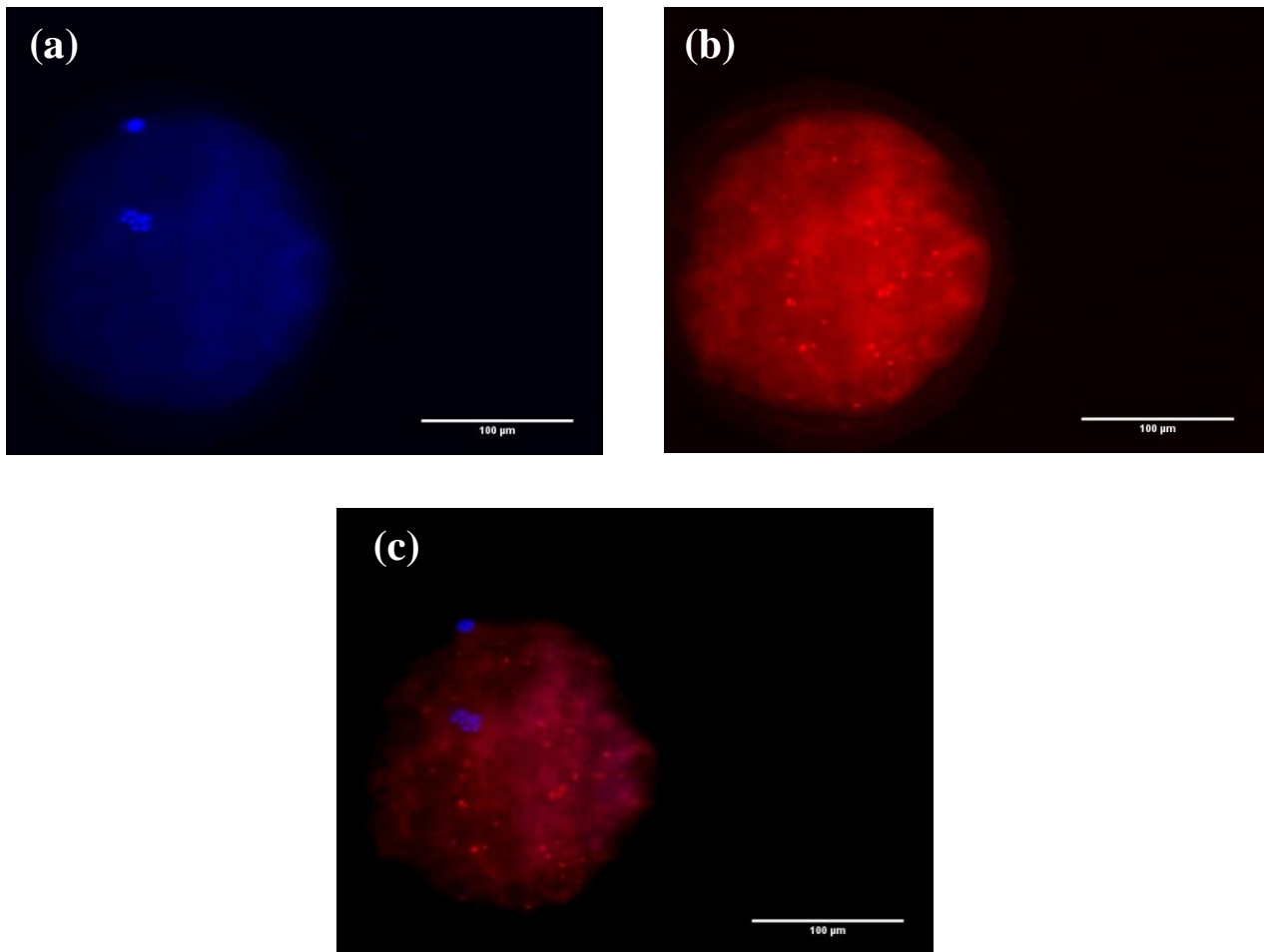
2039 *al.* (2002) e Maziero (2019) encontraram efeito inibitório eficiente utilizando-se 50 μ M de BUT-I,
2040 semelhante ao observado no presente estudo.

2041



2042 **Figura 4.** Oócitos bovinos. Imagens de microscopia confocal do plano equatorial dos oócitos bovinos
2043 mostrando o padrão de distribuição citoplasmática das mitocôndrias marcadas com o *MitoTracker Orange*.
2044 (a) Padrão homogêneo em oócitos imaturos; (b) Padrão heterogêneo em oócitos maturados; (c) Distribuição
2045 periférica em oócitos maturados. (Aumento de 400x).

2046



2047 **Figura 5.** Oócitos bovinos. Fotomicrografia representativa da microscopia de fluorescência demonstrando
2048 oócitos na fase de Metáfase II. (a) Marcação da cromatina com Hoechst 33342, diferenciando os
2049 cromossomos condensados e a extrusão do corpúsculo polar; (b) Padrão de distribuição das mitocôndrias no
2050 interior do ooplasma; (c) Sobreposição das imagens (Aumento de 400x).
2051

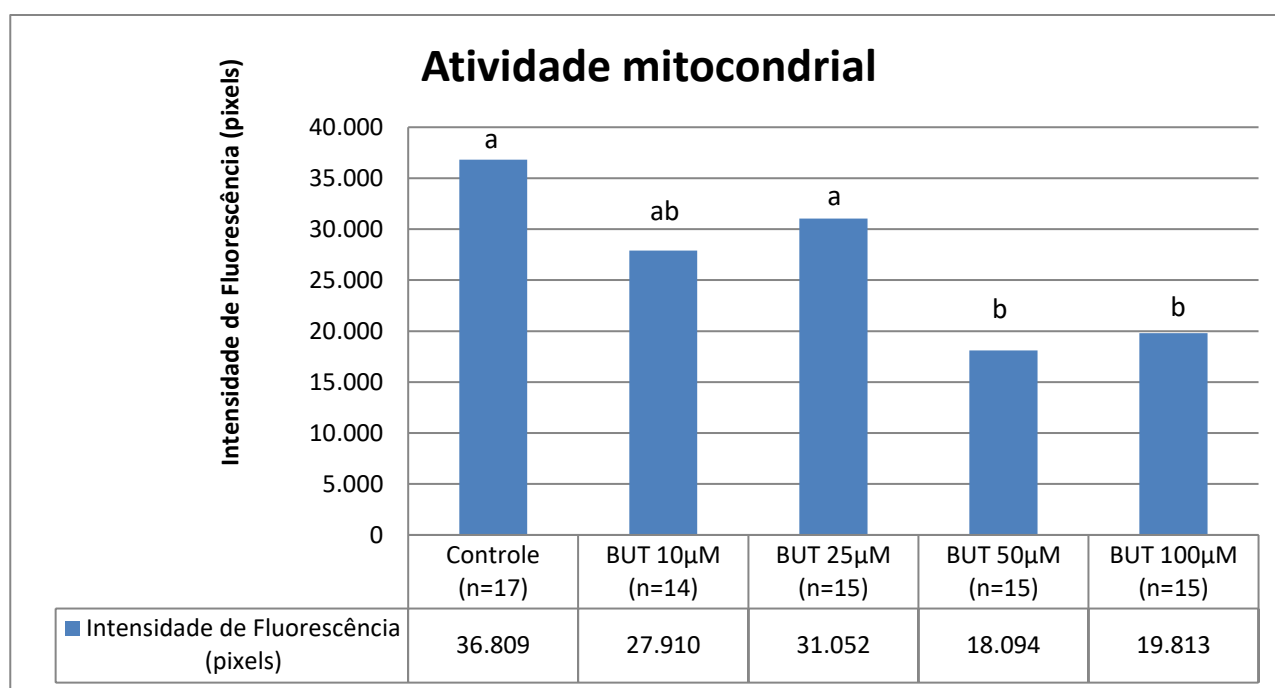
2052 A localização das organelas no citoplasma está relacionada com as necessidades do oócito
2053 em cada estágio de desenvolvimento. Durante a maturação, a movimentação das mitocôndrias para
2054 regiões de maior demanda por substratos energéticos é essencial para o sucesso do ciclo celular
2055 (Jeseta *et al.*, 2014; Landim-Alvarenga e Maziero, 2014). Oócitos de baixa qualidade apresentam
2056 falhas na translocação de mitocôndrias da periferia para o centro do oócito, durante a maturação *in*
2057 *vitro* (Stojkovic *et al.*, 2001). Por outro lado, a distribuição heterogênea ou a formação de agregados
2058 de mitocôndrias em oócitos maturados *in vitro* é uma característica de oócitos saudáveis e de boa
2059 competência de desenvolvimento (Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2011; Jeseta *et al.*, 2014). Jeseta *et*
2060 *al.* (2014) também encontraram que a capacidade de completar a maturação nuclear foi reduzida em
2061 oócitos menos competentes em comparação com as outras categorias de oócitos, e esse achado

2062 esteve associado à perda precoce da comunicação entre o oócito e as células do *cumulus* em
2063 gametas atrésicos.

2064 A avaliação da sincronia entre a segregação cromossômica e a reorganização das organelas
2065 no citoplasma é importante porque a retomada espontânea da meiose, induzida pela remoção do
2066 oócito do folículo ovariano, pode ocasionar assincronia entre os processos de amadurecimento
2067 nuclear e citoplasmático do gameta, resultando em prejuízos à produção de embriões (Huang *et al.*,
2068 2013).

2069 Oócitos bovinos submetidos ao bloqueio farmacológico da meiose por diferentes
2070 concentrações de BUT I apresentaram redução progressiva de atividade mitocondrial à medida que
2071 se aumentou as concentrações do bloqueador ($P < 0,05$) conforme representado na Figura 6. Os
2072 tratamentos BUT 50 μ M e BUT 100 μ M apresentaram menor atividade mitocondrial (BUT 50 μ M
2073 18.094 \pm 6.611 px. e BUT 100 μ M 19.813 \pm 8.397 px.) comparativamente ao Controle (36.809 \pm 15.682
2074 px.) e à concentrações mais baixas de Butirolactona (27.910 \pm 9.145 px. para BUT 10 μ M e
2075 31.052 \pm 11.873 px. para BUT 25 μ M).

2076



2077

2078 **Figura 6.** Atividade mitocondrial em oócitos bovinos cultivados em diferentes concentrações de
2079 Butirolactona I (BUT 10 μ M; BUT 25 μ M; BUT 50 μ M e BUT 100 μ M). Controle: oócitos submetidos à
2080 maturação sem pré-maturação prévia. Letras diferentes indicam diferenças entre si ($P < 0,05$), de acordo com
2081 o teste Newman Keuls.

2082

2083

2084 A quantidade e a atividade de mitocôndrias no citoplasma do oócito bovino está diretamente
2085 relacionado à qualidade do oócito devido ao papel fundamental das mitocôndrias na maturação. A
2086 suplementação de oócitos humanos e bovinos de baixa qualidade com citosol ou com mitocôndrias
2087 isoladas parece aumentar a competência oocitária (Huang et al., 1999; Lanzendorf et al., 1999; Hua
2088 et al., 2007; Chiaratti et al., 2011).

2089 Oócitos imaturos, presentes em folículos pré-antrais ou em pequenos folículos antrais
2090 apresentam grande quantidade de mitocôndrias, que se apresentam com morfologia esférica e baixa
2091 atividade metabólica. Durante a maturação, há diminuição do número de mitocôndrias, essas
2092 tornam-se mais alongadas e associam-se com gotículas lipídicas, formando unidades metabólicas
2093 que são as principais responsáveis por suprir a demanda energética do gameta (Fair *et al.*, 1997).
2094 Portanto, a diminuição da atividade mitocondrial dos grupos BUT 50 μ M e BUT 100 μ M em relação
2095 ao Controle e aos tratamentos expostos a baixas concentrações de BUT I está relacionado ao estado
2096 de imaturidade dos oócitos tratados com concentrações mais elevadas do bloqueador, não
2097 necessariamente com a redução da qualidade destas estruturas.

2098 Os resultados da eficiência dos oócitos pré-maturados em meio contendo diferentes
2099 concentrações de BUT-I de adquirirem plena competência, reassumirem a meiose e produzirem
2100 embriões com características normais de desenvolvimento estão apresentados na tabela 2.

2101

2102 **Tabela 2.** Efeito da adição de diferentes concentrações de Butirolactona I ao meio de maturação, sobre os
2103 parâmetros relacionados à produção *in vitro* de embriões bovinos.

Tratamento	Total oócitos (n)	Taxa de Clivados (%)	Produção de embriões/clivados (%)	Produção de embriões/total oócitos (%)
Controle	214	92,4% a	70,6% a	62,6% a
BUT 10μM	190	60,6% b	58,8% b,c	32,1% c
BUT 25μM	193	31,3% c	47,1% c	17,6% d
BUT 50μM	190	92,5% a	58,1% b,c	50,5% b
BUT 100μM	189	64,2% b	63,7% a,b	34,4% c
Total	976	68,8%	62,0%	40,0%

2104 Dados foram expressos em porcentagem (número oócitos classificados/total analisados).

2105 BUT 10 μ M, BUT 25 μ M, BUT 50 μ M e BUT 100 μ M: oócitos cultivados durante 12 horas em meio de
2106 maturação acrescido respectivamente de 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M de Butirolactona I (Enzo® Life
2107 Sciences, PA, USA).

2108 Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre si (P<0,05), de acordo com o teste Qui-
2109 Quadrado.

2110

2111 Conforme observado na tabela 2, a clivagem embrionária no tratamento BUT 50 μ M foi
2112 superior (P<0,05) às demais concentrações de BUT-I, e semelhante ao grupo Controle (P>0,05),
2113 indicando que 50 μ M de BUT-I otimizou a capacitação dos oócitos, resultando em boa taxa de
2114 fecundação. A produção de embriões/clivados foi superior (P<0,05) nos tratamentos BUT 10 μ M e
2115 BUT 50 μ M em relação às demais concentrações de BUT-I, e inferiores (P<0,05) ao grupo Controle.
2116 Na produção de embriões em relação ao total de oócitos, o grupo Controle apresentou a maior
2117 (P<0,05) taxa de produção de embriões, seguido pelo tratamento BUT 50 μ M que produziu mais
2118 embriões (P<0,05), quando comparado com os demais tratamentos avaliados.

2119 Nos últimos anos foram desenvolvidos diversos estudos com o objetivo de estabelecer
2120 métodos de bloqueio transitório da retomada da meiose *in vitro*. Um dos estudos pioneiros que
2121 trabalharam com BUT-I encontrou que concentrações de 100 μ M e 150 μ M foram capazes que
2122 bloquear a meiose por 24 horas, sem comprometer a produção de embriões. No entanto, as
2123 estruturas tratadas com BUT-I foram menos resistentes à vitrificação (Lonergan *et al.*, 2000).
2124 Outros autores trabalharam com bloqueio da meiose por períodos tão longos quanto 24 horas
2125 (Kubelka *et al.*, 2000; Ponderato *et al.*, 2001), encontrando produções de embriões semelhantes à de
2126 oócitos não submetidos à pré-maturação. Nesses trabalhos foi avaliada apenas a produção, porém, a
2127 qualidade dos embriões não foi avaliada. Lonergan e colaboradores (2003) encontraram que o
2128 tratamento de oócitos com 100 μ M de BUT-I por 24 horas interferiu com a integridade das células
2129 do *cumulus* o que afetou a expansão, causou degeneração dos grânulos corticais, e interferiu na
2130 morfologia da membrana nuclear. Ao contrário do encontrado no passado, os trabalhos atuais
2131 mostram baixas taxas de produção de embriões utilizando binômio de tempo e concentração de
2132 BUT-I, tão longos quanto os trabalhos citados anteriormente (Maziero, 2019) e, provavelmente,
2133 estes resultados estejam relacionados às alterações nos meios de produção de embriões que ocorreu
2134 ao longo dos anos.

2135 Maziero (2019) adicionou a BUT-I e Roscovitina (ROSCOV), ambos fármacos inibidores de
2136 CDKs, ao meio de maturação de oócitos bovinos para bloquear temporariamente a retomada da
2137 meiose. Foi observado que o bloqueio da meiose por 6 horas, seguidas de 18 horas de maturação

2138 utilizando-se para o bloqueio 50 μ M de BUT-I, ou a associação de BUT-I (25 μ M) e ROSCOV
2139 (6,25 μ M), foi eficiente em promover o bloqueio reversível da meiose nos oócitos. Também,
2140 incrementou a produção embrionária e promoveu a diminuição do número de células apoptóticas. O
2141 bloqueio da meiose pela BUT-I na concentração de 50 μ M por 12 horas não alterou a qualidade dos
2142 embriões produzidos em relação ao controle, e produziu taxas satisfatórias de blastocistos.
2143 Gendelman e Roth (2012) também encontraram que a pré-maturação com 50 μ M e 75 μ M de
2144 Butirolactona I não alterou a qualidade e a quantidade de embriões produzidos.

2145 A pré-maturação de oócitos bovinos com BUT-I tem o potencial de favorecer a maturação *in*
2146 *vitro*, não apenas por promover o bloqueio a meiose, mas também por permitir maior acúmulo de
2147 transcritos (Marques *et al.*, 2011). Adicionalmente, foi encontrado que a BUT-I tem o potencial de
2148 incrementar a produção e o desenvolvimento embrionário por reduzir o número de células
2149 apoptóticas (Maziero *et al.*, 2016). Também, sua ação, por meio da inibição farmacológica da
2150 meiose, é dose-dependente e varia de acordo com o tempo de cultivo (Maziero *et al.*, 2016).

2151 No presente estudo foi verificado que apesar do encurtamento do tempo de maturação, que
2152 comumente ocorre nos sistemas de produção *in vitro*, potencialmente derivar em danos estruturais
2153 aos oócitos, a inibição da maturação pela BUT-I na concentração de 50 μ M não incrementou a
2154 produção de embriões, resultando em taxas de blastocistos (50,53%), ligeiramente inferiores à de
2155 oócitos do grupo controle (62,62%). Porém, é importante destacar que a produção de embriões pré-
2156 maturados com 50 μ M de BUT-I foi superior à produção média de embriões de 35%, que é
2157 comumente obtida pelos laboratórios comerciais de produção *in vitro* de embriões (Luciano *et al.*,
2158 2018).

2159 A composição dos meios de produção de embriões tem sofrido alterações ao longo dos anos.
2160 Assim, a melhoria da competência de desenvolvimento embrionário deverá ser buscada pelo
2161 incremento da qualidade dos meios de maturação *in vitro*, promovida pela adição de antioxidantes e
2162 fatores de crescimento (Farghaly *et al.*, 2011; Richani *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014a; Wang *et al.*,
2163 2014b; Guimarães *et al.*, 2015; Dunning e Robker, 2017). Futuras pesquisas envolvendo modulação
2164 da maturação *in vitro* deverão estabelecer qual seria o tempo de bloqueio e a concentração de BUT-
2165 I mais adequadas, associado à suplementação do meio de maturação *in vitro* com aditivos que
2166 possam incrementar o desenvolvimento embrionário visando, não somente melhorar a produção em
2167 laboratório, mas também, em proporcionar embriões com capacidade de se desenvolverem pós-
2168 transferência, reduzindo as perdas de gestacionais.

2169

2170 **CONCLUSÕES**

2171 A pré-maturação de oócitos bovinos com 50µM de Butirolactona I promove o bloqueio da meiose,
2172 matando baixa atividade mitocondrial, inibindo simultaneamente a divisão cromossômica e a
2173 redistribuição de mitocôndrias citoplasmáticas. A sincronia desses eventos, durante o crescimento e
2174 amadurecimento de oócitos bovinos, favorece o desenvolvimento embrionário subsequente. A
2175 inibição da meiose por 12 horas com 50µM de BUT-I não interferiu com a clivagem embrionária e
2176 resultou em taxas de blastocistos ligeiramente inferiores aos oócitos não controlados. Destaca-se a
2177 mensuração da atividade mitocondrial como parâmetro para avaliação de inibição da meiose em
2178 oócitos bovinos.

2179

2180

2181 **AGRADECIMENTOS**

2182 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação
2183 de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de
2184 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e apoio para o
2185 desenvolvimento do trabalho, e pela bolsa de estudos do CNPq. Ao CAPI-UFMG pela
2186 disponibilização do microscópio confocal.

2187

2188 **CONFLITOS DE INTERESSE**

2189 Nenhum dos autores do manuscrito acima tem declarado qualquer conflito de interesse.

2190

2191 **REFERÊNCIAS**

2192 BARNES, F. L., FIRST, N. L. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. *Mol.*
2193 *Reprod. Devel.*, v. 2, p. 117-123, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mrd.1080290205>>.
2194 BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its
2195 value to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence?. *Reprod. Dom.*
2196 *Anim.*, v. 47, p. 687–693, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01924.x>>.
2197
2198 CHIARATTI, M. R., FERREIRA, C. R., PERECIN, F. *et al.* Ooplast-mediated developmental
2199 rescue of bovine oocytes exposed to ethidium bromide. *Reprod. Biomed. Online*, v. 22, p. 172-183,

2200 2011. Disponível em: <doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.10.011>.

2201 CONTI, M., HSIEH, M., ZAMAH, A. M., OH, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary
2202 during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell Endocrinol.*, v. 356, p. 65-73, 2012. Disponível
2203 em: <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.002>>.

2204 DUNNING, K. R. e ROBKER, R. L. The role of L-carnitine during oocyte *in vitro* maturation:
2205 essential co-factor? *Anim. Reprod.*, v. 14, p. 469–475, 2017. Disponível em:
2206 <[http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v1
2207 4n3/p469-475 \(AR988\) SBTE.pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p469-475%20(AR988)%20SBTE.pdf)>.

2208 FAIR, T., HYTTEL, P., MOTLIK, J. *et al.* Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes *in vitro*
2209 using butyrolactone I: Effects on oocyte ultrastructure and nucleolus function. *Mol. Reprod. Devel.*,
2210 v. 62, p. 375–386, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mrd.10096>>.

2211 FAIR, T., HULSHOF, S. C. J., HYTTEL, P. *et al.* Oocyte ultrastructure in bovine primordial to
2212 early tertiary follicles. *Anat. Embryol.*, v.195, p. 327-336, 1997. Disponível em: <[doi.org/
2213 10.1007/s004290050052](https://doi.org/10.1007/s004290050052)>.

2214 FARGHALY, T. A., MOSTAFA, S. A., KHALIFA, E. M. *et al.* Improving the success of *in vitro*
2215 maturation (IVM) by controlling the rate of oocyte maturation with meiotic inhibitors using bovine
2216 oocyte model. *Fertil. Steril.* v. 96, p. S105, 2011. Disponível em:
2217 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.413>>.

2218 GENDELMAN, M. e ROTH, Z. *In vivo* vs. *in vitro* models for studying the effects of elevated
2219 temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression.
2220 *Anim. Reprod. Sci.*, v.134, p. 125-134, 2012. Disponível em:
2221 <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.07.009>>.

2222 GILCHRIST, R. B., LANE, M., THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: Regulators of
2223 cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update*, v. 14, p. 159–177, 2008.
2224 Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>>.

2225 GOTTARDI, F. P. e MINGOTI, G. Z. Bovine oocyte maturation and influence on subsequent
2226 embryonic developmental competence. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 33, p. 82–94, 2009.

2227 GUIMARÃES, A. L. S., PEREIRA, S. A., LEME, L. O. *et al.* Evaluation of the simulated
2228 physiological oocyte maturation system for improving bovine *in vitro* embryo production.
2229 *Theriogenology*, v. 83, p. 52–57, 2015. Disponível em:
2230 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.Theriogenology.2014.07.042>>.

2231 HUA, S., ZHANG, Y., LI, X-C. *et al.* Effects of granulosa cell mitochondria transfer on the early
2232 development of bovine embryos *in vitro*. *Cloning Stem Cell*, v. 9, p. 237-246, 2007. Disponível em:
2233 <doi.org/10.1089/clo.2006.0020>.

2234 HUANG, W., NAGANO, M., KANG, S.S. *et al.* Effects of in vitro growth culture duration and
2235 prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived
2236 from early antral follicles. *Theriogenology*, v. 80, p. 793–799, 2013. Disponível em:
2237 <doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.004.07.004>.

2238 HUANG, C. C., CHENG, T. C., CHANG, H. H. *et al.* Birth after the injection of sperm and the
2239 cytoplasm of tripronucleate zygotes into metaphase II oocytes in patients with repeated implantation
2240 failure after assisted fertilization procedures. *Fertil. Steril.*, v. 72, p. 702-706, 1999. Disponível em:
2241 <[doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00309-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00309-x)>.

2242 JESETA, M., CTVRTLIKOVA KNITLOVA, D., HANZALOVA, K. *et al.* Mitochondrial patterns
2243 in bovine oocytes with different meiotic competence related to their in vitro maturation. *Reprod.*
2244 *Dom. Anim.*, v. 49, p. 469–475, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/rda.12313>>.

2245 KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L., ALM, H., TORNER, H. *et al.* Mitochondrial aggregation patterns
2246 and activity in in vitro cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles.
2247 *Theriogenology*, v. 75, p. 662–670, 2011. Disponível em:
2248 <<https://doi.org/10.1016/j.Theriogenology.2010.10.006>>.

2249 KUBELKA, M., MOTLÍK, J., SCHULTZ, R. M. *et al.* Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic
2250 maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biol. Reprod.*,
2251 v. 62, p. 292–302, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.292>>.

2252 LANDIM-ALVARENGA, F. C. e MAZIERO, R. R. D. Control of oocyte maturation. *Anim.*
2253 *Reprod.*, p. 150–158, 2014.

2254 LANZENDORF, S. E., MAYER, J. F., TONER, J. *et al.* Pregnancy following transfer of ooplasm
2255 from cryopreserved-thawed donor oocytes into recipient oocytes. *Fertil. Steril.*, v. 71, p. 575-577,
2256 1999. Disponível em: <[doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00504-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00504-4)>.

2257 LOONERGAN, P., FAERGE, I., HYTTEL, P. *et al.* Ultrastructural modifications in bovine oocytes
2258 maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone, v. 64, p. 369-378, 2003.
2259 Disponível em: <doi.org/10.1002/mrd.10206>.

2260 LONERGAN. P., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., PINTADO, B. *et al.* Relationship between time of first
2261 cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in
2262 bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev.*, v.57, p.146-152,
2263 2000.

2264 LUCIANO, A. M., FRANCIOSI, F., BARROS, R. G. *et al.* The variable success of in vitro
2265 maturation: can we do better?. *Anim. Reprod.*, v. 15, p. 727-736, 2018.

2266 Luciano, A. M., Pocar, P., Milanesi, E. *et al.* Effect of different levels of intracellular cAMP on the
2267 in vitro maturation of cattle oocytes and their subsequent development following in vitro

2268 fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 54, p. 86–91, 1999. Disponível em:
2269 <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199909\)54:1<86::AID-MRD13>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199909)54:1<86::AID-MRD13>3.0.CO;2-C)>.

2270 MARQUES, M. G., MELLO, M R. B., TAVARES, L. M. T. et al. Maturação e desenvolvimento
2271 embrionário in vitro de oócitos bovinos após bloqueio da meiose com inibidores da MPF. *Braz. J.*
2272 *Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 48, p. 468-477, 2011. Disponível em: <[https://doi.org/10.11606/S1413-](https://doi.org/10.11606/S1413-95962011000600005)
2273 [95962011000600005](https://doi.org/10.11606/S1413-95962011000600005)>.

2274 MAZIERO, R. R. D., GUAITOLINI, C. R. F., PASCHOAL, D. M. et al. Effect of temporary
2275 meiotic attenuation of oocytes with butyrolactone I and roscovitine in resistance to bovine embryos
2276 on vitrification. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 51, p. 204–211, 2016. Disponível em:
2277 <<https://doi.org/10.1111/rda.12667>>.

2278 MAZIERO, R. R. D., GUAITOLINI, C. R. F., PASCHOAL, D. M. et al. Treatment with roscovitine
2279 and butyrolactone I prior to in vitro maturation alters blastocyst production. *Zygote*, v. 11, p. 1-8,
2280 2019. Disponível em: <doi.org/10.1017/S0967199419000571>.

2281 PARRISH, J. J., KROGRNAES, A., SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by
2282 either swim-up and Percoll method on success of “in vitro” fertilization and early embryonic
2283 development. *Theriogenology*. v.44, p. 859-869, 1995.

2284 Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. Fertilization and developmental competence of bovine
2285 oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 31, p. 63–67,
2286 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mrd.1080310111>>.

2287 PONDERATO, N., CROTTI, G., TURINI, P. et al. Embryonic and foetal development of bovine
2288 oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior
2289 to IVM and IVF. *Mol. Reprod. Devel.*, v. 62, p. 513–518, 2002. Disponível em:
2290 <<https://doi.org/10.1002/mrd.10134>>.

2291 RICHANI, D., WANG, X., ZENG, H. T. et al. Pre-maturation with cAMP modulators in
2292 conjunction with EGF-like peptides during in vitro maturation enhances mouse oocyte
2293 developmental competence. *Mol. Reprod. Devel.*, v. 81, p. 422–435, 2014. Disponível em:
2294 <<https://doi.org/10.1002/mrd.22307>>.

2295 RICHARD, F. J. e SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II. Theca cell
2296 inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol. Reprod.*, v. 54, p. 22-28, 1996. Disponível em:
2297 <<https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.22>>.

2298 SCHIMMEL, T. G., COFFMAN, A. D., PARSONS, S. J. Effect of Butyrolactone I on the
2299 Producing Fungus , *Aspergillus terreus*. v. 64, p. 3707–3712, 1998.

2300 STOJKOVIC, M., MACHADO, S. A., STOJKOVIC, P. et al. Mitochondrial distribution and
2301 adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation

2302 with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol.*
2303 *Reprod.*, v. 64, p. 904–909, 2001. Disponível em:
2304 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207207>>.

2305 STRINGFELLOW, D. A. e GIVENS, M. D. *Manual of the International Embryo Transfer Society.*
2306 *A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing*
2307 *sanitary procedures.* 4th Ed., Champaign, IL, EUA, 151 p., 2010. ISBN: 978-0-9662386-3-1.

2308 WANG, F., TIAN, X., ZHANG, L. et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte
2309 maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.*, v. 101,
2310 p. 577-586, 2014a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.10.041>>.

2311 WANG, F., TIAN, X. Z., ZHOU, Y. H. et al. Melatonin improves the quality of in vitro produced
2312 (IVP) bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications
2313 of relevant gene expression. *PLoS ONE*, v. 9, p. 1–8, 2014b. Disponível em:
2314 <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093641>>.

2315

2316

2317
2318
2319
2320
2321
2322
2323
2324
2325
2326
2327
2328
2329
2330
2331
2332
2333
2334
2335
2336
2337
2338
2339
2340
2341
2342
2343
2344
2345
2346
2347
2348
2349

**7. CAPÍTULO III –
ATIVAÇÃO MITOCONDRIAL, DEPOSIÇÃO LIPÍDICA E ULTRAESTRUTURA
EMBRIONÁRIA APÓS EXPOSIÇÃO A CHOQUE TÉRMICO**

Ana Carolina Leite, Luciano de Rezende Carvalheira, Victor Mutti Drummond Ribeiro Prata,
Eliane Beatriz da Silva Magalhães, Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Alan Maia Borges

RESUMO

O estresse térmico por calor (EC) provoca redução da fertilidade nas fêmeas bovinas, especialmente nas vacas leiteiras. A exposição a temperaturas ambientais elevadas afeta adversamente a qualidade e competência de desenvolvimento de oócitos e embriões. O presente trabalho teve como objetivo estudar alterações relacionadas com metabolismo de oócitos e embriões bovinos expostos a choque térmico. Oócitos e embriões bovinos, divididos em cinco tratamentos, foram submetidos a estresse térmico por calor por elevação da temperatura de incubação, em diferentes estádios de desenvolvimento. No Controle, oócitos e embriões foram cultivados a 38,5°C durante todas as etapas da produção *in vitro* de embriões (PIVE). No tratamento vesícula germinativa (VG), oócitos foram mantidos por 12 horas em estágio de vesícula germinativa, por indução farmacológica com Butirolactona-I (BUT-I) e, em seguida, foram submetidos à PIVE em condições convencionais de temperatura (38,5°C). No tratamento VGEC, oócitos mantidos em vesícula germinativa foram expostos a choque térmico (41°C por 12h) durante a pré-maturação e, em seguida, submetidos à PIVE convencional. No tratamento MIVEC os oócitos foram submetidos a choque térmico durante as primeiras 12 horas de maturação (41°C por 12h seguido de 38,5°C por 12h) e, em seguida, submetidos à fecundação e cultivo em condições de termoneutralidade (38,5°C). No tratamento D7EC foram submetidos às 12h de choque térmico embriões de 144 horas de pós-inseminação, em seguida foram submetidos a 12h de cultivo em condições convencionais de temperatura. Embriões produzidos a partir de oócitos imaturos expostos a calor excessivo (VGEC) apresentaram menor atividade mitocondrial em relação a embriões submetidos à EC no estágio de blastocisto ($P < 0,05$; nº mitocôndrias ativas 599,4 para VGEC e 948,7 para D7EC), entretanto se mostrou semelhante ao Controle e demais tratamentos no parâmetro avaliado. Houve redução dos estoques citoplasmáticos de lipídeos em embriões provenientes de oócitos ou embriões submetidos à EC (nº gotículas lipídicas 964,6; 1.484,2; 788,1 para os tratamentos VGEC, MIVEC e D7EC, respectivamente) em relação aos tratamentos Controle e VG ($P < 0,05$). Em relação ao percentual da área embrionária ocupada por gotículas lipídicas o tratamento VGEC apresentou o menor teor de lipídeos entre os tratamentos avaliados ($P < 0,05$; % área do embrião ocupada por lipídeos de 19,0% para Controle,

2350 15,4% para VG, 8,1% para VGEC,16,5% para MIVEC e 17,1% para D7EC). O tratamento VGEC
2351 foi o mais afetado pelo choque térmico de acordo com os parâmetros relacionados com o
2352 desenvolvimento embrionário, apresentando redução das taxa de clivagem, produção de embrião e
2353 eclosão em relação ao Controle ($P<0,05$). O ovócito imaturo é o estágio mais sensível aos efeitos
2354 deletérios do choque térmico, apresentando não só alterações morfológicas e metabólicas, mas, em
2355 associação aos demais achados, apresentou redução significativa na produção e da eclodibilidade
2356 embrionária.

2357

2358 **Palavras-chave:** atividade mitocondrial, estresse térmico por calor, perda embrionária,
2359 metabolismo embrionário.

2360

2361 **ABSTRACT**

2362 Heat stress (HS) causes reduced fertility in bovine females, especially in dairy cows. Exposure to
2363 elevated environmental temperatures adversely affects the quality and developmental competence
2364 of oocytes and embryos. This research aimed to study the metabolic alterations of bovine oocytes
2365 and embryos previously exposed to thermal shock. Bovine oocytes and embryos, divided into five
2366 treatments, were submitted to heat stress by increasing incubation temperature at different
2367 developmental stages. In Control, oocytes and embryos were cultured at 38.5°C during all stages of
2368 IVEP. In the germinative vesicle (VG) treatment, oocytes were maintained for 12 hours in
2369 germinative vesicle stage by pharmacological induction with Butyrolactone-I (BUT-I) and then
2370 underwent *in vitro* embryo production (IVEP) under conventional temperature conditions (38.5°C).
2371 In VGEC treatment, oocytes kept in germinative vesicle stage were exposed to heat shock (41°C for
2372 12h) during pre-maturation and then submitted to IVEP under conventional temperature conditions
2373 (38.5°C). In the MIVEC treatment, the oocytes were subjected to heat shock during the first 12
2374 hours of maturation (41°C for 12h followed by 38.5°C for 12h) and then subjected to fertilization
2375 and cultivation under conditions of thermoneutrality (38.5°C). In the D7EC treatment embryos were
2376 subjected to 12 h of heat shock after 144 hours post-insemination, then they were subjected to 12 h
2377 of culture under conventional temperature conditions. Embryos produced from immature oocytes
2378 exposed to excessive heat (VGEC) showed less mitochondrial activity compared to embryos
2379 submitted to HS at the blastocyst stage ($P < 0.05$; number of active mitochondria 599.4 for VGEC
2380 and 948.7 for D7EC), however it was shown to be similar to the Control and other treatments in the
2381 evaluated parameter. There was a reduction in the cytoplasmic stocks of lipids in embryos from
2382 oocytes or embryos submitted to HS (number of lipid droplets 964.6; 1,484.2; 788.1 for treatments
2383 VGEC, MIVEC and D7EC, respectively) compared to treatments Control and VG ($P < 0.05$).
2384 Regarding the percentage of the embryonic area occupied by lipid droplets, the VGEC treatment
2385 had the lowest lipid content among the evaluated treatments ($P < 0.05$; % embryo area occupied
2386 by lipids of 19.0% for Control, 15.4% for VG, 8.1% for VGEC, 16.5% for MIVEC and 17.1% for
2387 D7EC). The VGEC treatment was the most affected by the heat shock according to the parameters
2388 related to the embryonic development, presenting a reduction in the cleavage rate, embryo
2389 production and hatching in relation to the Control ($P < 0.05$). The immature oocyte is the stage most
2390 sensitive to the deleterious effects of thermal shock, presenting not only morphological and
2391 metabolic changes, but, in association with the other findings, presented a significant reduction in
2392 embryonic production and hatchability.

2393 **Keywords:** mitochondrial activity, heat stress, embryo loss, embryo metabolism.

2394 **INTRODUÇÃO**

2395 Oócitos e embriões bovinos possuem a particularidade de apresentarem reservas endógenas
2396 de substratos para produção de ATP, característica que garante vantagens na capacidade de se
2397 desenvolverem em sistemas *in vitro*, em meios de cultivo relativamente simples. Em tese, o gameta
2398 feminino e o conceito bovino possuem dois tipos de estoques energéticos, o glicogênio e os
2399 lipídeos, porém, a concentração de glicogênio parece ser quase insignificante e é pouco descrita na
2400 literatura (Thompson *et al.*, 1995; Sturme *et al.*, 2009). Os triglicerídeos representam a fonte mais
2401 abundante de precursores energéticos para o desenvolvimento de embriões bovinos (Sturme *et al.*,
2402 2009).

2403 O estabelecimento da gestação bem-sucedida em bovinos depende da interação harmoniosa
2404 de fatores internos (hormônios, fatores de crescimento, nutrientes, antioxidantes, etc) e externos,
2405 como os fatores ambientais. Nos últimos anos tem crescido a preocupação com a intensificação do
2406 aquecimento global e suas consequências para o equilíbrio ambiental e para a biodiversidade. O
2407 calor tem sido um dos principais estressores avaliados pela ciência, principalmente nos estudos que
2408 relacionam o efeito das altas temperaturas ambientais à saúde, atividade produtiva e fertilidade das
2409 fêmeas bovinas (Kadzere, *et al.*, 2002; Hansen, 2009; Polsky *et al.*, 2017).

2410 Nas épocas do ano de maior temperatura ambiental, normalmente durante os períodos de
2411 primavera e verão, observa-se redução de fertilidade de fêmeas bovinas, evidenciada pela redução
2412 na concepção e pelo aumento de perdas embrionárias (Ulberg e Burfening, 1967; Zeron *et al.*, 2001;
2413 Al-Katanani *et al.*, 2002a; Stewart *et al.*, 2011). Apesar de diversos trabalhos terem demonstrado
2414 associação direta de calor excessivo com redução do desempenho reprodutivo, ainda não se sabe ao
2415 certo quais são os principais fatores celulares que determinam o estabelecimento de uma gestação
2416 bem-sucedida.

2417 Considerando o volume e a demanda embrionária pelos estoques de lipídeos, durante o
2418 desenvolvimento inicial, acredita-se que as anormalidades no metabolismo energético do conceito
2419 também podem afetar o desenvolvimento do embrião bovino (Ferguson e Leese, 2006). O efeito da
2420 exposição a altas temperaturas ambientais na alteração de metabolismo de oócitos e embriões é
2421 pouco explorada na literatura. Portanto, a quantificação de estoques de triglicerídeos
2422 intracitoplasmáticos e a avaliação de atividade metabólica podem predizer tanto a qualidade quanto
2423 a capacidade de embriões bovinos sobreviverem a estresse de origem ambiental.

2424 Os objetivos do estudo foram: 1) Avaliar o efeito da exposição de oócitos bovinos a estresse
2425 térmico por calor (EC) durante a maturação nuclear e citoplasmática; 2) Avaliar o efeito de estresse

2426 térmico por calor sobre parâmetros relacionados com a atividade de mitocôndrias embrionárias; 3)
2427 Avaliar o efeito de estresse térmico por calor sobre modulação de estoques citoplasmáticos de
2428 lipídeos; 4) Avaliar o efeito de estresse térmico por calor sobre a estrutura de organelas relacionadas
2429 com metabolização de lipídeos e atividade mitocondrial utilizando microscopia eletrônica de
2430 transmissão e; 5) Comparar desenvolvimento embrionário em oócitos e embriões expostos a choque
2431 térmico em diferentes estádios; 6) Avaliar em qual fase de desenvolvimento de oócitos e embriões a
2432 exposição a estresse térmico por calor interfere mais intensamente com parâmetros relacionados a
2433 metabolismo e qualidade embrionária.

2434

2435 MATERIAL E MÉTODOS

2436 O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões da Escola de
2437 Veterinária da UFMG, durante o período de fevereiro de 2018 a março de 2019. Todos os
2438 procedimentos adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG
2439 (Protocolo nº 129/2017). Todos os reagentes utilizados nesse experimento foram adquiridos da
2440 Sigma[®] Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a não ser que seja especificado.

2441 Foram utilizados oócitos obtidos de ovários provenientes de fêmeas bovinas abatidas em
2442 matadouro-frigorífico da região metropolitana de Belo Horizonte, com habilitação de inspeção
2443 federal. Não foi realizada coleta de ovários nos meses mais quentes do ano (de novembro a
2444 fevereiro), para eliminar qualquer efeito sazonal nos oócitos.

2445 Os ovários coletados foram transportados até o laboratório em solução fisiológica (0,9% de
2446 NaCl) aquecida entre 30 e 35°C, em tempo não superior a quatro horas após o término do abate. Os
2447 folículos com diâmetro entre 3 e 8mm foram puncionados com o auxílio de seringa e agulha
2448 descartáveis. Os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) obtidos da aspiração dos ovários foram
2449 rastreados e classificados quanto à qualidade do citoplasma (homogeneidade, coloração e presença
2450 de granulações) e número de camadas de células do *cumulus*, com auxílio de um microscópio
2451 estereoscópico.

2452 Os CCOs selecionados para a maturação *in vitro* (MIV) foram lavados em meio TCM-199
2453 Hepes (Gibco[®] Life Technologies, Grand Island, USA) suplementado com 10% de soro fetal
2454 bovino (SFB - Gibco[®] Life Technologies, Grand Island, USA), 83,4 µg/mL de amicacina, e
2455 22µg/mL de piruvato, e sequencialmente foram distribuídos em cinco grupos: Controle, no qual
2456 oócitos e embriões foram cultivados a 38,5°C durante todas as etapas da produção *in vitro* de
2457 embriões (PIVE); vesícula germinativa (VG), no qual os oócitos foram mantidos por 12 horas em

2458 estágio de vesícula germinativa, por indução farmacológica com Butirolactona-I (BUT-I; Enzo®
2459 Life Sciences, PA, USA - ML-CC210-1000) e, em seguida, foram submetidos à PIVE em condições
2460 convencionais de temperatura (38,5°C); VGEC, no qual os oócitos mantidos em vesícula
2461 germinativa foram expostos a choque térmico (41°C por 12h) durante a pré-maturação e, em
2462 seguida, submetidos à PIVE em condições convencionais de temperatura (38,5°C); em MIVEC, os
2463 oócitos foram submetidos a choque térmico durante a maturação (41°C por 12h seguido de
2464 incubação à 38,5°C por 12h) e, em seguida, submetidos à fecundação e cultivo em condições
2465 convencionais de temperatura; e D7EC, no qual foram submetidos a choque térmico blastocistos às
2466 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação (D7), sendo que o restante do cultivo realizado em
2467 condições convencionais de temperatura.

2468 Para a fecundação *in vitro* (FIV) utilizou-se sêmen de touro da raça Holandesa, previamente
2469 avaliado quanto à fertilidade em sistemas de produção *in vitro*. A seleção de espermatozoides
2470 viáveis para a FIV foi realizada utilizando-se o método do gradiente descontínuo de *Percoll* e o
2471 *pellet* resultante da centrifugação foi lavado em meio de capacitação espermática (TALP), e a
2472 concentração foi ajustada para 1×10^6 espermatozoides/mL. O meio de FIV utilizado foi constituído
2473 por FERT-TALP (Parrish *et al.*, 1995) suplementado com amicacina (83,4µg/mL), penicilamina
2474 (27µg/mL), hipotaurina (1µg/mL), epinefrina (0,3µg/mL), albumina sérica bovina (BSA; 5µg/mL),
2475 piruvato (22µg/mL) e heparina (10µg/mL). Os CCOs foram fecundados e incubados nas mesmas
2476 condições da MIV, por um período de 10 horas, sendo o dia da fecundação considerado o D0.

2477 Após a FIV, os zigotos foram debridados das células do CCOs, utilizando-se micropipeta
2478 automática e, posteriormente, estes foram submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV), em meio *Synthetic*
2479 *Oviduct Fluid Medium* (SOF) suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB. Nos dias D3, D7 e
2480 D8 foram avaliadas as taxas de clivagem, de produção de blastocistos e número de blastocistos
2481 eclodidos da zona pelúcida de cada tratamento, respectivamente. Para as análises de atividade
2482 mitocondrial, estoque intracitoplasmático de lipídeos e microscopia eletrônica de transmissão foram
2483 utilizados blastocistos expandidos de sete dias de desenvolvimento.

2484 **Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos**

2485 A parcela de oócitos destinados para essa avaliação foi submetida ao processo de coloração
2486 para determinar a maturação nuclear e citoplasmática, de acordo com a metodologia proposta por
2487 Jeseta *et al.* (2014). Para tal, os oócitos foram incubados por 30 minutos à 38,5°C a 5% CO₂ com
2488 *Dulbecco Phosphate Buffered Saline* (DPBS), suplementado com 4mg/mL de BSA e 280nM de
2489 *Mitotracker Orange* (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA). Desta forma, apenas mitocôndrias

2490 fisiologicamente ativas foram coradas. Os oócitos foram fixados em formaldeído 3,7%, por 60
2491 minutos, à temperatura ambiente. Após a fixação, os oócitos foram corados novamente com
2492 10µg/mL de Hoechst 33342 em glicerol, objetivando marcar os cromossomos para determinação da
2493 maturação nuclear.

2494 A configuração da cromatina foi avaliada em microscópio de epifluorescência Leica
2495 DM4000 B (Leica[®] Microsystems versão 4.8.0, Suíça), com filtro de excitação de 365nm e de
2496 emissão de 420nm. Os oócitos foram classificados em Prófase I (PI), Metáfase I (MI), Metáfase II
2497 (MII). Para determinação da atividade mitocondrial, os oócitos foram avaliados em microscópio
2498 confocal Zeiss LSM 5 Live (Carl Zeiss[®], Jena, Thuringia, Germany - onda emissão de 543nm e
2499 onda de excitação de 585 a 649nm). O padrão de distribuição mitocondrial foi definido como:
2500 distribuição homogênea das mitocôndrias por todo oócito, distribuição heterogênea das
2501 mitocôndrias pelo citoplasma, e distribuição periférica das mitocôndrias, seguindo o padrão adotado
2502 por Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2011).

2503 **Avaliação de mitocôndrias ativas e intensidade de fluorescência mitocondrial em células** 2504 **embrionárias**

2505 Quinze a vinte e cinco blastocistos expandidos de cada tratamento experimental foram
2506 utilizados para avaliação do número de mitocôndrias ativas e intensidade de fluorescência
2507 mitocondrial dos blastômeros. As estruturas avaliadas foram coradas com *Mitotracker Orange*
2508 (Life[®] Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguindo o mesmo protocolo descrito acima para
2509 oócitos.

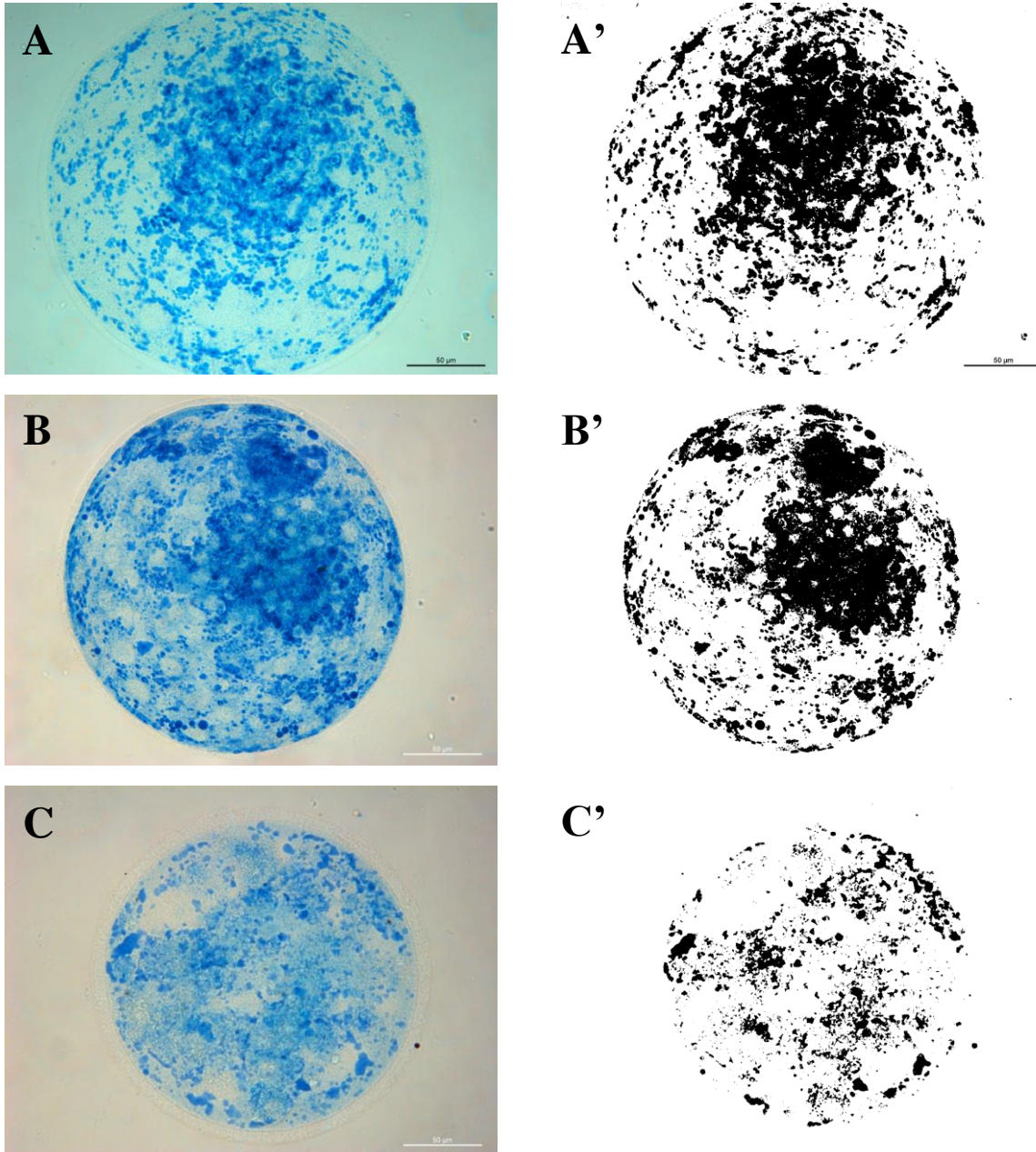
2510 As mitocôndrias embrionárias coradas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência
2511 Leica DM4000 B e a quantificação do número de mitocôndrias coradas, intensidade de
2512 fluorescência média por mitocôndria corada, e intensidade de fluorescência mitocondrial
2513 embrionária total foi realizada com auxílio do software IMAGE J 1.41 (Wayne Rasband, National
2514 Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

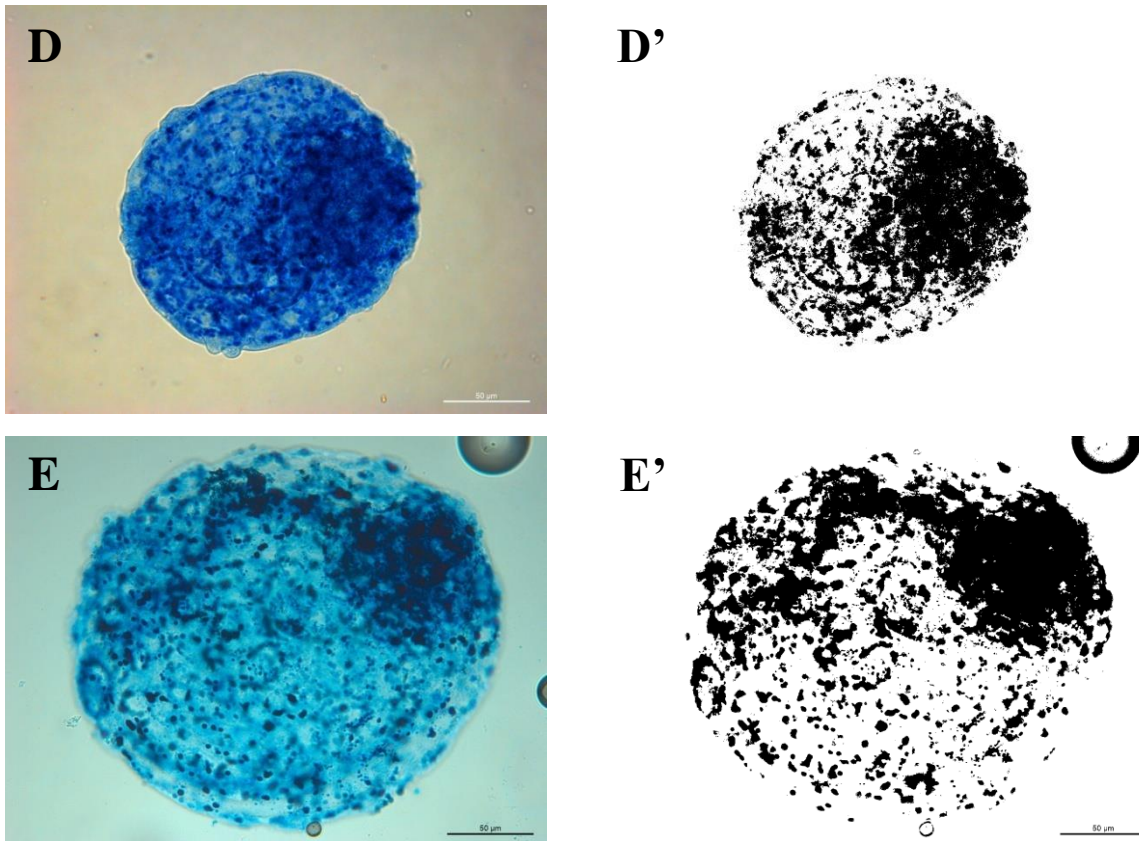
2515 **Análise do conteúdo lipídico das células embrionárias**

2516 O protocolo de coloração utilizado foi descrito por Sudano (2012). Quinze a trinta
2517 blastocistos expandidos de cada tratamento foram aleatoriamente escolhidos para coloração, para
2518 serem fixados em solução de formaldeído 10%. Os blastocistos foram então desidratados em etanol
2519 50% e, em seguida, corados em Sudan Black B 1%. Para a quantificação do estoque de ácidos
2520 graxos no citoplasma embrionário, as gotículas lipídicas coradas foram visualizadas em
2521 microscópio óptico utilizando-se objetiva de 40X. Visando a estimativa da quantidade de gotas de

2522 lipídeos os embriões foram fotografados por câmera Olympus acoplada ao microscópio, e as
2523 imagens foram analisadas com o auxílio do software IMAGE J 1.41, para a contagem da área
2524 ocupada pelas gotas lipídicas coradas. Foi estabelecido limiar padrão de marcação das gotas
2525 lipídicas, e o mesmo limiar foi utilizado na análise de todas as fotografias (Figura 1).

2526
2527
2528





2529 **Figura 1.** Quantificação do estoque intracitoplasmático de lipídeos por coloração com *Sudan Black B* em
 2530 embriões bovinos provenientes da exposição ou não ao calor ambiental excessivo (41°C por 12 horas). À
 2531 esquerda encontram-se os embriões de cada tratamento experimental apresentando gotículas lipídicas
 2532 coradas por *Sudan Black B* e à direita a marcação do limiar de marcação padrão para todos os tratamentos. A
 2533 e A'- Controle; B e B'- VG; C e C'- VGEC; D e D'- MIVEC; E e E'- D7EC. Imagem obtida por
 2534 microscópio óptico com aumento de 400x.

2535

2536 Microscopia eletrônica de transmissão - MET

2537 Para a microscopia eletrônica de transmissão, cinco embriões de sete dias de
 2538 desenvolvimento, de cada tratamento experimental, foram fixados em solução de glutaraldeído
 2539 2,5% por 48 horas, em temperatura de 4°C. Após a fixação foi realizada a fixação secundária em
 2540 tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% e KFeCN 1,5%. Em seguida, os embriões foram contrastados em
 2541 acetato de uranila 0,5% e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico a 70%, 80%,
 2542 90%, 95% e 100% e, posteriormente, em acetona.

2543 Após a desidratação, foi realizada a primeira infiltração pela substituição da acetona por
 2544 solução de Araldite e acetona na proporção de 1:1, onde as estruturas foram mantidas por 24 horas
 2545 e, na sequência, essa mistura foi substituída por resina pura. Seções semifinas foram coradas com
 2546 azul de toluidina e examinadas em microscópio óptico. Os embriões selecionados nas seções

2547 ultrafinas foram contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 1% para a preparação
2548 das telas de microscopia eletrônica. As observações ultraestruturas dos embriões foram feitas com o
2549 Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 – Spiritwin FEI -120kV. A preparação e
2550 imageamento das amostras foram realizadas em parceria com o Centro de Microscopia Eletrônica
2551 da UFMG.

2552 **Análise estatística dos resultados**

2553 O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado. Os grupos de oócitos foram
2554 considerados unidades experimentais. Os resultados de taxas de clivagem e de produção de
2555 embrião, segundo rotina laboratorial, foram considerados réplicas, enquanto as avaliações de
2556 maturação oocitária (configuração cromossômica e distribuição mitocondrial), distribuição
2557 mitocondrial em embriões, quantificação de fluorescência das mitocôndrias embrionárias,
2558 quantificação de gotículas lipídicas endógenas em embriões, e ultramicroscopia embrionária foram
2559 analisadas para cada oócito ou embrião separadamente. Para ultramicroscopia embrionária foi
2560 realizada análise descritiva dos principais achados.

2561 As variáveis quantitativas foram inicialmente submetidas aos testes Kolmogorov-Smirnov e
2562 Cochran e Bertlett para verificação da normalidade e homogeneidade das variâncias. As variáveis
2563 submetidas à análise de variância foram posteriormente avaliadas por teste de comparações
2564 múltiplas de médias, utilizando-se nível de significância de 5%. O programa de estatística utilizado
2565 para comparação dos resultados obtidos no presente trabalho foi o *GraphPad InStat*[®] 3.0. Para os
2566 resultados de embriões clivados, produção de embriões em relação ao total de clivados, produção de
2567 embriões em relação ao total de oócitos inseminados, e número de embriões eclodidos foi utilizado
2568 o teste Qui-quadrado. Para as avaliações de maturação oocitária foi utilizado o teste Exato de
2569 Fisher. Para avaliação da área ocupada por gotículas lipídicas no citoplasma embrionário, número
2570 de mitocôndrias ativas, e intensidade de fluorescência mitocondrial em células embrionárias foi
2571 utilizado o teste Newman-Keuls.

2572

2573 **RESULTADOS**

2574 Estudar a funcionalidade mitocondrial é essencial visto que essas organelas são os alvos
2575 principais de vários fatores estressantes, e alterações mitocondriais induzidas por estresse reduzem a
2576 competência de desenvolvimento de oócitos e embriões (Roth, 2018). A tabela 1 apresenta os
2577 resultados de maturação nuclear, avaliada por meio de configuração cromossômica dos oócitos e de
2578 maturação citoplasmática, obtida pela distribuição de mitocôndrias ativas no gameta feminino

2579 imaturo, submetido a condições convencionais de maturação *in vitro* (Controle), mantidos em
 2580 vesícula germinativa por 12 horas, seguido de maturação convencional (VG), e expostos a estresse
 2581 térmico por calor (EC) por elevação da temperatura de incubação *in vitro* durante a pré-maturação
 2582 (VGEC) ou maturação (MIVEC). Os oócitos imaturos submetidos ao choque térmico (VGEC)
 2583 tiveram redução significativa da maturação nuclear ($P < 0,05$), conforme observado na tabela 2. Em
 2584 relação à maturação citoplasmática, os tratamentos MIVEC, CONTROLE e VG apresentaram
 2585 maior número de oócitos com distribuição mitocondrial esperada para gametas maduros e aptos à
 2586 fecundação, enquanto que o tratamento VGEC se mostrou semelhante ao controle negativo (grupo
 2587 Imaturo).

2588

2589 **Tabela 1.** Configuração cromossômica (maturação nuclear) e padrão de distribuição mitocondrial
 2590 (maturação citoplasmática) de oócitos bovinos imaturos, oócitos submetidos à maturação *in vitro* em
 2591 condições convencionais (Controle), mantidos em vesícula germinativa por 12 horas, seguido de maturação
 2592 convencional (VG) e expostos a estresse térmico por calor durante a pré-maturação (VGEC) ou maturação
 2593 (MIVEC).

Tratamento	Maturação Nuclear			Maturação Citoplasmática			
	PI	MI	MII	Homogênea	Heterogênea	Periférica	FEF
Imaturo	80,00% c	20,00%	0,00% c	0,00% a	26,67% c	66,67% a	6,67% a,b
Controle	0,00% a	12,50%	87,50% a	0,00% a	70,83% a,b	4,17% c	25,00% b,c
VG	4,17% a	20,83%	75,00% a,b	20,83% c	75,00% a,b	4,17% c	0,00% a
VGEC	30,00% b	25,00%	45,00% b	15,00% a,b,c	60,00% b,c	20,00% b,c	5,00% a,b
MIVEC	4,55% a	27,27%	68,18% a,b	0,00% a	90,91% a	9,09% c	0,00% a

2594 Dados foram expressos em porcentagem (número oócitos classificados/total analisados).

2595 Maturação nuclear: PI (Prófase I); MI (Metáfase I); MII (Metáfase II);

2596 Maturação citoplasmática: Homogênea (Distribuição homogênea das mitocôndrias); Heterogênea
 2597 (Distribuição heterogênea das mitocôndrias); Periférica (Distribuição periférica das mitocôndrias); FEF
 2598 (Frac emissão de fluorescência).

2599 Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre si ($P < 0,05$), de acordo com o teste Exato de
 2600 Fisher.

2601

2602

2603

2604

2605 **Tabela 2.** Configuração cromossômica (maturação nuclear) e maturação citoplasmática de oócitos bovinos
 2606 imaturos, oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais (Controle), mantidos em
 2607 vesícula germinativa por 12 horas, seguido de maturação convencional (VG) e expostos a estresse térmico
 2608 por calor durante a pré-maturação (VGEC) ou maturação (MIVEC).

Tratamento	n	Maturação Nuclear		Maturação Citoplasmática		
		Maturado	Não Maturado	Maturado	Não Maturado	FEF
Imaturo	15	0,0% c	100,0% c	26,7% c	66,7% c	6,7% a,b
Controle	24	87,5% a	12,5% a	70,8% a,b	4,2% a	25,0% b,c
VG	24	75,0% a,b	25,0% a,b	75,0% a,b	25,0% a,b	0,0% a
VGEC	20	45,0% b	55,0% b	60,0% b,c	35,0% b,c	5,0% a,b
MIVEC	22	68,2% a,b	31,8% a,b	90,9% a	9,1% a,b	0,0% a

2609 Dados foram expressos em porcentagem (número oócitos classificados/total analisados).

2610 Maturação nuclear: Maturado (Metáfase II); Não maturado (Prófase I ou Metáfase I);

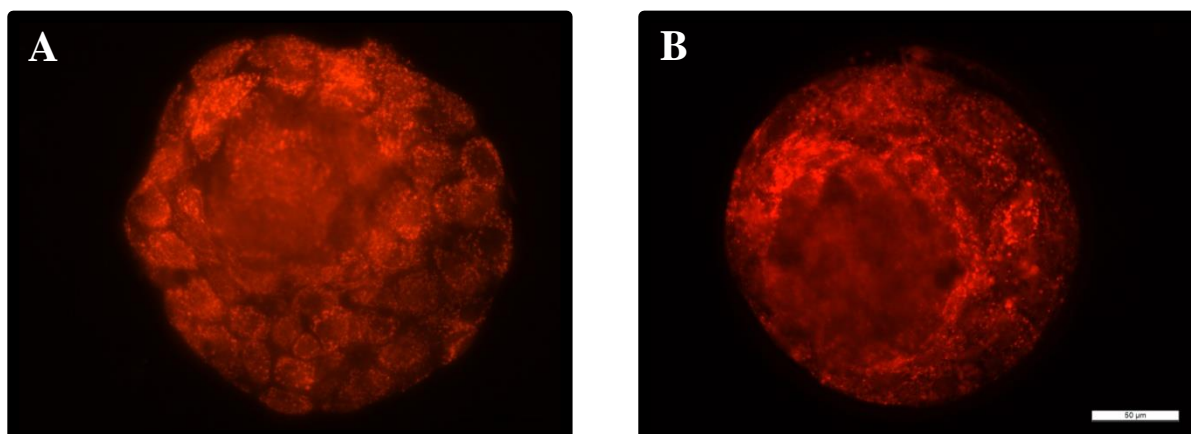
2611 Maturação citoplasmática: Maturado (Distribuição heterogênea de mitocôndrias); Não maturado
 2612 (Distribuição homogênea ou periférica das mitocôndrias); FEF (Frac emissão de fluorescência).

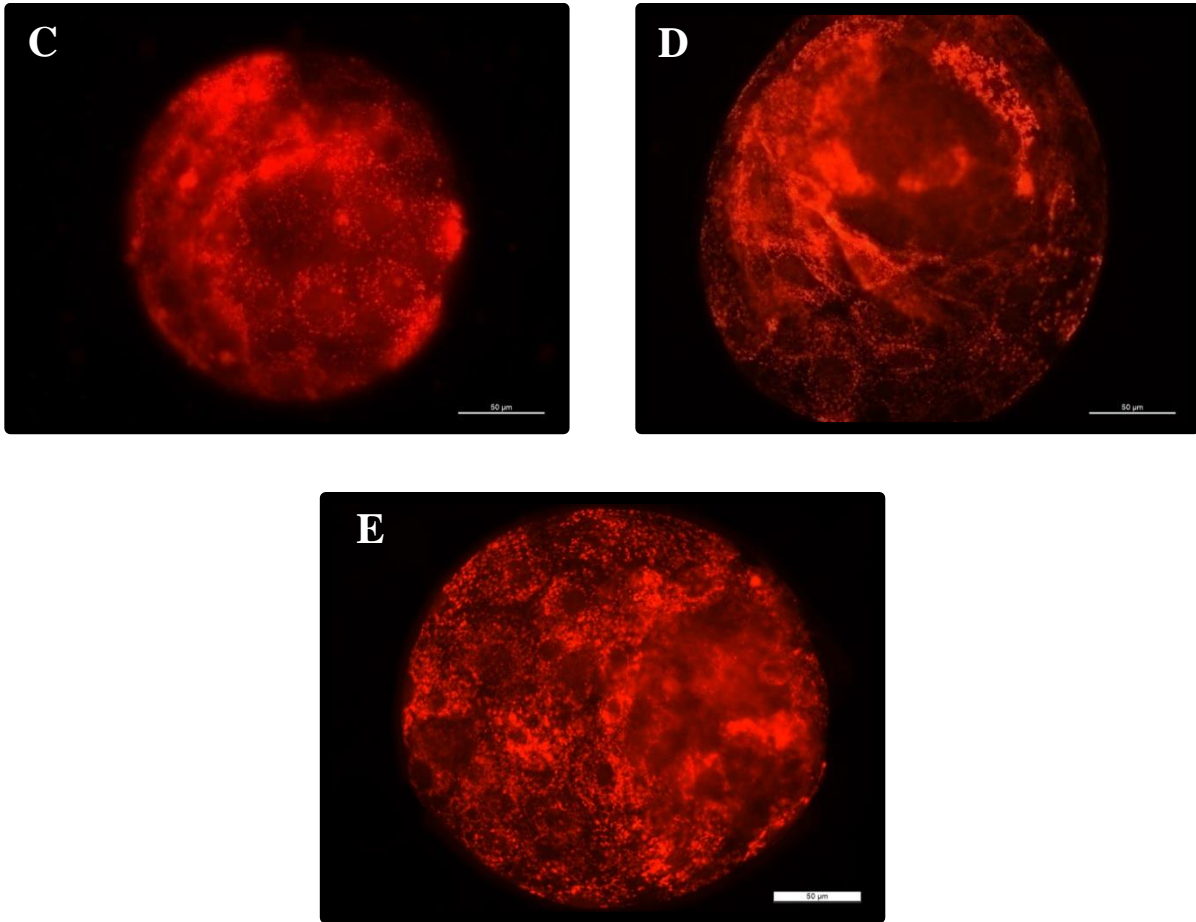
2613 Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre si ($P < 0,05$), de acordo com o teste Exato de
 2614 Fisher.

2615

2616 Com o objetivo de avaliar se a exposição de oócitos a temperaturas elevadas altera
 2617 metabolismo celular somente logo após o choque térmico ou se esse estresse apresenta reflexo em
 2618 outros estádios de desenvolvimento do conceito, foi realizada a mensuração de atividade
 2619 metabólica mitocondrial em embriões produzidos a partir de oócitos ou embriões submetidos ou
 2620 não à hipertermia. Para isso, avaliou-se o número de mitocôndrias ativas e intensidade de
 2621 fluorescência mitocondrial em células embrionárias (Figura 2).

2622





2623 **Figura 2.** Mitocôndrias ativas em embriões bovinos pré-expostos a altas temperaturas de incubação na fase
2624 de crescimento folicular (VGEC), de maturação oocitária (MIVEC) ou pré-transferência de embrião (D7EC)
2625 em relação à oócitos cultivados em condições convencionais de temperatura (VG e Controle).

2626

2627 Embriões submetidos a choque térmico no sétimo dia de desenvolvimento apresentaram
2628 aumento de atividade metabólica mitocondrial em comparação com o Controle ($P < 0,05$),
2629 evidenciado pelo aumento do número de mitocôndrias ativas e da intensidade de fluorescência
2630 mitocondrial (Tabela 3). Contudo, os tratamentos VG, VGEC e MIVEC apresentaram taxas
2631 metabólicas semelhantes ao grupo Controle ($P > 0,05$).

2632

2633

2634

2635

2636 **Tabela 3.** Quantificação de metabolismo embrionário por meio da avaliação de mitocôndrias ativas e
 2637 intensidade de fluorescência mitocondrial em células embrionárias de oócitos e embriões expostos a estresse
 2638 térmico por calor *in vitro*.

Tratamento	Nº de mitocôndrias	Intensidade de	Fluorescência
<i>n</i>	ativas (<i>n</i>)	fluorescência (pixels)	média/mitocôndria (pixels)
Controle	19	533,1 b	15.583,7 b
VG	15	810,1 a, b	24.058,8 a,b
VGEC	19	599,4 b	15.444,6 b
MIVEC	17	827,3 a,b	29.575,5 a
D7EC	23	948,7 a	34.864,3 a

2639 Controle - oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais; vesícula germinativa -
 2640 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas, seguido de maturação convencional; VGEC -
 2641 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas e expostos a estresse térmico por calor (EC) durante
 2642 a pré-maturação; MIVEC – oócitos submetidos a estresse térmico por calor por 12 horas durante a
 2643 maturação; D7EC - embriões produzidos em condições convencionais e submetidos à altas temperaturas por
 2644 12 horas às 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação.

2645 Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre si ($P < 0,05$), de acordo com o teste Newman
 2646 Keuls.

2647

2648 Os tratamentos VGEC e D7EC que sofreram hipertermia, respectivamente durante a fase de
 2649 crescimento oocitário ou durante a fase de desenvolvimento embrionário pré-implantacional, foram
 2650 os tratamentos que apresentaram aumento mais acentuado de metabolização de lipídeos, visto que
 2651 foi observada redução mais acentuada do estoque de ácidos graxos, conforme observado na tabela
 2652 4.

2653

2654

2655

2656

2657

2658

2659 **Tabela 4.** Morfometria embrionária e quantificação de estoque de lipídeos intracitoplasmáticos em embriões
 2660 bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos e embriões cultivados a 38,5 ou 41°C.

Tratamento	<i>n</i>	Nº de gotículas de lipídeos	Área Total lipídeos (pixels)	Tamanho médio dos embriões (µm)	% Área ocupada por gotas lipídicas
Controle	27	2.034,0 a	264.738,9 a	177,3 b	19,0% a
VG	19	1.875,6 a	213.965,0 a	161,6 b	15,4% a
VGEC	18	964,6 b,c	113.171,1 b	162,9 b	8,1% b
MIVEC	20	1.484,2 a,b	229.301,9 a	182,8 b	16,5% a
D7EC	27	788,1 c	238.330,5 a	367,5 a	17,1% a

2661 Controle - oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais; vesícula germinativa -
 2662 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas, seguido de maturação convencional; VGEC -
 2663 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas e expostos a estresse térmico por calor (EC – 41°C)
 2664 durante a pré-maturação; MIVEC – oócitos submetidos a estresse térmico por calor por 12 horas durante a
 2665 maturação; D7EC - embriões produzidos em condições convencionais e submetidos à altas temperaturas por
 2666 12 horas às 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação.

2667 Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre si (P<0,05), de acordo com o teste Newman
 2668 Keuls.

2669

2670 Foi avaliado também o padrão de distribuição de mitocôndrias nos blastômeros de embriões
 2671 submetidos aos mesmos tratamentos supracitados, porém, não houve diferença entre os tratamentos
 2672 (Tabela 5; P>0,05).

2673

2674 **Tabela 5.** Distribuição mitocondrial em blastocistos bovinos produzidos provenientes de oócitos e embriões
 2675 expostos a estresse térmico por calor, em diferentes fases do desenvolvimento *in vitro*.

Tratamento	<i>n</i>	Distribuição de mitocôndrias			
		Periférica	Heterogênea	Central	FEF
Controle	19	63,2%	36,8%	0,0%	0,0%
VG	15	66,7%	33,3%	0,0%	0,0%
VGEC	19	47,4%	31,6%	10,5%	10,5%
MIVEC	17	47,1%	41,2%	11,8%	0,0%
D7EC	23	69,6%	30,4%	0,0%	0,0%

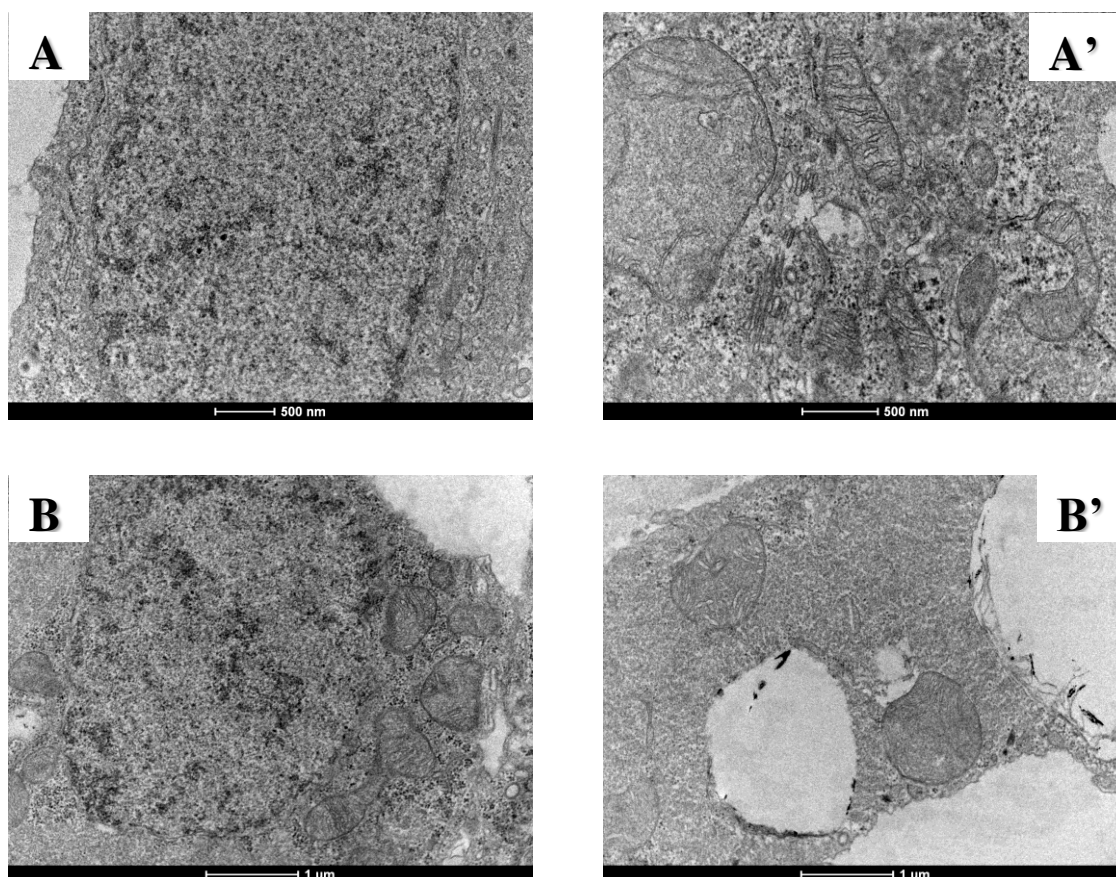
2676 Controle - oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais; vesícula germinativa -
 2677 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas, seguido de maturação convencional; VGEC -

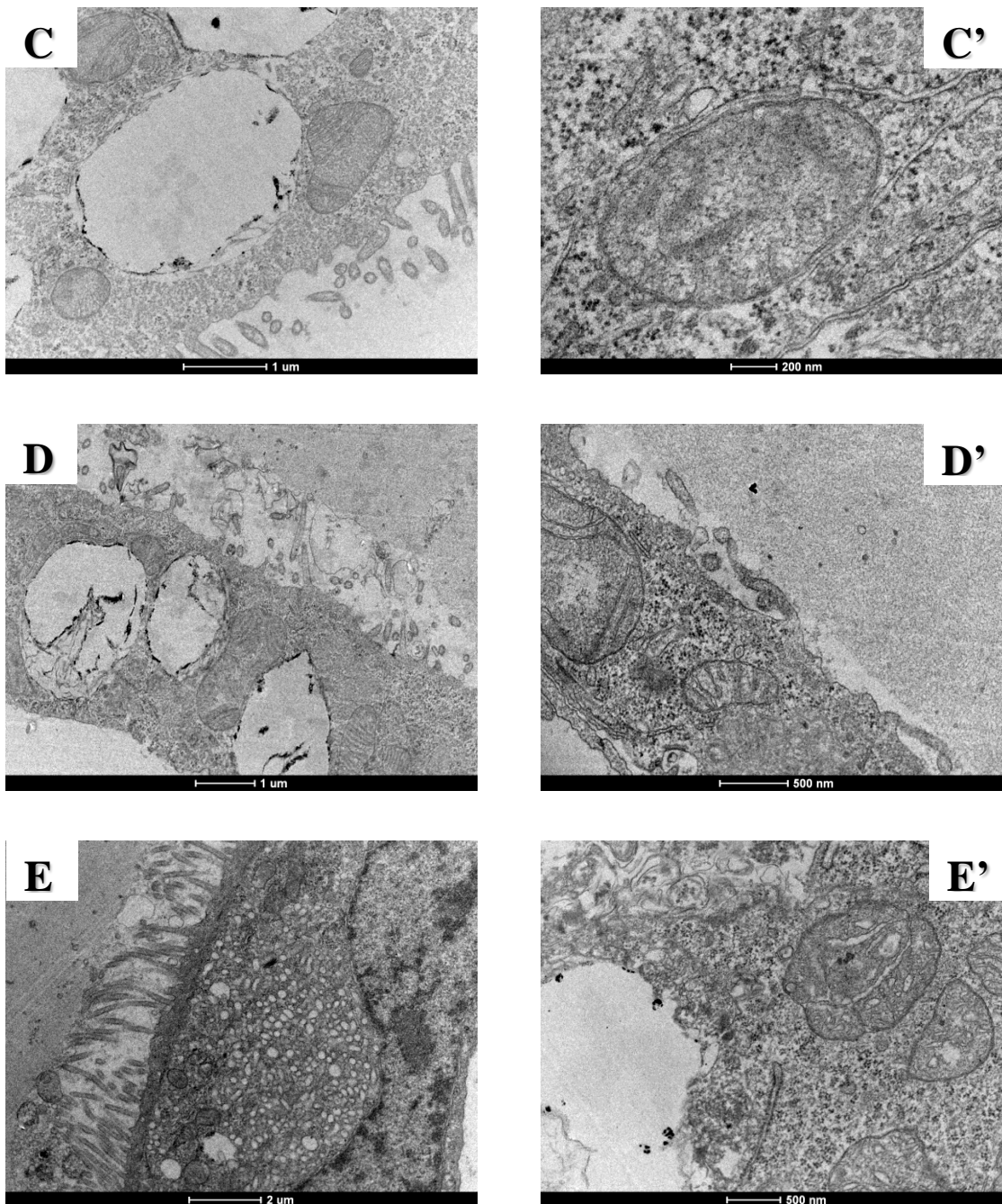
2678 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas e expostos a estresse térmico por calor (EC) durante
2679 a pré-maturação; MIVEC – oócitos submetidos a estresse térmico por calor por 12 horas durante a
2680 maturação; D7EC - embriões produzidos em condições convencionais e submetidos à altas temperaturas por
2681 12 horas às 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação.

2682

2683 Na avaliação de alterações celulares que interferem com metabolismo embrionário, realizada
2684 por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 3), foi observado que os embriões do tratamento
2685 Controle apresentavam mitocôndrias distribuídas principalmente ao redor do núcleo das células
2686 embrionárias. As mitocôndrias apresentavam formato alongado e com inúmeras cristas
2687 mitocondriais, caracterizando células com atividade metabólica normal. Os embriões do tratamento
2688 VG também apresentavam mitocôndrias predominantemente ao redor do núcleo, porém, de formato
2689 arredondado e, algumas delas, com perda de cristas principalmente na região central. Os
2690 tratamentos VGEC, MIVEC e D7EC apresentaram aumento do número de vacúolos
2691 intracitoplasmáticos, grande parte das mitocôndrias estavam distribuídas ao redor destes vacúolos, e
2692 as mitocôndrias apresentavam-se dismórficas, com perda de cristas e edemaciadas. As mitocôndrias
2693 dos embriões do tratamento D7EC também apresentam inúmeros vacúolos.

2694





2695 **Figura 3.** Eletromicrografia de blastocistos bovinos. **A e A'**: Controle - oócitos submetidos à maturação *in*
 2696 *vitro* em condições convencionais; **B e B'**: **vesícula germinativa** - oócitos mantidos em vesícula germinativa
 2697 por 12 horas, seguido de maturação convencional; **C e C'**: VGE - oócitos mantidos em vesícula
 2698 germinativa por 12 horas e expostos a estresse térmico por calor (EC) durante a pré-maturação; **D e D'**:
 2699 MIVEC – oócitos submetidos a estresse térmico por calor por 12 horas durante a maturação; **E e E'**: D7EC -
 2700 embriões produzidos em condições convencionais e submetidos à altas temperaturas por 12 horas às 144
 2701 horas de desenvolvimento pós-inseminação.

2702 **A-** Mitocôndrias localizadas ao redor do núcleo. **A'**- Mitocôndrias alongadas, com maioria das cristas
 2703 mitocondriais preservadas. **B-** Mitocôndrias localizadas ao redor do núcleo. **B''**- Mitocôndrias ao redor de

2704 grande vacúolo. **C, D**- Mitocôndrias distribuídas ao redor de grandes vacúolos. **C', D'**- Mitocôndrias
 2705 edemaciadas e com perda de cristas. **E**- Presença de numerosas vesículas na periferia celular. **E'**- Alteração
 2706 de conformação, edema e vacuolização mitocondrial.

2707

2708 Para mensurar o efeito de estresse térmico por calor na produção e na sobrevivência
 2709 embrionária de oócitos e embriões expostos ao calor excessivo avaliou-se a taxa de clivagem, taxa
 2710 de produção de embrião e taxa de eclosão embrionária (Tabela 6). O grupo VGEC foi o tratamento
 2711 mais afetado pelo estresse térmico por calor, apresentando redução tanto da produção embrionária
 2712 quanto da sobrevivência, avaliada por meio da taxa de eclosão ($P < 0,05$), em relação aos demais
 2713 tratamentos.

2714

2715 **Tabela 6.** Efeito da exposição a estresse térmico por calor de gametas e embriões bovinos, em diferentes
 2716 estádios de desenvolvimento, sobre os parâmetros relacionados com o desenvolvimento *in vitro*.

	Total de oócitos (<i>n</i>)	Taxa de Clivados (%)	Taxa produção embrião / clivados	Taxa produção embrião / total	Taxa de eclosão (%)
CONTROLE	741	93,9% a	45,3% a	42,5% a	62,4% a
VG	629	88,6% b, c	30,7% b	27,2% c	56,2% a
VGEC	666	84,1% c	19,1% c	16,1% d	44,2% b
MIVEC	697	88,7% b	43,5% a	38,6% a, b	62,2% a
D7EC	621	94,5% a	46,7% a	44,1% a	61,5% a
Total	3354	90,0%	37,6%	40,1%	57,3%

2717 Dados foram expressos em porcentagem (número oócitos ou embriões classificados/total analisados).

2718 Controle - oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais; vesícula germinativa -
 2719 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas, seguido de maturação convencional; VGEC -
 2720 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas e expostos a estresse térmico por calor (EC) durante
 2721 a pré-maturação; MIVEC – oócitos submetidos a estresse térmico por calor por 12 horas durante a
 2722 maturação; D7EC - embriões produzidos em condições convencionais e submetidos à altas temperaturas por
 2723 12 horas às 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação. Letras diferentes na mesma coluna indicam
 2724 diferenças entre si ($P < 0,05$), de acordo com o teste Qui-Quadrado.

2725

2726 DISCUSSÃO

2727 O embrião bovino recém-formado tem um futuro incerto e seu destino é ditado, até certo
 2728 ponto, por eventos que ocorrem antes da fecundação (Hansen, 2011; Geary, *et al.*, 2013). Já foi
 2729 observado que altas temperaturas ambientais alteram a competência de desenvolvimento de oócitos,

2730 até mesmo de oócitos imaturos em crescimento, porém, ainda não está bem estabelecido a partir de
2731 qual momento o estresse térmico por calor pode interferir no crescimento e na qualidade de oócitos
2732 (Hansen, 2013). Além disso, também não está bem estabelecido quais são os principais
2733 componentes celulares que, se danificados pelo estresse térmico por calor, determinam falhas de
2734 fecundação, concepção ou manutenção da gestação.

2735 O posicionamento de organelas no citoplasma está relacionado com as necessidades do
2736 oócito em cada estágio de desenvolvimento. Durante a maturação, a movimentação de mitocôndrias
2737 para regiões de maior demanda por substratos energéticos é essencial para o sucesso do ciclo celular
2738 (Jeseta *et al.*, 2014; Landim-Alvarenga e Maziero, 2014). As mitocôndrias podem sofrer alterações,
2739 tanto na quantidade quanto na sua morfologia, quando expostas a condições adversas (Karbowski e
2740 Youli, 2003). Oócitos de baixa qualidade apresentam falhas na translocação de mitocôndrias da
2741 periferia para o centro do oócito, durante a maturação *in vitro* (Stojkovic *et al.*, 2001). Por outro
2742 lado, a distribuição heterogênea ou a formação de agregados de mitocôndrias em oócitos maturados
2743 *in vitro* é uma característica de oócitos saudáveis e de boa competência de desenvolvimento
2744 (Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2011; Jeseta *et al.*, 2014). No presente estudo foi encontrado que o
2745 choque térmico interferiu negativamente com a capacidade dos oócitos de completarem a maturação
2746 nuclear e citoplasmática, visto que a exposição de oócitos imaturos (VGEC) e em fase final de
2747 crescimento (MIVEC) reduziu o número de estruturas aptas à fecundação, ao final da etapa de
2748 maturação *in vitro*. Jeseta *et al.* (2014) também encontraram que a capacidade de completar a
2749 maturação nuclear foi reduzida em oócitos menos competentes, em comparação com as outras
2750 categorias de oócitos, e esse achado esteve associado à perda precoce da comunicação entre oócitos
2751 e células do *cumulus* em gametas atrésicos.

2752 A avaliação da sincronia entre a segregação cromossômica e a reorganização das organelas
2753 no citoplasma após a exposição de oócitos a uma fonte de estresse é importante porque a
2754 assincronia entre os processos de amadurecimento nuclear e citoplasmático do gameta pode resultar
2755 em prejuízos à produção de embriões (Huang *et al.*, 2013).

2756 A hipertermia reduz a habilidade de oócitos completarem a meiose até o estágio de metáfase
2757 II (Roth e Hansen, 2005; Andreu-Vazquez *et al.*, 2010). Além de interferir com a distribuição
2758 citoplasmática de mitocôndrias, oócitos expostos à temperatura ambiental adversa apresentam
2759 alteração do padrão de distribuição de grânulos corticais que se posicionam de maneira semelhante
2760 a oócitos velhos (Andreu-Vazquez *et al.*, 2010).

2761 Na avaliação ultraestrutural de embriões bovinos, que foram submetidos ou não a choque
2762 térmico em algum momento do seu desenvolvimento, foi encontrado que o calor excessivo altera a

2763 distribuição de organelas no citoplasma. Embriões produzidos em condições de conforto térmico
2764 apresentaram a maioria das mitocôndrias ao redor do núcleo, enquanto que os embriões que
2765 passaram por condições de hipertermia apresentaram número reduzido de mitocôndrias ao redor do
2766 núcleo, e grande parte das mitocôndrias avaliadas apresentavam íntima interação com vacúolos
2767 citoplasmáticos. Mitocôndrias dismórficas, arredondadas e com cristas periféricas, conforme
2768 encontradas no presente estudo em embriões submetidos ao calor, caracteriza mitocôndrias imaturas
2769 e com baixa atividade metabólica (Crosier *et al.*, 2001). Adicionalmente, Karbowski e Youle (2003)
2770 encontraram que o aumento no número de mitocôndrias está correlacionado com fragmentação das
2771 mesmas e com aumento do número de corpos apoptóticos, o que justifica os achados desse estudo.

2772 Durante a caracterização da atividade mitocondrial de embriões provenientes de oócitos ou
2773 embriões submetidos a choque térmico, foi observado aumento de atividade mitocondrial nos
2774 embriões que se desenvolveram após exposição a altas temperaturas, em relação aos conceitos
2775 produzidos em condições de termoneutralidade. Em contraste ao encontrado no presente estudo, a
2776 maioria dos autores relata que a exposição de oócitos imaturos e em maturação ao choque térmico
2777 tiveram redução na atividade mitocondrial (Soto e Smith, 2009; Paula-Lopes *et al.*, 2012). Por outro
2778 lado, Koyama e colaboradores (2014) encontraram que embriões derivados de oócitos velhos
2779 apresentaram aumento de atividade mitocondrial e altas concentrações de ATP, indicando que o
2780 estresse térmico por calor pode induzir alterações semelhantes às que ocorrem em oócitos velhos.

2781 Oócitos de menor potencial de produção de blastocistos também produzem embriões com
2782 menor número de blastômeros, bem como com menor número de mitocôndrias ativas (Nagano,
2783 2019). Esse achado condiz com o encontrado no presente estudo, no qual o tratamento VGEC, em
2784 que os oócitos foram expostos à altas temperaturas durante a fase de crescimento, apresentou menor
2785 produção de embrião, embriões menores e menor atividade mitocondrial, quando comparado aos
2786 demais tratamentos, reiterando que nessa fase os oócitos são extremamente sensíveis ao calor.

2787 Sabe-se que qualidade do oócito determina o sucesso do desenvolvimento embrionário
2788 subsequente (Eppig *et al.*, 1989; Hansen, 2002). Um parâmetro bastante utilizado para estimar a
2789 qualidade de gametas e embriões é a mensuração dos estoques de triglicerídeos citoplasmáticos.
2790 Oócitos com citoplasma escuro (marrom), que corresponde ao armazenamento de maiores
2791 quantidades de lipídeos, apresentam elevado potencial de desenvolvimento, enquanto ooplasma
2792 pálido está associado à baixa densidade de organelas e precursores energéticos, resultando em
2793 menor competência de desenvolvimento (Nagano, 2019). Já em embriões, o aumento da
2794 concentração intracitoplasmática de lipídeos é inversamente proporcional à qualidade dos mesmos.
2795 A caracterização da qualidade embrionária, associada aos estoques intracitoplasmáticos de

2796 triglicerídeos, foi realizada com auxílio da técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) na qual
2797 observou-se associação do meio ou do ambiente no qual o conceito se desenvolve, com o aumento
2798 do acúmulo de lipídeos. Na ausência do soro fetal bovino (SFB), o conteúdo de triglicerídeos
2799 endógeno é semelhante em embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, sendo relativamente constante do
2800 estágio de duas células até blastocisto eclodido (Ferguson e Leese, 1999). Em embriões produzidos
2801 *in vitro*, a presença de SFB nos meios de cultivo foi associada ao aumento da deposição lipídica no
2802 citoplasma embrionário (Ferguson e Leese, 1999; Abe *et al.*, 2002). Esse aumento da deposição de
2803 lipídeos foi associado à diminuição da produção de embriões, da implantação embrionária, bem
2804 como da sobrevivência dos mesmos às adversidades, tais como a criopreservação (Abe *et al.*, 2002;
2805 Pereira *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2017).

2806 Anormalidades no metabolismo energético embrionário também podem afetar a densidade
2807 citoplasmática de lipídeos (Ferguson e Leese, 2006). Portanto, a quantificação dos estoques de
2808 triglicerídeos intracitoplasmáticos pode prever tanto a qualidade quanto a taxa metabólica de
2809 embriões bovinos. A Figura 2 apresenta os estoques lipídicos em embriões dos tratamentos
2810 avaliados no trabalho.

2811 Acredita-se que as altas temperaturas ambientais prejudicam a produção de embriões, pois
2812 alteram o crescimento dos oócitos, a formação de transcritos e síntese proteica (Al-Katanani *et al.*,
2813 2002b). O estresse térmico por calor provavelmente compromete a qualidade dos oócitos por alterar
2814 os padrões de desenvolvimento folicular, a produção de hormônios esteroides e a expressão gênica
2815 (Hansen, 2007). Acredita-se que a diminuição da capacidade de desenvolvimento dos oócitos
2816 submetidos ao estresse térmico por calor, durante a maturação, também pode estar associado à
2817 alteração da composição fosfolipídica da membrana oocitária (Zeron *et al.*, 2001).

2818 Na literatura, poucos trabalhos associam a redução da fertilidade das fêmeas bovinas com o
2819 aumento das perdas embrionárias após a exposição às temperaturas ambientais adversas, e a
2820 alterações metabólicas em gametas e células embrionárias que alteram a competência de
2821 desenvolvimento. A proposta principal do trabalho foi evidenciar, pela primeira vez, que o estresse
2822 térmico por calor causa danos que interferem diretamente na funcionalidade e na atividade de
2823 mitocôndrias que, por sua vez, induzem a alterações metabólicas que podem ser as principais causas
2824 da redução da performance reprodutiva de fêmeas bovinas, nos meses de maior temperatura
2825 ambiental. Após a exposição às altas temperaturas ambientais que superam a capacidade fisiológica
2826 do organismo do animal reestabelecer a homeotermia, inicialmente ocorre alteração na distribuição
2827 das mitocôndrias no citoplasma das células embrionárias (Karbowski e Youle, 2003). O
2828 posicionamento das mitocôndrias no citoplasma vai interferir com a eficiência de captação de

2829 substratos, interferindo com a função e o metabolismo mitocondrial (Jeseta *et al.*, 2014). Nessas
2830 condições, a alteração do metabolismo mitocondrial pode resultar em desequilíbrio entre a produção
2831 das espécies reativas de oxigênio e a neutralização pelos antioxidantes naturais, resultando em
2832 quadro que estresse oxidativo que constitui um dos principais sinalizadores da morte celular
2833 programada (apoptose; Van Hoeck *et al.*, 2011).

2834 Já foi descrito anteriormente que a exposição às altas temperaturas aumenta o metabolismo
2835 celular, intensificando a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) ou radicais livres
2836 (Hansen, 2013). *In vivo*, os oócitos e embriões estão protegidos do estresse oxidativo pela presença
2837 de antioxidantes naturais no fluido folicular e na tuba uterina (Crocomo *et al.*, 2012), porém, o
2838 aumento da produção de ERO, induzida pelo estresse térmico por calor, sobrepõe a capacidade de
2839 neutralização dos dos mecanismos de proteção antioxidante. Conforme observado nas tabelas 3 e 4,
2840 os embriões provenientes de oócitos ou embriões submetidos às altas temperaturas de incubação
2841 apresentaram aumento de atividade mitocondrial, associada à diminuição de acúmulo de gotículas
2842 lipídicas intracitoplasmáticas, o que pode caracterizar aumento da peroxidação lipídica. Sabe-se que
2843 altas taxas de metabolismo mitocondrial resultam na produção suprafisiológica de espécies reativas
2844 de oxigênio, aumentando a susceptibilidade de ocorrência de estresse oxidativo.

2845 Na literatura são descritas algumas estratégias para incrementar a função e competência
2846 mitocondrial, dentre elas está a suplementação com antioxidantes. A adição da coenzima Q10 ao
2847 meio de maturação *in vitro* alterou a distribuição e a polarização das mitocôndrias em oócitos,
2848 alterou a expressão gênica, e aumentou o desenvolvimento embrionário (Gendelman e Roth, 2012).
2849 A suplementação da dieta de mulheres idosas com a Coenzima Q10 também incrementou a função
2850 mitocondrial oocitária, melhorando a capacidade de realizar fosforilação oxidativa, a produção de
2851 ATP e a expressão gênica relacionada com a proteção antioxidante (Bentov *et al.*, 2010).

2852 O ditiotreitól (DTT), antocianina extraída da batata-doce roxa com ação antioxidante,
2853 incrementou a resistência de embriões de duas células cultivados em altas temperaturas e elevada
2854 concentração de oxigênio, mas não foi capaz de conferir a mesma proteção aos embriões com mais
2855 de 16 células (De Castro e Paula e Hansen, 2008). A adição da astaxantina aos meios de PIVE
2856 melhora o desenvolvimento embrionário em resposta a estresse térmico por calor por alterar a
2857 expressão dos genes SHC1 e SOD2, relacionados com o estresse (Namekawa *et al.*, 2010).
2858 Celebrian-Serrano *et al.* (2013) avaliaram o efeito da adição da melatonina durante a maturação de
2859 oócitos submetidos ao EC. Foi encontrado que a adição de melatonina no meio de maturação de
2860 oócitos incubados a 41,5°C foi capaz de aliviar os efeitos do estresse sobre a produção de
2861 blastocisto.

2862

2863 **CONCLUSÕES**

2864 O estresse térmico por calor induziu alterações morfofuncionais em embriões bovinos
2865 provenientes de oócitos ou embriões expostos ao calor excessivo, resultando em alteração nos
2866 estoques intracitoplasmáticos de lipídeos, bem como no número e na atividade mitocondrial. O
2867 estresse térmico por calor induz ainda a alterações ultraestruturais em mitocôndrias, que justificam a
2868 alteração de funcionalidade das mesmas. O ovócito imaturo é o estágio mais sensível aos efeitos
2869 deletérios do choque térmico, apresentando não só alterações morfológicas e metabólicas, mas, em
2870 associação aos demais achados, apresentou redução significativa na produção e da eclodibilidade
2871 embrionária.

2872

2873 **AGRADECIMENTOS**

2874 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação
2875 de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de
2876 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e apoio para o
2877 desenvolvimento do trabalho, e pela bolsa de estudos do CNPq. Ao CAPI-UFMG, pela
2878 disponibilização do microscópio confocal. Ao Laboratório de Microscopia e Fotomicroscopia do
2879 DCCV da Escola de Veterinária da UFMG. Ao Centro de Microscopia da UFMG pelo auxílio na
2880 preparação de amostras e análise de microscopia eletrônica de transmissão.

2881

2882 **CONFLITOS DE INTERESSE**

2883 Nenhum dos autores do manuscrito acima tem declarado qualquer conflito de interesse.

2884

2885 **REFERÊNCIAS**

- 2886 ABE, H., YAMASHITA, S., SATOH, T. *et al.* Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine
2887 embryos and criotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or
2888 serum containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 61, p. 57-66, 2002.
- 2889 AL-KATANANI, Y. M., PAULA-LOPES, F. F., HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to
2890 heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 390-396, 2002c.
- 2891 Disponível em: <[doi.org/ 10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74086-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74086-1)>.

2892 AL-KATANANI, Y. M., PAULA-LOPES, F. F., HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to
2893 heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 390-396, 2002b.

2894 ANDREU-VÁZQUEZ, C., LÓPEZ-GATIUS, F., GARCÍA-IZPIERTO, I. *et al.* Does heat stress
2895 provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during
2896 oocyte maturation? *Zygote*, v. 18, p. 293-299, 2010. Disponível em:
2897 <doi.org/10.1017/S0967199410000043>.

2898 BENTOV, Y., ESFANDIARI, N., BURSTEIN, E. B. *et al.* The use of mitochondrial nutrients to
2899 improve the outcome of infertility treatment in older patients. *Fertil. Steril.*, v. 93, p. 272-275,
2900 2010. Disponível em: <doi.org/ 10.1016/j.fertnstert.2009.07.988>.

2901 CAVUSOGLU, T., POPKEN, J., GUENGOER, T. *et al.* Ultra-structural alterations in *in vitro*
2902 produced four-cell bovine embryos following controlled slow freezing or vitrification. *Anat. Histol.*
2903 *Embryol.*, v. 45, p. 291-307, 2016. Disponível em: <dx.doi.org/10.1111/ah.12197>.

2904 CELEBRIAN-SERRANO, A., SALVADOR, I., RAGA, I. *et al.* Beneficial effect of melatonin on
2905 blastocyst *in vitro* production from heat-stressed bovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 48, p.
2906 738-746, 2013. Disponível em: <doi.org/10.1111/rda.12154>.

2907 CROCOMO, L. F., MARQUES FILHO, W. C., LANDIM-ALVARENGA, F. C. *et al.* Produção de
2908 embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. *Vet. Zootec.*, v. 19, n.4, p. 470-479, 2012.
2909 Disponível em: <doi.org/19(4): 470-479>.

2910 CROSIER, A. E., FARIN, P. W., DYKSTRA, M. J. *et al.* Ultrastructural morphometry of bovine
2911 blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v. 64, p. 1375-1385, 2001. Disponível em:
2912 <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.5.1375>.

2913 DE CASTRO E PAULA, L. A. e HANSEN, P. J. Modification of actions of heat shock on
2914 development and apoptosis of cultured preimplantation bovine embryos by oxygen concentration
2915 and dithiothreitol. *Mol. Reprod. Devel.*, v. 75, p. 1338-1350, 2008. Disponível em:
2916 <doi.org/10.1002/mrd.20866>.

2917 EALY, A.D., DROST, M., HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to
2918 adverse effects of maternal stress in cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.2899-2905, 1993. Disponível em:
2919 <doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77629-8>

2920 EDWARDS, J., HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation
2921 embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Devel.*, v. 46, p. 138-145, 1997. Disponível em:
2922 <doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<138::AID-MRD4>3.0.CO;2-R>.

2923 EPPIG, J. J. e SCHROEDER, A. C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo
2924 embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*.
2925 *Biol. Reprod.*, v. 41, p. 268-276, 1989.

2926 FERGUSON, E. M. e LEESE, H. J. A potential role for triglyceride as an energy source during
2927 bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 73, p. 1195-1201,
2928 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mrd.20494>>.

2929 FERGUSON, E. M. e LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J.*
2930 *Reprod. Fertil.*, v. 116, p. 373-378, 1999. Disponível em: <[doi: 10.1530/jrf.0.1160373](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1160373)>.

2931 GENDELMAN, M. e ROTH, Z. Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves
2932 mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental
2933 competence. *Biol. Reprod.*, v. 87, p. 1-12, 2012. Disponível em:
2934 <doi.org/10.1095/biolreprod.112.10188>.

2935 GEARY, T.W., SMITH, M. F., MACNEIL, M. D. *et al.* Influence of follicular characteristics at
2936 ovulation on early embryonic survival. *J. Anim. Sci.*, v. 91, p. 3014-3021, 2013.

2937 HANSEN, P. J. Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on
2938 embryonic development in cattle. *Anim. Reprod.*, v. 10, n. 3, p. 322-333, 2013.

2939 HANSEN, P. J. Challenges to fertility in dairy cattle: from ovulation to the fetal stage of pregnancy.
2940 *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 35, n. 2, p. 229-238, 2011.

2941 HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, v. 364, p.
2942 3341-3350, 2009.

2943 HANSEN, P. J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to
2944 elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress.
2945 *Theriogenology*, v. 68, p. 242-249, 2007. Disponível em: <[doi.org/
2946 10.1016/j.theriogenology.2007.04.008](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.008)>.

2947 HANSEN, P. J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *J. Anim. Sci.*, v. 80, p.
2948 33-44, 2002.

2949 HOLM, P., BOOTH, P. J., SCHMIDT, M. H. *et al.* High bovine blastocyst development in a static
2950 *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-
2951 inositol or without serum-proteins. *Theriogenology*, v.52, p.683-700, 1999. Disponível em:
2952 <[doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00162-4)>.

2953 HUANG, W., NAGANO, M., KANG, S.S. *et al.* Effects of *in vitro* growth culture duration and
2954 prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived
2955 from early antral follicles. *Theriogenology*, v. 80, p. 793-799. 2013. Disponível em:
2956 <doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.004.07.004>.

2957 JESETA, M., CTVRTLIKOVA KNITLOVA, D., HANZALOVA, K. *et al.* Mitochondrial patterns
2958 in bovine oocytes with different meiotic competence related to their *in vitro* maturation. *Reprod.*

2959 *Dom. Anim.*, v. 49, p. 469–475, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/rda.12313>>.

2960 KADZERE, C. T., MURPHY, M. R., SILANIKOVE, N. *et al.* Heat stress in lactating dairy cows:
2961 A review. *Livest. Prod. Sci.*, v. 77, p. 59–91, 2002. Disponível em: <[doi.org/10.1016/S0301-](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00330-X)
2962 [6226\(01\)00330-X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00330-X)>.

2963 KARBOWSKI, M. e YOULE, R. J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and
2964 during apoptosis. *Cell Death Differ.*, v. 10, p. 870-880, 2003. Disponível em:
2965 <[doi:10.1038/sj.cdd.4401260](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401260)>.

2966 KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L., ALM, H., TORNER, H. *et al.* Mitochondrial aggregation patterns
2967 and activity in *in vitro* cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles.
2968 *Theriogenology*, v. 75, p. 662–670, 2011. Disponível em:
2969 <<https://doi.org/10.1016/j.Theriogenology.2010.10.006>>.

2970 KOYAMA, K., KANG, S. S., HUANG, W. *et al.* Aging-related changes in *in vitro*-matured bovine
2971 oocytes: oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation. *J.*
2972 *Reprod. Dev.*, v. 60, p. 136–142, 2014. Disponível em: <[doi.org/ 10.1262/jrd.2013-115](https://doi.org/10.1262/jrd.2013-115)>.

2973 LANDIM-ALVARENGA, F. C. e MAZIERO, R. R. D. Control of oocyte maturation. *Anim.*
2974 *Reprod.*, p. 150–158, 2014.

2975 LEITE, A. C., ANDRADE, V. B., SILVA, E. B. M. *et al.* Efeito da adição do ácido linoleico
2976 conjugado no cultivo *in vitro* de embriões F1 Holandês x Zebu na sobrevivência pós-vitrificação.
2977 *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 69, n.6, p.1385-1392, 2017. Disponível em:
2978 <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9238>>.

2979 MAZIERO, R. R. D., GUAITOLINI, C. R. F., PASCHOAL, D. M. *et al.* Treatment with
2980 roscovitine and butyrolactone I prior to *in vitro* maturation alters blastocyst production. *Zygote*, v.
2981 11, p. 1-8, 2019. Disponível em: <doi.org/10.1017/S0967199419000571 >.

2982 NAGANO, M. Acquisition of developmental competence and *in vitro* growth culture of bovine
2983 oocytes. *J. Reprod. Dev.*, v. 65, p. 195-201, 2019. Disponível em: <[doi.org/ 10.1262/jrd.2019-022](https://doi.org/10.1262/jrd.2019-022)>.

2984 NAMEKAWA, T., IKEDA, S., SUGIMOTO, M. *et al.* Effects of astaxantin-containing oil on
2985 developmental and stress-related gene expression. Of bovine oocyte exposed to heat stress. *Reprod.*
2986 *Dom. Anim.*, v. 45, p. 387-391, 2010. Disponível em: <[doi.org/ 10.1111/j.1439-](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01584.x)
2987 [0531.2010.01584.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01584.x)>.

2988 OLIVEIRA, F. D., SANGALLI, J. R., MEIRELLES, F. V. *et al.* Bovine conceptus *Bos indicus*
2989 produced by somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis presented morphological variations
2990 since blastocyst stage. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 67, p. 1483-1491, 2015. Disponível em:
2991 <dx.doi.org/10.1590/1678-4162-7647>.

2992 PARRISH, J.J., KROGRNAES, A., SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by
2993 either swim-up and *Percoll* method on success of “*in vitro*” fertilization and early embryonic
2994 development. *Theriogenology*, v.44, p.859-869, 1995.

2995 PAULA-LOPES, F. F., LIMA, R., RISOLIA, P. H. B. *et al.* Heat stress induced alteration in bovine
2996 oocytes: functional and cellular aspects. *Anim. Reprod.*, v. 9, p. 395-403, 2012.

2997 PEREIRA, R. M., CARVALHAIS, I., PIMENTA, J. *et al.* Biopsed and vitrified bovine embryos
2998 viability is improved by tras10, cis12 conjugated linoleic acid supplementations during *in vitro*
2999 embryo culture. *Anim. Reprod. Sci.*, v.106, p.322-332, 2008. Disponível em:
3000 <doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.05.008>.

3001 POLSKY, L. e VON KEYSERLINGK, M. A. G. Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *J.*
3002 *Dairy Sci.*, v. 100, p. 8645–8657, 2017. Disponível em: <doi.org/10.3168/jds.2017-12651>.

3003 ROTH, Z. Reduction in oocyte development competence by stress is associated with alterations in
3004 mitochondrial function. *J. Dairy Sci.*, v. 101, p. 3642-3654, 2018. Disponível em:
3005 <doi.org/10.3168/jds.2017-13389>.

3006 ROTH, Z. e HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal
3007 elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, v. 129, p. 235–
3008 244, 2005. Disponível em: <doi.org/10.1530/rep.1.00394>.

3009 ROTH, Z. e HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of
3010 bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.*, v. 71, p. 1898-1906, 2004.

3011 SOTO, P. e SMITH, L. C. BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses
3012 apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 76, p. 637–
3013 646, 2009. Disponível em: <doi.org/10.1002/mrd.20986>.

3014 STEWART, B. M., BLOCK, J., MORELLI, P. *et al.* Efficacy of embryo transfer in lactating dairy
3015 cows during summer using fresh or vitrified embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. *J.*
3016 *Dairy Sci.*, v. 94, p. 3437-3445, 2011. Disponível em: <doi.org/10.3168/jds.2010-4008>.

3017 STOJKOVIC, M., MACHADO, S. A., STOJKOVIC, P. *et al.* Mitochondrial distribution and
3018 adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation
3019 with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol.*
3020 *Reprod.*, v. 64, p. 904–909, 2001. Disponível em:
3021 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207207>>.

3022 STURMEY, R. G., REIS, A., LEESE, H. J. *et al.* Role of fatty acids in energy provision during
3023 oocyte maturation and early embryo development. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 44, p. 50-58, 2009.
3024 Disponível em: <doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01402.x>.

3025 SUDANO, M. J., SANTOS, V. G., TATA, A. *et al.* Phosphatidylcholine and sphingomyelin
3026 profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts.
3027 *Biol. Reprod.*, v. 87, p. 1-11, 2012. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1095/biolreprod.112.102897](https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102897)>.
3028 THOMPSON, J. G., BELL, A. C. S., TERVIT, H. R. Partitioning of glucose carbon in post-
3029 compaction ovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 38, p. 119-126, 1995. Disponível em:
3030 <[doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01350-U](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01350-U)>.
3031 VAN HOECK, V., STURMEY, R. G., BERMEJO-ALVREZ, P. *et al.* Elevated non-esterified fatty
3032 acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *Plos*
3033 *ONE*, v. 6, p. 1-9, 2011. Disponível em: <doi.org/10.1371/journal.pone.0023183>.
3034 ZERON, Y., OCHENRETNEY, A., KEDAR, O. *et al.* Seasonal changes in bovine fertility: relation
3035 to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of
3036 follicles. *Reproduction*, v. 121, p. 447-454, 2001.
3037

8. CAPÍTULO IV –

APOPTOSE E ULTRAESTRUTURA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* APÓS EXPOSIÇÃO A CHOQUE TÉRMICO NAS FASES PRÉ-MATURAÇÃO, MATURAÇÃO OOCITÁRIA E DE BLASTOCISTO

Ana Carolina Leite, Luciano de Rezende Carvalheira, Philipe Pimenta Nunes, Eliane Beatriz da Silva Magalhães, Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Alan Maia Borges

RESUMO

O presente trabalho objetivou estudar os efeitos da exposição de oócitos e embriões bovinos ao choque térmico, sobre apoptose e ultraestrutura celular. Oócitos e embriões bovinos, divididos em cinco tratamentos, foram submetidos a estresse térmico por calor (EC) por elevação da temperatura de incubação, em diferentes estádios de desenvolvimento. No Controle, oócitos e embriões foram cultivados a 38,5°C durante todas as etapas da produção *in vitro* de embriões (PIVE). No tratamento vesícula germinativa (VG), oócitos foram mantidos por 12 horas em estágio de vesícula germinativa, por indução farmacológica com Butirolactona-I (BUT-I) e, em seguida, foram submetidos à PIVE em condições convencionais de temperatura (38,5°C). No tratamento VGEC, oócitos mantidos em vesícula germinativa foram expostos a choque térmico (41°C por 12h) durante a pré-maturação e, em seguida, submetidos à PIVE convencional. No tratamento MIVEC os oócitos foram submetidos a choque térmico durante as primeiras 12 horas de maturação (41°C por 12h seguido de 38,5°C por 12h) e, em seguida, submetidos à fecundação e cultivo em condições de termoneutralidade (38,5°C). No tratamento D7EC foram submetidos às 12h de choque térmico embriões de 144 horas de pós-inseminação, em seguida foram submetidos a 12h de cultivo em condições convencionais de temperatura. VGEC apresentou redução de células do embrioblasto, sendo que os demais tratamentos foram semelhantes ao Controle ($P > 0,05$; nº de células do embrioblasto em VGEC foi de 47,0 enquanto o Controle apresentou 65,4, VG 59,1, MIVEC 62,7 e D7EC 73,9). A incidência de apoptose das células embrionárias também não diferiu entre os tratamentos. Blastocistos provenientes de oócitos ou embriões estressados pelo calor apresentaram alterações ultraestruturais importantes em mitocôndrias, microvilosidades, apresentando aumento de vacuolizações citoplasmáticas e do número de corpos apoptóticos. Nos parâmetros relacionados com produção e sobrevivência embrionária, oócitos submetidos ao estresse térmico por calor apresentaram redução de clivagem (84,1% em VGEC, 88,7% em MIVEC, enquanto Controle apresentou clivagem de 93,9% e D7EC de 94,5%) e de produção de embrião (taxa de produção de embrião em relação ao total de oócitos de 16,1% para o tratamento VGEC e 42,5% para Controle,

3071 44,1% para D7EC e 38,6% para MIVEC), em relação ao Controle ($P < 0,05$). Adicionalmente, o
3072 tratamento VGEC apresentou redução da taxa de eclosão embrionária, em relação aos demais
3073 tratamentos ($P < 0,05$; VGEC 44,2%, Controle 62,4%, VG 56,2%, MIVEC 62,2% e D7EC 61,5%).
3074 Conclui-se que oócitos imaturos são altamente susceptíveis aos efeitos deletérios da exposição a
3075 temperaturas elevadas, apresentando não somente alterações estruturais como também alteração de
3076 desenvolvimento. Já embriões bovinos, apesar de não apresentarem alterações de desenvolvimento
3077 no período avaliado, foi identificado importantes alterações em organelas essenciais para o
3078 crescimento e implantação embrionária.

3079 **Palavras-Chave:** estresse térmico por calor, apoptose embrionária, ultraestrutura embrionária,
3080 perda embrionária.

3081

3082 **ABSTRACT**

3083 The present work aimed to study the effects of exposure of bovine oocytes and embryos to thermal
3084 shock on cell apoptosis and cell ultrastructure. Bovine oocytes and embryos, divided into five
3085 treatments, were submitted to heat stress (HS) by increasing incubation temperature at different
3086 developmental stages. In Control, oocytes and embryos were cultured at 38.5°C during all stages of
3087 IVEP. In the germinative vesicle (VG) treatment, oocytes were maintained for 12 hours in
3088 germinative vesicle stage by pharmacological induction with Butyrolactone-I (BUT-I) and then
3089 underwent *in vitro* embryo production (IVEP) under conventional temperature conditions (38.5°C).
3090 In VGEC treatment, oocytes kept in germinative vesicle stage were exposed to heat shock (41°C for
3091 12h) during pre-maturation and then submitted to IVEP under conventional temperature conditions
3092 (38.5°C). In the MIVEC treatment, the oocytes were subjected to heat shock during the first 12
3093 hours of maturation (41°C for 12h followed by 38.5°C for 12h) and then subjected to fertilization
3094 and cultivation under conditions of thermoneutrality (38.5°C). In the D7EC treatment embryos were
3095 subjected to 12 h of heat shock after 144 hours post-insemination, then they were subjected to 12 h
3096 of culture under conventional temperature conditions. VGEC showed reduction of embryoblast
3097 cells, unlike the other treatments were similar to the Control ($P > 0.05$; number of embryoblast cells
3098 in VGEC was 47.0 while the Control presented 65.4, VG 59.1, MIVEC 62.7 and D7EC 73.9). The
3099 incidence of apoptosis of embryonic cells did not differ between treatments. Blastocysts from
3100 oocytes or embryos stressed by heat showed significant ultrastructural changes in mitochondria and
3101 microvilli, with an increase in cytoplasmic vacuolations and the number of apoptotic bodies. In the
3102 parameters related to embryonic production and survival, oocytes subjected to heat stress showed a
3103 reduction in cleavage (84.1% in VGEC, 88.7% in MIVEC, while Control showed a cleavage index
3104 of 93.9% and D7EC of 94.5 %) and embryo production (embryo production rate in relation to total
3105 oocytes was 16.1% for VGEC treatment and 42.5% for Control, 44.1% for D7EC and 38.6% for
3106 MIVEC) , in relation to the Control ($P < 0.05$). Additionally, the VGEC treatment showed a
3107 reduction in the embryonic hatching rate, in relation to the other treatments ($P < 0.05$; VGEC
3108 44.2%, Control 62.4%, VG 56.2%, MIVEC 62.2% and D7EC 61.5%). It follows that immature
3109 oocytes are highly susceptible to the deleterious effects of exposure to elevated temperatures,
3110 presenting not only structural changes, but also developmental changes. In contrast, bovine
3111 embryos, despite not showing developmental changes in the evaluated period, there was identified
3112 important changes in organelles essential for embryonic growth and implantation.

3113 **Keywords:** heat stress, embryonic apoptosis, embryonic ultrastructure, embryonic loss.

3114

3115 INTRODUÇÃO

3116 O clima é um dos componentes ambientais que mais interfere no bem-estar animal,
3117 representando fator determinante da produção e produtividade dos rebanhos bovinos (Pereira,
3118 2005). A percepção do calor externo é resultado da combinação de temperatura ambiental com a
3119 umidade relativa do ar, algumas vezes associada à radiação solar e velocidade do vento, que
3120 determina a sensação de desconforto ou conforto térmico. Ambientes quentes e úmidos podem
3121 afetar de maneira adversa a produção animal, em resposta a efeitos da alta temperatura do ar,
3122 diminuindo a ingestão de alimentos, o ganho de peso (Allen *et al.*, 1963; Rhoads *et al.*, 2009;
3123 Wheelok *et al.*, 2010; Baumgard e Rhoads, 2012), a resistência a doenças (Baumgard *et al.*, 2015) e
3124 a fertilidade dos animais (Berman *et al.*, 1985; Zeron *et al.*, 2001; Al-Katanani *et al.*, 2002a; Al-
3125 Katanani *et al.*, 2002b; Sartori *et al.*, 2002; West *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2011). A redução de
3126 produção e das taxas de concepção, durante a época do ano de temperatura mais elevada, é um
3127 problema de extensão mundial já que, até mesmo em regiões de clima temperado, durante o verão,
3128 as temperaturas se elevam acima da zona de termoneutralidade para vacas leiteiras (Veissier *et al.*,
3129 2018).

3130 Durante os meses quentes do ano é observada queda acentuada na taxa de concepção de
3131 vacas e novilhas. Foi demonstrado que vacas com parição em meses mais quentes apresentam
3132 períodos de serviço mais longos, quando comparadas àquelas que pariram em meses mais frios. Isto
3133 ocorre devido à redução na competência do oócito em se desenvolver em embrião, assim como o
3134 aumento das taxas de morte embrionária quando a vaca é submetida ao estresse térmico (Zeron *et*
3135 *al.*, 2001).

3136 Acredita-se que a morte embrionária ocorra em resposta aos efeitos adversos da elevação da
3137 temperatura corporal materna, interferindo tanto na função ovariana quanto uterina (Sakatani *et al.*,
3138 2012). Entretanto, ainda não se sabe ao certo qual o fator ou quais os fatores que determinam o
3139 sucesso do estabelecimento da gestação em fêmeas submetidas a estresse térmico por calor.

3140 Tendo em vista o impacto da pecuária para a economia brasileira, é importante conhecer
3141 melhor quais são os fatores limitantes para a produção e sobrevivência do conceito bovinos,
3142 visando incrementar os índices reprodutivos dos rebanhos, bem como desenvolver estratégias para
3143 melhorar a sobrevivência embrionária. O presente trabalho propõe estudar efeitos da exposição de
3144 oócitos imaturos, de oócitos durante a maturação e de blastocistos às elevadas temperaturas *in vitro*
3145 sobre a taxa de fragmentação de DNA e ultraestrutura das células embrionárias.

3146

3147 **MATERIAL E MÉTODOS**

3148 O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões da Escola de
3149 Veterinária da UFMG, durante o período de fevereiro de 2018 a outubro de 2019. Todos os
3150 procedimentos adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG
3151 (Protocolo nº 129/2017). Todos os reagentes que serão utilizados nesse experimento serão
3152 adquiridos da Sigma[®] Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a não ser que seja especificado.

3153 Foram utilizados oócitos obtidos de ovários provenientes de fêmeas bovinas, coletados em
3154 abatedouro da região metropolitana de Belo Horizonte, com habilitação de inspeção federal. Não foi
3155 realizada coleta de ovários nos meses mais quentes do ano (de novembro a fevereiro), para eliminar
3156 qualquer efeito sazonal nos oócitos.

3157 Os ovários coletados foram transportados até o laboratório em solução fisiológica (0,9% de
3158 NaCl) aquecida entre 30 e 35°C, em tempo não superior a quatro horas após o término do abate. Os
3159 folículos com diâmetro entre 3 e 8mm foram puncionados com o auxílio de seringa e agulha
3160 descartáveis e, em seguida, os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) presentes no líquido folicular
3161 foram rastreados e classificados em relação à qualidade do citoplasma (homogeneidade, coloração e
3162 presença de granulações) e número de camadas de células do *cumulus*, com auxílio de um
3163 microscópio estereoscópico.

3164 Os CCOs selecionados para a maturação foram lavados em meio TCM-199 Hepes (Gibco[®]
3165 Life Technologies, Grand Island, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB -
3166 Gibco[®] Life Technologies, Grand Island, USA), 83,4µg/mL de amicacina, e 22µg/mL de piruvato,
3167 e sequencialmente foram distribuídos em cinco grupos: Controle, no qual oócitos e embriões foram
3168 cultivados a 38,5°C durante todas as etapas da produção *in vitro* de embriões (PIVE); Vesícula
3169 germinativa (VG), no qual os oócitos foram mantidos por 12 horas em estágio de vesícula
3170 germinativa, por indução farmacológica com Butirolactona-I (BUT-I; Enzo[®] Life Sciences, PA,
3171 USA - ML-CC210-1000) e, em seguida, foram submetidos à PIVE em condições convencionais de
3172 temperatura (38,5°C); VGEC, no qual os oócitos mantidos em vesícula germinativa foram expostos
3173 a choque térmico (41°C por 12h) durante a pré-maturação e, em seguida, submetidos à PIVE em
3174 condições convencionais de temperatura (38,5°C); no MIVEC, os oócitos foram submetidos a
3175 choque térmico durante a maturação (41°C por 12h seguido de incubação à 38,5°C por 12h) e, em
3176 seguida, submetidos à fecundação e cultivo em condições convencionais de temperatura; e D7EC,
3177 no qual foram submetidos a choque térmico blastocistos de 144 horas de desenvolvimento pós-
3178 inseminação, sendo que o restante do cultivo realizado em condições convencionais de temperatura.

3179 Para a fecundação *in vitro* (FIV) utilizou-se sêmen de touro da raça Holandesa, previamente
3180 avaliado quanto à fertilidade em sistemas de produção *in vitro*. A seleção de espermatozoides
3181 viáveis para a FIV foi realizada utilizando-se o método do gradiente descontínuo de *Percoll* e o
3182 *pellet* resultante da centrifugação foi lavado em meio de capacitação espermática (TALP), tendo a
3183 concentração ajustada para 1×10^6 espermatozoides/mL. O meio de FIV utilizado foi constituído
3184 por FERT-TALP (Parrish *et al.*, 1995) suplementado com amicacina (83,4µg/mL), penicilamina
3185 (27µg/mL), hipotaurina (1µg/mL), epinefrina (0,3µg/mL), albumina sérica bovina (5µg/mL),
3186 piruvato (22µg/mL) e heparina (10µg/mL). Os CCOs foram fecundados e incubados nas mesmas
3187 condições da MIV, por um período de 10 horas, sendo o dia da fecundação considerado o D0.

3188 Após a FIV, os zigotos foram debridados das células do CCOs e, em seguida, foram
3189 submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV), em meio *Synthetic Oviduct Fluid Medium* (SOFaa)
3190 suplementado com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) e 2,5% de soro fetal bovino (SFB). No
3191 D3 foi avaliada a taxa de clivagem, no D7 foi avaliada a produção de blastocistos de cada
3192 tratamento, e no D8 foi avaliada a sobrevivência embrionária mensurada pelo número de embriões
3193 eclodidos da zona pelúcida.

3194 **Avaliação do número total de células embrionárias e da taxa de apoptose celular**

3195 Para determinação do número de células embrionárias que apresentavam fragmentação do
3196 DNA foi realizado o teste TUNEL (*Terminal Deoxynucleotil Transferase Uracil Nick End*
3197 *Labeling*). A fragmentação do DNA foi avaliada como indicador de apoptose em células
3198 embrionárias, utilizando o Kit comercial *Dead End Fluorimetric TUNEL System* (Promega®,
3199 Madison, WI, USA). No D7 do cultivo, para cada rotina de produção de embriões, quinze
3200 blastocistos bovinos provenientes dos cinco tratamentos foram fixados em formaldeído 4%. O teste
3201 para avaliação da apoptose foi realizado de acordo com as recomendação descritas no Kit.
3202 Primeiramente, os embriões são permeabilizados em solução DPBS acrescida de 0,2% de Triton X-
3203 100, e incubados em gotas de tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeos, enzima rTdT e corante de
3204 fluoresceína-12-dUTP, que cora o DNA fragmentado. Na etapa subsequente, os embriões foram
3205 transferidos para lâmina, corados com Hoechst 33342 em glicerol e recobertos com *cover slip*.
3206 Todos os blastômeros embrionários marcados pelo Hoechst são corados em azul, sendo
3207 visualizados em filtro de 460nm em microscópio de fluorescência. As células embrionárias em
3208 apoptose foram identificadas no filtro de 520 ± 20 nm, corando-se de cor verde pela fluoresceína. As
3209 lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência Leica DM4000 B (Leica®
3210 Microsystems versão 4.8.0, Suíça). A quantificação das células embrionárias totais, número de

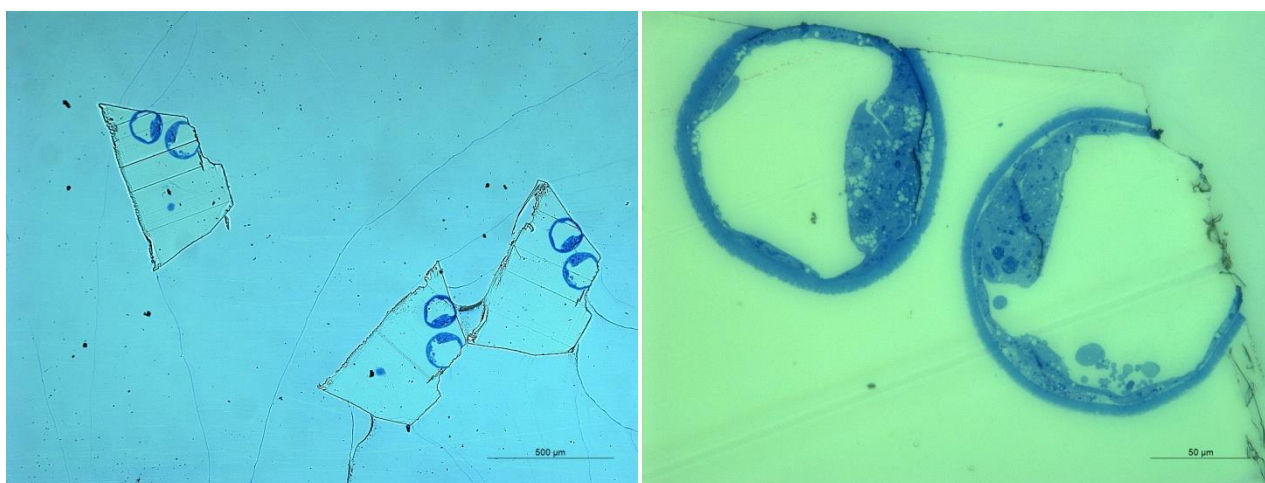
3211 células do trofoblasto, do embrioblasto e de células apoptóticas foi realizado no software IMAGE J
3212 1.41.

3213 **Microscopia eletrônica de transmissão - MET**

3214 Para avaliação das alterações ultraestruturais em embriões bovinos submetidos a estresse
3215 térmico por calor, cinco embriões de sete dias de desenvolvimento de cada tratamento experimental
3216 foram fixados em glutaraldeído 2,5% para serem preparados para a microscopia eletrônica de
3217 transmissão. Após a fixação primária, foi realizada a fixação secundária em tetróxido de ósmio
3218 (OsO_4) 1% e KFeCN 1,5%. Em seguida, os embriões foram contrastados em acetato de uranila
3219 0,5% e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico a 70%, 80%, 90%, 95% e 100%
3220 e, posteriormente, em acetona.

3221 Após a desidratação, foi realizada a primeira infiltração pela substituição da acetona por
3222 solução de Araldite e acetona na proporção de 1:1, onde as estruturas foram mantidas por 24 horas.
3223 Na sequência, essa mistura foi substituída por resina pura. Seções semifinas foram coradas com azul
3224 de toluidina e examinadas em microscópio óptico para selecionar as áreas destinadas à preparação
3225 das telas de microscopia eletrônica (Figura 1). Seções ultrafinas foram contrastadas com acetato de
3226 uranila 3% e citrato de chumbo 1% para a preparação das telas de microscopia eletrônica. As
3227 observações ultraestruturais dos embriões foram feitas com o Microscópio Eletrônico de
3228 Transmissão Tecnai G2-12 – Spirit Biotwin FEI -120kV. A preparação e imageamento das amostras
3229 foram realizadas em parceria com o Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG.

3230



3231

3232 **Figura 1.** Cortes semi-finos de embriões bovinos corados em azul de toluidina para preparação do material
3233 destinado à microscopia eletrônica de transmissão.

3234

3235 **Análises estatísticas**

3236 O experimento seguiu delineamento inteiramente ao acaso. Os grupos de oócitos foram
3237 considerados unidades experimentais. Os resultados de taxas de clivagem e de produção de
3238 embrião, segundo rotina laboratorial, foram considerados réplicas, enquanto as avaliações do
3239 número de células embrionárias totais e número de células apoptóticas e ultramicroscopia
3240 embrionária foram analisadas para embrião separadamente. Para ultramicroscopia embrionária foi
3241 realizada análise descritiva dos principais achados. As variáveis quantitativas foram inicialmente
3242 submetidas aos testes Kolmogorov-Smirnov e Cochran e Berttlet para verificação da normalidade e
3243 homogeneidade das variâncias. As variáveis submetidas à análise de variância foram posteriormente
3244 avaliadas por teste de comparações múltiplas de médias, utilizando-se nível de significância de 5%.
3245 O programa de estatística utilizado para comparação dos resultados obtidos no presente trabalho foi
3246 o *GraphPad Instat*[®] 3.0. Para os resultados de embriões clivados, produção de embriões em relação
3247 ao total de clivados, e produção de embriões em relação ao total de oócitos inseminados foi
3248 utilizado o teste Qui-quadrado. Para comparação do número células do trofoblasto e da massa
3249 celular interna de embriões dos diferentes tratamentos experimentais foi utilizado o teste Scott-
3250 Knott.

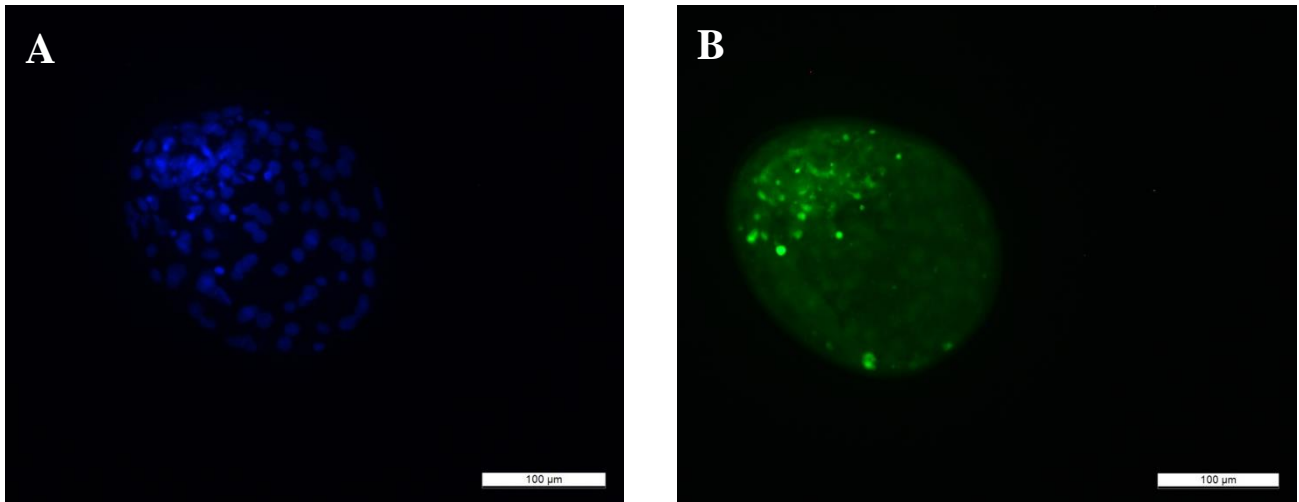
3251

3252 **RESULTADOS**

3253 A contagem do número de células positivas no teste de TUNEL foi utilizada para mensurar a
3254 fragmentação de DNA nuclear, que é correlacionada com a taxa de morte celular programada
3255 (apoptose), parâmetro utilizado como critério para definir a qualidade embrionária (Figura 2).

3256

3257



3258 **Figura 2.** Blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Fotomicrografias representativas de microscopia de
3259 fluorescência de embriões bovinos corados com Hoechst 33342 e TUNEL. (A) Contagem dos núcleos
3260 celulares marcados com Hoechst (azul); (B) Marcação de células com fragmentação do DNA nuclear com o
3261 TUNEL (verde).

3262

3263 No presente estudo foi encontrado que ovócitos imaturos submetidos a estresse térmico por
3264 calor (VGEC) produziram embriões com número total de células embrionárias reduzidas.
3265 Adicionalmente, foi observado redução das células do trofoblasto e do embrioblasto em relação ao
3266 Controle ($P < 0,05$). Os tratamentos que foram induzidos ao choque térmico, durante a maturação
3267 (MIVEC) e na fase embrionária (D7EC), apresentaram número total de células embrionárias e
3268 número de células do embrioblasto semelhantes ao Controle ($P > 0,05$), porém, foi encontrado
3269 aumento de células do trofoblasto nos embriões dos tratamentos supracitados ($P < 0,05$; Tabela 1).

3270

3271

3272

3273

3274

3275

3276

3277

3278

3279 **Tabela 1.** Número total de células embrionárias, número de células do trofoblasto, número de células do
 3280 embrioblasto e porcentagem de blastômeros positivos para o teste de TUNEL (células apoptóticas) em
 3281 blastocistos expandidos produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados ou embriões mantidos a 38,5 ou
 3282 41°C.

Tratamento	n	Células			
		Total células embrionárias (n)	trofoblasto - n (%)	embrioblasto - n (%)	apoptóticas - n (%)
Controle	21	109,7 a, b	44,3 (40,4%) a	65,4 (59,6%) a	5,7 (5,2%)
VG	17	91,4 a, b	32,4 (35,4%) b	59,1 (64,6%) a	7,5 (8,2%)
VGEC	20	79,3 b	32,3 (40,8%) b	47,0 (59,2%) b	9,7 (12,2%)
MIVEC	19	106,5 a, b	43,8 (41,1%) a	62,7 (58,9%) a	7,5 (7,1%)
D7EC	18	121,5 a	47,6 (39,2%) a	73,9 (60,8%) a	10,3 (8,5%)

3283 Dados foram expressos em porcentagem (número embriões classificados/total analisados).

3284 Controle - oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais; vesícula germinativa -
 3285 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas, seguido de maturação convencional; VGEC -
 3286 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas e expostos a estresse térmico por calor (EC) durante
 3287 a pré-maturação; MIVEC – oócitos submetidos a estresse térmico por calor por 12 horas durante a
 3288 maturação; D7EC - embriões produzidos em condições convencionais e submetidos à altas temperaturas por
 3289 12 horas às 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação.

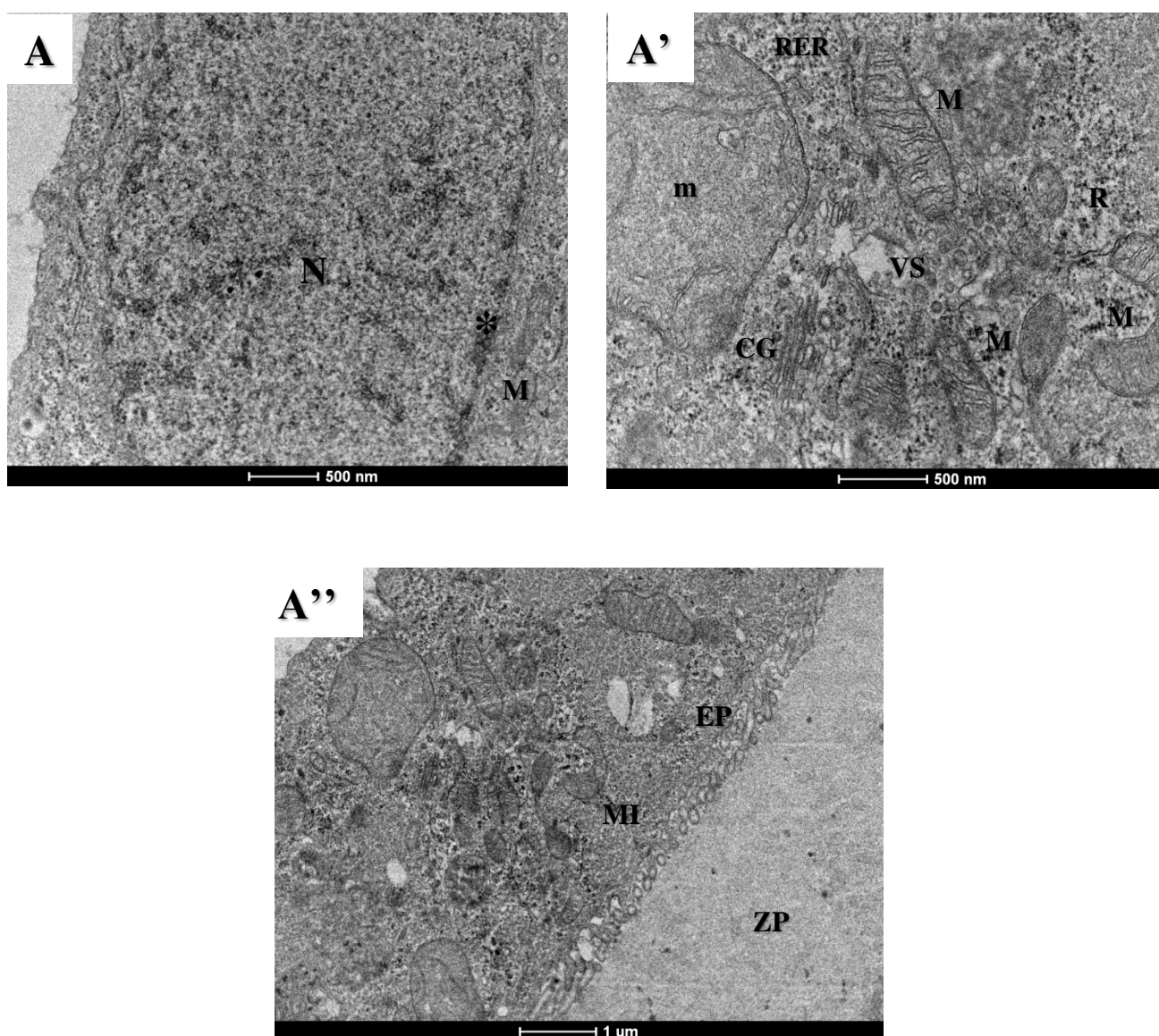
3290 Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre si (P<0,05), de acordo com o teste Newman
 3291 Keuls para número total de células embrionárias, e teste Scott-Knott para número de células do trofoblasto e
 3292 número de células do embrioblasto.

3293

3294 Em relação à fragmentação de DNA, o número de células embrionárias marcadas pelo
 3295 TUNEL foi semelhante nos conceitos pré-expostos ou não ao calor excessivo (P>0,05), conforme
 3296 pode ser observado na tabela 1.

3297 A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para detalhar as alterações das
 3298 estruturas celulares que interferem com o desenvolvimento embrionário. A figura 6 apresenta
 3299 eletromicrografias de embriões bovinos produzidos em condições convencionais de temperatura
 3300 (38,5°), a partir de oócitos submetidos à produção *in vitro* de embriões (PIVE) imediatamente após
 3301 a aspiração dos ovários (Controle), ou a partir de oócitos que foram mantidos imaturos por 12 horas,
 3302 por meio da inibição farmacológica da maturação pela Butirolactona-I (VG) e, em seguida, foram
 3303 submetidos à PIVE. Os blastômeros embrionários, conforme mostra a figura 6A, apresentam
 3304 núcleos com dupla membrana nuclear. Foram encontradas numerosas estruturas mitocondriais

3305 maduras na região perinuclear, além de algumas mitocôndrias imaturas ou em desenvolvimento,
 3306 adotando-se a classificação de maturidade mitocondrial proposta por Crosier *et al.* (2001). Na figura
 3307 6A' observa-se mitocôndrias alongadas, apresentando inúmeras cristas internamente. Observa-se
 3308 também mitocôndria imatura, grande, com formato arredondado e com cristas restritas à região
 3309 periférica. O citoplasma das células embrionárias, produzidas em condições de termoneutralidade, é
 3310 rico em organelas como complexo de Golgi, retículo endoplasmático, ribossomos, mitocôndrias e
 3311 vesículas de secreção, enquanto que nos demais tratamentos, o citoplasma das células embrionárias
 3312 apresentava basicamente núcleo e mitocôndrias (Figuras 4, 5 e 6).



3313 **Figura 3.** Eletromicrografia de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em condições
 3314 convencionais de temperatura (38,5°C) – tratamentos Controle e VG. (N) Núcleo; (*) Membrana
 3315 nuclear; (M) Mitocôndria madura; (m) Mitocôndria imatura; (R) Ribossomos; (CG) Complexo de

3316 Golgi; (RER) Retículo endoplasmático rugoso; (VS) vesícula de secreção; (MI) Microvilosidades;
3317 (EP) Espaço perivitelinico; (ZP) Zona pelúcida. A: mitocôndrias arredondadas perinucleares; A':
3318 citoplasma rico em organelas; A'': microvilosidades e espaço perivitelinico.

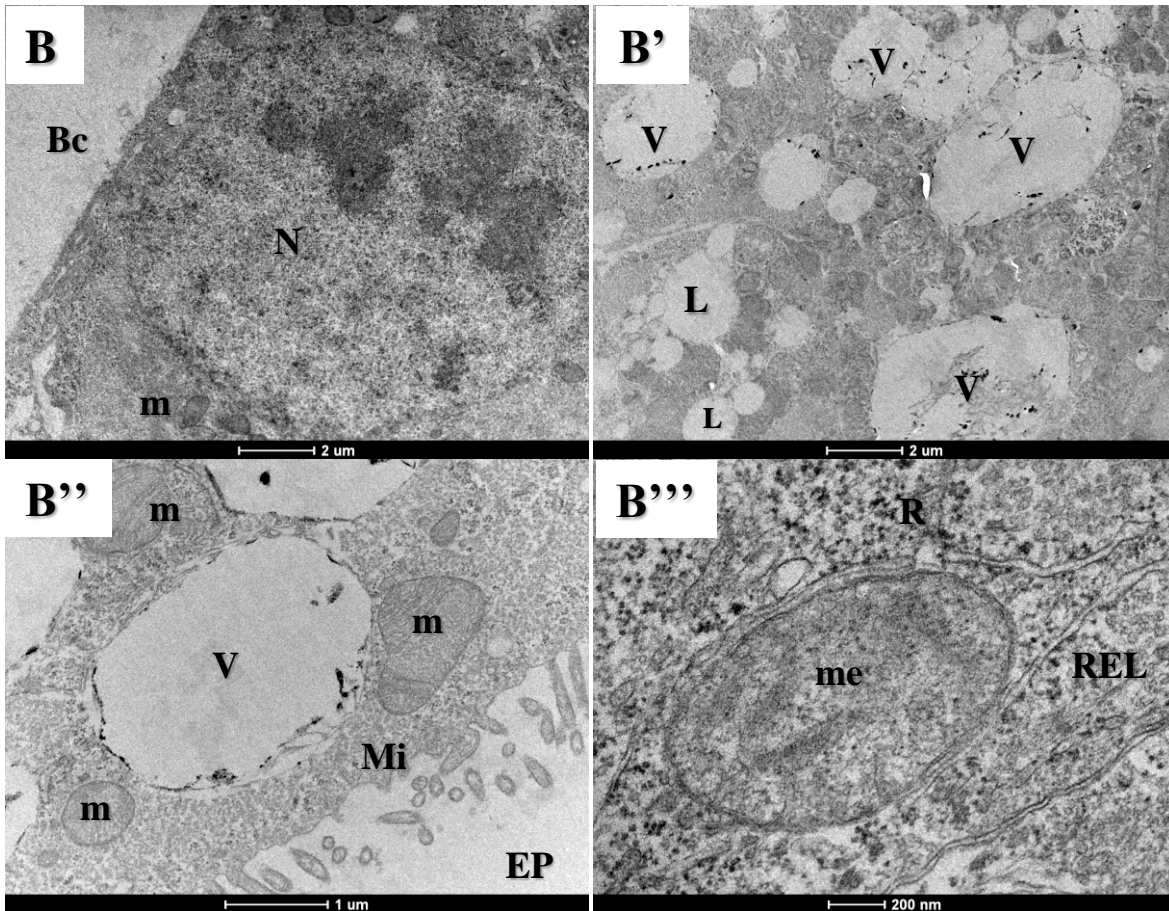
3319

3320 Na região do trofoblasto, as células embrionárias do grupo Controle (Figura 3) apresentavam
3321 alta densidade de microvilosidades que encontravam justapostas com a zona pelúcida,
3322 caracterizando reduzido espaço perivitelinico.

3323 No tratamento VGEC no qual os ovócitos imaturos foram expostos ao calor excessivo, os
3324 embriões produzidos a partir destes ovócitos apresentaram condensação da cromatina na região
3325 central, mitocôndrias perinucleares esparsas, sendo essas predominantemente imaturas, pequenas,
3326 arredondadas e com degeneração das cristas mitocondriais (Figura 4B). O citoplasma dos
3327 blastômeros apresentava grande quantidade de vesículas, grandes e pequenas. Também, foram
3328 encontradas gotículas de lipídeos intracitoplasmáticas. Muitas mitocôndrias apresentavam-se com
3329 degeneração das cristas, edemaciadas e envoltas por grandes vacúolos.

3330 Em relação às microvilosidades, os embriões apresentavam redução da densidade de
3331 microvilosidades e aumento do espaço perivitelinico.

3332 Na Figura 4, além dos achados descritos para a figura 3, observou-se presença de corpos
3333 apoptóticos no citoplasma e internamente às mitocôndrias, na matriz mitocondrial (figura 4C'), além
3334 de células e corpos apoptóticos extrusos no espaço perivitelinico (figura 4C''). No trofoblasto
3335 observou-se intensa redução de microvilos, associado ao aumento do espaço perivitelinico.



3336

3337

3338

3339

3340

3341

3342

3343

3344

3345

3346

3347

3348

3349

3350

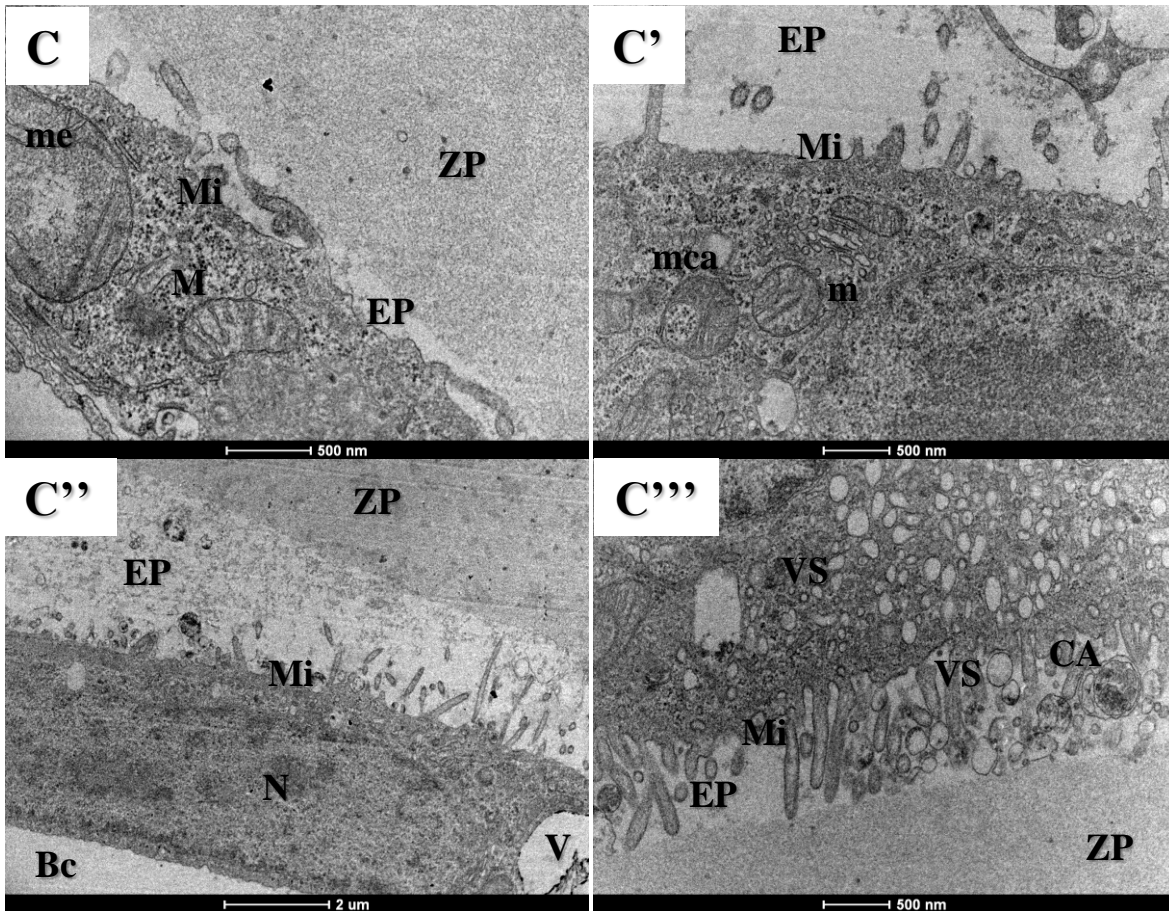
3351

3352

Figura 4. Eletromicrografia de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* após exposição de oócitos imaturos ao calor ambiental excessivo (41°C por 12 horas) – tratamento VGEC. (N) Núcleo; (Bc) Blastocel; (m) Mitocôndria imatura; (me) Mitocôndria edemaciada; (V) Vacúolo; (L) Gotícula lipídica; (R) Ribossomos; (CG) Complexo de Golgi; (RER) Retículo endoplasmático rugoso; (VS) vesícula de secreção; (Mi) Microvilosidades; (EP) Espaço perivitelínico; (REL) Retículo endoplasmático liso.

No tratamento MIVEC (Figura 5), debris celulares apresentados na forma eletron-densa residiam no espaço intercelular. Vesículas pequenas e revestidas para endocitose e exocitose foram observadas próximas à membrana do blastômero. Quando comparadas com o grupo Controle, foram encontradas numerosas mitocôndrias degeneradas apresentando matriz eletron-densa na periferia e, no centro, cristas e matriz degeneradas. A distribuição das microvilosides e de seus microfilamentos na membrana dos blastômeros mostrou-se relativamente diminuída, quando comparada ao grupo Controle.

3353



3354

3355

3356

3357

3358

3359

3360

3361

3362

3363

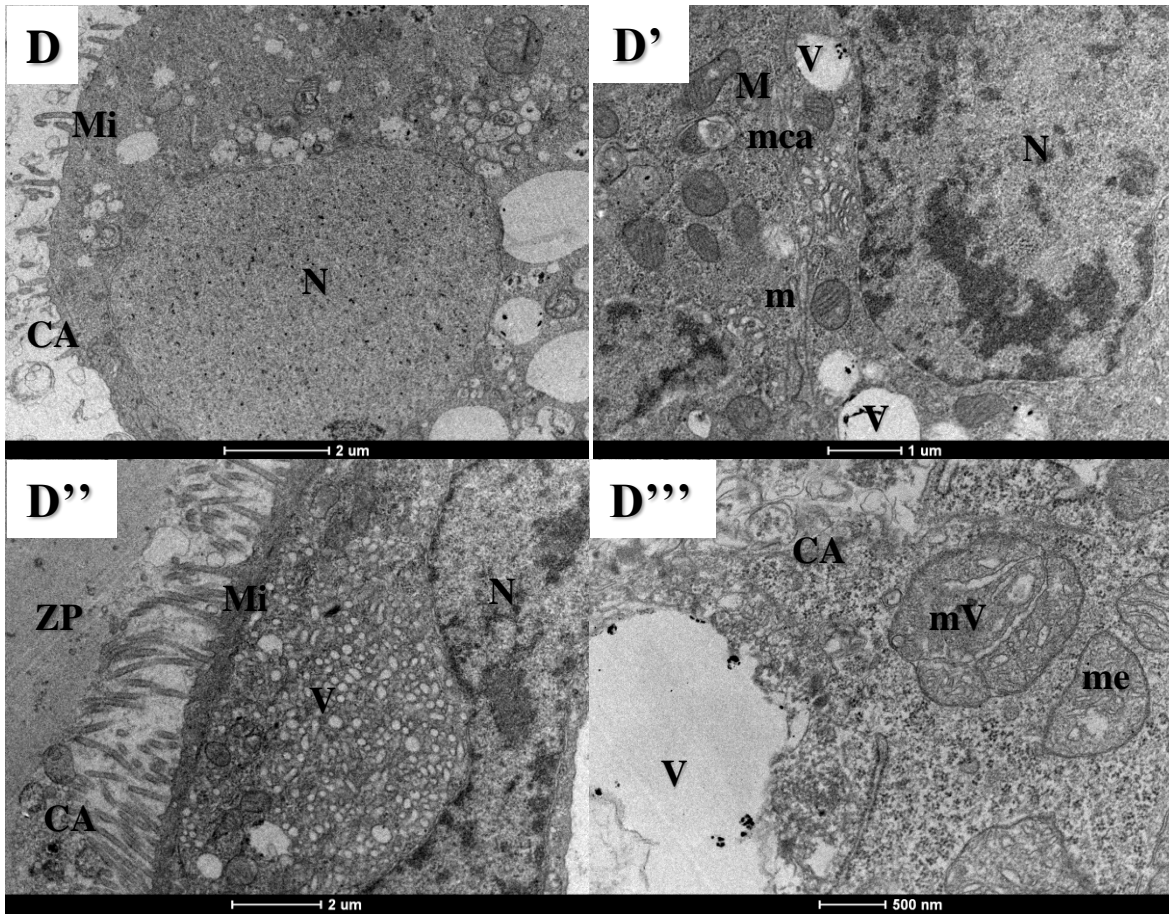
3364

3365

3366

Figura 5. Eletromicrografia de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* após exposição de oócitos ao calor ambiental excessivo (41°C por 12 horas) durante as 12 horas iniciais da maturação – tratamento MIVEC. (N) Núcleo; (Bc) Blastocel; (m) Mitocôndria imatura; (me) Mitocôndria edemaciada; (mca) Mitocôndria com corpo apoptótico; (CA) Corpos apoptóticos; (V) Vacúolo; (L) Gotícula lipídica; (R) Ribossomos; (CG) Complexo de Golgi; (RER) Retículo endoplasmático rugoso; (VS) vesícula de secreção; (Mi) Microvilosidades; (EP) Espaço perivitelínico; (REL) Retículo endoplasmático liso.

Nos embriões estressados no sétimo dia de desenvolvimento também foram encontradas inúmeras vesículas e corpos apoptóticos no citoplasma das células (Figura 6). As vesículas menores concentravam-se na periferia do blastômero, sendo essa evidência mais comum de encontrar nas células do trofoblasto (Figura 6D’’).



3367

3368

3369

3370

3371

3372

3373

3374

3375

3376

3377

3378

3379

3380

3381

3382

3383

3384

3385

Figura 6. Eletromicrografia de blastocistos bovinos expostos ao calor ambiental excessivo (41°C por 12 horas) às 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação – tratamento D7EC. (N) Núcleo; (Bc) Blastocelo; (m) Mitocôndria imatura; (me) Mitocôndria edemaciada; (mca) Mitocôndria com corpo apoptótico; (mV) Mitocôndrias com vacúolos; (CA) Corpora apoptótica; (V) Vacúolo; (L) Gotícula lipídica; (R) Ribossomos; (CG) Complexo de Golgi; (RER) Retículo endoplasmático rugoso; (VS) vesícula de secreção; (Mi) Microvilosidades; (EP) Espaço perivitelínico; (REL) Retículo endoplasmático liso.

Para mensurar o efeito de estresse térmico por calor na produção e sobrevivência embrionária após exposição de oócitos ou embriões ao calor excessivo, avaliou-se a taxa de clivagem, taxa de produção de embrião e taxa de eclosão embrionária (Tabela 2). O grupo VGEC foi o tratamento mais afetado pelo estresse térmico por calor, apresentando redução tanto da produção embrionária quanto da sobrevivência, avaliada por meio da taxa de eclosão ($P < 0,05$), em relação aos demais tratamentos.

3386 **Tabela 2.** Efeito da exposição de gametas e embriões bovinos, em diferentes estádios de desenvolvimento, a
 3387 estresse térmico por calor *in vitro*, sobre os parâmetros relacionados com o desenvolvimento embrionário.

	Total de oócitos (n)	Taxa de clivados (%)	Taxa produção embrião/clivados	Taxa produção embrião/total	Taxa de eclosão (%)
CONTROLE	741	93,9% a	45,3% a	42,5% a	62,4% a
VG	629	88,6% b,c	30,7% b	27,2% c	56,2% a
VGEC	666	84,1% c	19,1% c	16,1% d	44,2% b
MIVEC	697	88,7% b	43,5% a	38,6% a,b	62,2% a
D7EC	621	94,5% a	46,7% a	44,1% a	61,5% a
Total	3354	90,0%	37,6%	40,1%	57,3%

3388 Dados foram expressos em porcentagem (número oócitos ou embriões classificados/total analisados).

3389 Controle - oócitos submetidos à maturação *in vitro* em condições convencionais; vesícula germinativa -
 3390 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas, seguido de maturação convencional; VGEC -
 3391 oócitos mantidos em vesícula germinativa por 12 horas e expostos a estresse térmico por calor (EC) durante
 3392 a pré-maturação; MIVEC – oócitos submetidos a estresse térmico por calor por 12 horas durante a
 3393 maturação; D7EC - embriões produzidos em condições convencionais e submetidos à altas temperaturas por
 3394 12 horas às 144 horas de desenvolvimento pós-inseminação.

3395 Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças entre si (P<0,05), de acordo com o teste
 3396 Qui-Quadrado.

3397

3398 **DISCUSSÃO**

3399 As duas primeiras semanas pós-inseminação representam o período mais crítico para a
 3400 manutenção da gestação em bovinos, pois é o período no qual a porcentagem de perdas
 3401 embrionárias é mais elevada (Diskin *et al.*, 1980; Hansen, 2011; Spencer, 2013). O período pré-
 3402 implantação embrionária particularmente parece ser o mais sensível a danos celulares, pois após a
 3403 fase embrionária ocorre redução significativa das perdas (King, 1991). A hipótese mais aceita e
 3404 testada na literatura é de que o aumento das perdas embrionárias, observada nas épocas mais
 3405 quentes do ano, ocorre em decorrência do aumento de apoptose celular e de falhas no
 3406 reconhecimento materno da gestação e na implantação, causada pela alteração na expressão de
 3407 genes relacionados com a sobrevivência embrionária e placentação.

3408 Conforme proposto no presente estudo, para mensurar o potencial de sobrevivência
 3409 embrionária, é importante contabilizar o número total de blastômeros íntegros e fragmentados.
 3410 Blastocistos com maior número de células são mais propensos à implantação, evoluindo para
 3411 gestação bem-sucedida que culmina no nascimento de maior número de descendentes vivos (Van

3412 Soom *et al.*, 1997). Por outro lado, blastocistos com número reduzido de células têm incidência
3413 variável de fragmentação do DNA que, quando excede determinado limiar, é prejudicial para o
3414 desenvolvimento embrionário (Hardy, 1999), resultando na eliminação do conceito não-viável
3415 (Byrne *et al.*, 1999). A avaliação do número de blastômeros em morte celular programada é um
3416 critério amplamente utilizado para avaliar a qualidade embrionária (Gutiérrez *et al.*, 2012).

3417 Foi relatado que a incidência de morte celular pode ser modulada por fatores ambientais
3418 como o calor excessivo (Betts e King, 2001). O estresse térmico por calor induz a apoptose e
3419 necrose celular mediadas pela via mitocondrial de morte celular, verificando-se diminuição da
3420 proporção Bcl-2/Bax, diminuição do potencial de membrana e edema mitocondrial, aumento
3421 acentuado da atividade de caspase-3 e danos ao DNA (Du *et al.*, 2008). Diferentemente do
3422 esperado, no trabalho não foi encontrada diferença na taxa de fragmentação de DNA nos diferentes
3423 tratamentos analisados ($P > 0,05$).

3424 Iwasaki e colaboradores (1990) propuseram uma forma objetiva de avaliar a qualidade
3425 embrionária a partir da proporção do número de células do embrioblasto, em relação ao total de
3426 células embrionárias. Segundo os autores, embriões de boa qualidade são aqueles que apresentam
3427 essa proporção entre 40 e 60. No presente estudo apenas os tratamentos vesícula germinativa e
3428 D7EC apresentaram a proporção proposta ligeiramente superior a 60.

3429 Alterações morfológicas e cromossômicas que ocasionam anormalidades no
3430 desenvolvimento embrionário ou disfunções placentárias também são causas importantes de perdas
3431 embrionárias (Tveden-Nyborg *et al.*, 2005; Alexopoulos *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). Alguns
3432 autores realizaram avaliações da ultraestrutura de oócitos e embriões bovinos visando explorar,
3433 minuciosamente, a estrutura de algumas organelas celulares, na tentativa de explicar falhas para
3434 atingir o estágio de blastocisto ou completar a fase embrionária (Fair *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*,
3435 2012, 2015; Cavusoglu *et al.*, 2016).

3436 A exposição de embriões a alguma fonte de estresse pode afetar de forma adversa a
3437 qualidade embrionária, interferindo com a viabilidade dos mesmos. Cavusoglu *et al.* (2016)
3438 associaram alguns achados de alterações ultraestruturais com a redução do potencial de
3439 sobrevivência embrionária, após a exposição à fonte de estresse térmico. Nos embriões com menor
3440 capacidade de desenvolvimento foi encontrado aumento de degeneração mitocondrial, diminuição
3441 da integridade das membranas nuclear e citoplasmática, redução da espessura e integridade da zona
3442 pelúcida e danos ao citoesqueleto (Cavusoglu *et al.*, 2016).

3443 O presente trabalho foi o primeiro a apresentar uma avaliação detalhada das alterações da
3444 ultraestrutura embrionária em embriões bovinos pré-implantação (estádio de blastocisto),
3445 produzidos a partir oócitos e embriões submetidos a estresse térmico por calor *in vitro*. Dentre as
3446 alterações ultraestruturais, resultantes da hipertermia, que podem ser encontradas nas células
3447 embrionárias, destaca-se cromatina condensada na periferia da borda nuclear, presença de corpos
3448 apoptóticos, mitocôndrias edemaciadas e com vacúolos, presença de lisossomos próximos às
3449 mitocôndrias, e diminuição de retículo endoplasmático rugoso (Du *et al.*, 2008). Nesse trabalho
3450 foram encontrados achados semelhantes em blastocistos pré-expostos ao calor. Conceptos
3451 submetidos à hipertermia apresentaram acentuadas alterações mitocondriais, dentre elas
3452 mitocôndrias imaturas ou subdesenvolvidas, degeneração de cristas, edema e vacuolização.
3453 Também foram encontrados aumento de vesiculações, aumento do espaço perivitelínico e redução
3454 de microvilosidades.

3455 O mais intrigante desse trabalho foi o achado que o tratamento no qual embriões de sete dias
3456 de desenvolvimento, no estágio de blastocisto, foram submetidos à altas temperaturas *in vitro* foi o
3457 tratamento que apresentou o maior número de alterações ultraestruturais. Esse achado contrapõe
3458 diversos trabalhos que afirmam que, após a transição materno-zigótica, o embrião torna-se
3459 progressivamente mais resistente ao calor (Ealy *et al.*, 1993; Edwards e Hansen, 1997; Stewart *et*
3460 *al.*, 2011).

3461 As alterações de microvilosidades do trofoblasto, semelhante às encontradas nessa pesquisa,
3462 estão diretamente relacionadas à redução da sobrevivência embrionária, visto que são essenciais
3463 para aumentar a área absorptiva das células epiteliais. Quanto maior a densidade de microvilos,
3464 maior é a capacidade de transporte celular (Fair *et al.*, 2001). Portanto, conforme os achados desse
3465 estudo conclui-se que o choque térmico ocasiona redução de densidade de microvilosidades
3466 embrionárias, podendo resultar redução do transporte e absorção de substâncias importantes para o
3467 desenvolvimento embrionário.

3468

3469 CONCLUSÕES

3470 Choque térmico na fase de oócito diminui clivagem, produção de embriões e eclodibilidade de
3471 blastocistos. O calor excessivo também interfere com a integridade de organelas essenciais para o
3472 crescimento e implantação embrionária, como as mitocôndrias e microvilosidades. Embriões
3473 aparentemente resistentes a choque térmico apresentaram alterações ultraestruturais, sem
3474 modificação nos índices apoptóticos.

3475

3476 **AGRADECIMENTOS**

3477 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de
3478 Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento
3479 de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e apoio para o desenvolvimento do
3480 trabalho, e pela bolsa de estudos do CNPq. Ao Laboratório de Microscopia e Fotomicroscopia do
3481 DCCV da Escola de Veterinária da UFMG. Ao Centro de Microscopia da UFMG pelo auxílio na
3482 preparação de amostras e análise de microscopia eletrônica de transmissão.

3483

3484 **CONFLITOS DE INTERESSE**

3485 Nenhum dos autores do manuscrito acima tem declarado qualquer conflito de interesse.

3486

3487 **REFERÊNCIAS**

- 3488 ALEXOPOULUS, N. I., MADOX-HYTTEL, P., TVEDEN-NYBORG, P. *et al.* Developmental
3489 disparity between *in vitro* produced and somatic cell nuclear transfer bovine days 14 and 21
3490 embryos implication for embryonic loss. *Reproduction*, v. 136, p. 433-445, 2008.
- 3491 AL-KATANANI, Y. M., DROST, M., MONSON, R. L. *et al.* Pregnancy rates following timed
3492 embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat
3493 stress conditions. *Theriogenology*, v. 58, p. 171-182, 2002a.
- 3494 AL-KATANANI, Y. M., PAULA-LOPES, F. F., HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to
3495 heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 390-396, 2002b.
- 3496 ALLEN, T. E., PAN, Y. S., HAYMAN, R. The effect of feeding on the evaporative heat loss and
3497 body temperature in Zebu and Jersey heifers. *J. Agric. Res.*, v. 14, p. 580-593, 1963.
- 3498 BAUMGARD, L. H., KEATING, A., ROSS, J. W. *et al.* Effects of heat stress on the immune
3499 system, metabolism and nutrient partitioning: implications on reproductive success. *Rev. Bras.*
3500 *Reprod. Anim.*, v. 39, p.173-183, 2015.
- 3501 BAUMGARD, L. H., RHOADS, R. P. Ruminant production and metabolic responses to heat stress.
3502 *J. Anim. Sci.*, v. 90, p. 1855-1865, 2012.
- 3503 BERMAN, A., FOLMAN, Y., KAIM, M. *et al.* Upper critical temperatures and forced ventilation
3504 effects for high-yielding dairy cows in subtropical climate. *J. Dairy Sci.*, v. 68, n. 1488-1495, 1985.

3505 BETTS, D. H. e KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*,
3506 v. 55, p. 171-191, 2001.

3507 BYRNE, A. T., SOUTHGATE, J., BRISON, D. R. *et al.* Analysis of apoptosis in the
3508 preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J. Reprod. Fertil.*, v. 117, p. 97-105, 1999.

3509 CAVUSOGLU, T., POPKEN, J., GUENGOER, T. *et al.* Ultra-structural alterations in *in vitro*
3510 produced four-cell bovine embryos following controlled slow freezing or vitrification. *Anat. Histol.*
3511 *Embryol.*, v. 45, p. 291-307, 2016. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1111/ah.12197](https://doi.org/10.1111/ah.12197)>.

3512 CROSIER, A. E., FARIN, P. W., DYKSTRA, M. J. *et al.* Ultrastructural morphometry of bovine
3513 blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v. 64, p. 1375-1385, 2001. Disponível em:
3514 <<https://doi.org/10.1095/biolreprod64.5.1375>>.

3515 DISKIN, M. G. e SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after
3516 artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.*, v. 59, p. 463-468, 1980.

3517 DU, J., DI, H., GUO, L. *et al.* Hyperthermia causes bovine mammary epithelial cell death by a
3518 mitochondrial-induced pathway. *J. Therm. Biol.*, v.33, p. 37-47, 2008. Disponível em:
3519 <[10.1016/j.jtherbio.2007.06.002](https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.06.002)>.

3520 EALY, A.D., DROST, M., HANSEN, P.J.J. Developmental changes in embryonic resistance to
3521 adverse effects of maternal stress in cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.2899-2905, 1993.

3522 EDWARDS, J., HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation
3523 embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Devel.*, v. 46, p. 138-145, 1997.

3524 FAIR, T., HYTTEL, P., MOTLIK, J. *et al.* Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes *in vitro*
3525 using Butyrolactone I: Effects on oocyte ultrastructure and nucleolus function. *Mol. Reprod. Dev.*,
3526 v. 62, p. 375-386, 2002. Disponível em: <doi.org/10.1002/mrd.10096>.

3527 FAIR, T., LONERGAN, P., DINNYES, A. *et al.* Ultrastructure of bovine blastocysts following
3528 cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 58, p. 186-195,
3529 2001. Disponível em: <[doi.org/10.1002/1098-2795\(200102\)58:2<186::AID-MRD8>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200102)58:2<186::AID-MRD8>3.0.CO;2-N)>.

3530 GUTIÉRREZ, M. E., GALINA, C. S., MORENO-MENDONZA, N. *et al.* Observation of fresh *Bos*
3531 *indicus* embryos comparing stereoscopic and phase contrast microscopy. *Zygote*, v. 22, p. 187-194,
3532 2012. Disponível em: <[doi.org/ 10.1017/S0967199412000421](https://doi.org/10.1017/S0967199412000421)>.

3533 HANSEN, P. J. Challenges to fertility in dairy cattle: from ovulation to the fetal stage of pregnancy.
3534 *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 35, n. 2, p. 229-238, 2011.

3535 HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. *Rev. Reprod.*, v. 4, p. 125-134, 1999.

3536 IWASAKI, S., YOSHIBA, N., USHIJIMA, H. *et al.* Morphology and proportion of inner cell mass
3537 of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.*, v.90, p.279-284, 1990.

3538 KING, W. A. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. *Can. Vet. J.*, v. 32, p.99-103, 1991.

3539 OLIVEIRA, F. D., SANGALLI, J. R., MEIRELLES, F. V. *et al.* Bovine conceptus *Bos indicus*
3540 produced by somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis present morphological variations
3541 since blastocyst stage. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 67, p. 1483-1491, 2015. Disponível em:
3542 <[dx.doi.org/10.1590/1678-4162-7647](https://doi.org/10.1590/1678-4162-7647)>.

3543 OLIVEIRA, F. D., PERECIN, F., MEIRELLES, F. V. *et al.* Comparative ultrastructure of *in vitro*-
3544 produced bovine blastocysts (*Bos indicus*) derived from *in vitro* fertilization, SNC, and
3545 parthenogenesis. *Reprod. Fertil. Develop.*, v.25, p. 200-201, 2012. Disponível em:
3546 <doi.org/10.1071/RDv25n1Ab105>.

3547 PARRISH, J.J., KROGRNAES, A., SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by
3548 either swim-up and *Percoll* method on success of “*in vitro*” fertilization and early embryonic
3549 development. *Theriogenology*, v.44, p.859-869, 1995.

3550 PEREIRA, J. C. C. Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal. Editora
3551 FEPMVZ, Belo Horizonte, 195 p., 2005.

3552 RHOADS, M. L., R. P. RHOADS, M. J. VANBAALE, R. J. *et al.* Effects of heat stress and plane
3553 of nutrition on lactating Holstein cows: I. production, metabolism and aspects of circulating
3554 somatotropin. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p. 1986–1997, 2009.

3555 SAKATANI, M., ALVAREZ, N. V., TAKAHASHI, M. *et al.* Consequences of physiological heat
3556 shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response
3557 genes in cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 95, p. 3080-3091, 2012. Disponível em: <[doi.org/10.3168/jds.2011-](https://doi.org/10.3168/jds.2011-4986)
3558 4986>.

3559 SARTORI, R., SARTOR-BERGFELT, R. MERTENS, J. N. *et al.* Fertilization and early embryonic
3560 development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy*
3561 *Sci.*, v. 85, p. 2803-2812, 2002.

3562 SPENCER, T. E. Early pregnancy: Concepts, challenges, and potential solutions. *Anim. Front.*, v. 3,
3563 p. 48-55, 2013. Disponível em: <doi.org/10.2527/af.2013-0033>.

3564 STEWART, B. M., BLOCK, J., MORELLI, P. *et al.* Efficacy of embryo transfer in lactating dairy
3565 cows during summer using fresh or vitrified embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. *J.*
3566 *Dairy Sci.*, v. 94, p. 3437-3445, 2011.

3567 TVDEN-NYBORG, P., PEURA, T. T., HARTWICH, K. M. *et al.* Morphological characterization
3568 of pre and peri-implantation *in vitro* cultured, somatic cell nuclear transfer and *in vivo* derived
3569 embryos. *Reproduction*, v. 130, p. 681-694, 2005.

3570 VAN SOOM, V., YSEBAERT, M., DE KRUIF, A. Relationship between timing of development,
3571 morula morphology and cell allocation of the inner cell mass and trophoectoderm in *in vitro*
3572 produced embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 47, p. 47-56, 1997.

3573 VEISSIER, I., VAN IAER, E., PALME, R. *et al.* Heat stress in cows at pasture and benefit of
3574 shade in a temperate climate region. *Int. J. Biometeorol.*, v. 62, p. 585-595, 2018. Disponível em:
3575 <doi.org/10.1007/s00484-017-1468-0>.

3576 WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 86, n. 6, p. 2131-
3577 2144, 2003.

3578 WHEELLOCK, J. B., R. P., RHOADS, M. J., VANBAALE, S. R. *et al.* Effects of heat stress on
3579 energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p. 644–655, 2010.

3580 ZERON, Y., OCHENRETNEY, A., KEDAR, O. *et al.* Seasonal changes in bovine fertility: relation
3581 to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of
3582 follicles. *Reproduction*, v. 121, p. 447-454, 2001.

3583 ZHOU, W., XIANG, T., WALKER, S. *et al.* Global gene expression analysis of bovine blastocysts
3584 produced by multiple methods. *Mol. Rep. Dev.*, v. 75, p. 744-758, 2008.

3585

3586 **9. CAPÍTULO V –**

3587 **ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO**

3588

3589 Artigo publicado no periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia v.69, n.6,
3590 p.1385-1392, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9238>>

3591

3592 *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.69, n.6, p.1385-1392, 2017

3593

3594 **Efeito da adição do ácido linoleico conjugado no cultivo *in vitro* de embriões F1**

3595

Holandês x Zebu na sobrevivência pós-vitrificação

3596 [*Effect of conjugated linoleic acid addition in in vitro culture medium in F1 Holstein X*
3597 *Zebu embryo survival post vitrification*]

3598

A. C. Leite, V. B. Andrade, E. B. M. Silva, A. M. Borges

3599

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte, MG

3600

3601 **RESUMO**

3602 Avaliou-se o efeito da adição do ácido linoleico conjugado (CLA) ao meio de cultivo *in*
3603 *vitro* na viabilidade pós vitrificação de embriões F1 Holandês X Zebu. Foram utilizados três meios
3604 de cultivo: Controle (*n*=340 oócitos): meio SOF e soro fetal bovino (SFB), sem o CLA; SFB+CLA
3605 (*n*=359 oócitos): meio SOF, SFB e CLA; CLA (*n*=339 oócitos): meio SOF e CLA, sem o SFB.
3606 Todos os blastocistos produzidos foram submetidos à vitrificação, pelo método de *Open Pulled*
3607 *Straw*. Quinze blastocistos de cada tratamento foram fixados para quantificação lipídica por
3608 coloração com *Sudan Black B*. Para avaliar a viabilidade embrionária, foi observada a capacidade
3609 de reexpansão e eclosão pós-aquecimento dos embriões (Controle=27; SFB+CLA=30; CLA=17).
3610 Foram realizadas transferências um ou dois embriões por receptora para avaliação da sobrevivência
3611 *in vivo*: T1 [receptoras que receberam um blastocisto (*n*=17 embriões, sendo Controle=5,
3612 SFB+CLA=6 e CLA=6)]; T2 [receptoras que receberam dois blastocistos, (*n*= 54 embriões, sendo
3613 Controle=18, SFB+CLA=14 e CLA=22)]. Não houve diferença nas taxas de clivagem (62,1%;
3614 74,0%; 74,0% para Controle; SFB+CLA; CLA, respectivamente), produção de blastocistos em
3615 relação aos clivados (59,7%; 47,7%; 38,3% para Controle; SFB+CLA; CLA, respectivamente) e
3616 produção de blastocistos em relação ao total de oócitos (37,1%; 35,4%; 28,3% para Controle;

3617 SFB+CLA; CLA, respectivamente) ($P>0,05$). Houve diminuição de gotículas lipídicas nos embriões
3618 cultivados em meio suplementado com CLA em relação aos embriões cultivados na presença do
3619 SFB e na ausência do CLA ($P<0,05$). A taxa de reexpansão foi maior no grupo controle (70,4%) em
3620 relação ao CLA (47,1%) e menor no grupo SFB+CLA (43,3%) ($P<0,05$). O CLA foi eficaz em
3621 reduzir da deposição de lipídeos intracitoplasmáticos nas células embrionárias, porém não houve
3622 diferença de viabilidade após a desvitrificação dos embriões.

3623 **Palavras-chave:** Ácido linoleico conjugado, ácido linoleico conjugado *trans-10*, *cis-12*, CLA,
3624 criopreservação de embriões, vitrificação de embriões.

3625

3626 **ABSTRACT**

3627 The effect of adding conjugated linoleic acid (CLA) to the culture media on the viability
3628 after cryopreservation of F1 Holstein X Zebu embryos was evaluated. Three different culture media
3629 was tested: control (n = 340 oocytes): SOF medium and fetal bovine serum (FBS) without the CLA;
3630 FBS + CLA (n = 359 oocytes): SOF, FBS and CLA; CLA (n = 339 oocytes): SOF and CLA without
3631 the FBS. The produced blastocysts were subjected to vitrification, by the Open Pulled Straw
3632 method. Fifteen blastocysts per treatment were fixed for lipid quantification by staining with Sudan
3633 Black B. Embryo re-expansion and hatching capability were used to assess viability (control = 27;
3634 FBS + CLA = 30; CLA = 17). Transfers of one or two embryos to recipients were performed to
3635 evaluate *in vivo* survival: T1 [recipients that received one blastocyst (n=17 embryos, Control=5,
3636 FBS+CLA=6 and CLA=6)]; T2 [recipients that received two blastocysts (n =54 embryos,
3637 Control=18, FBS+CLA=14 and CLA=22)]. There was no difference in cleavage rate (62.1%; 74%;
3638 74% for Control; FBS + CLA, CLA, respectively), blastocyst production in relation to the cleaved
3639 structures (59.7%; 47.7%; 38.3% for Control; FBS + CLA, CLA, respectively) and blastocyst
3640 production relative to the total oocytes (37.1%, 35.4%, 28.3% for Control; FBS + CLA, CLA,
3641 respectively) between treatments ($P > 0.05$). A reduction of lipid droplets was observed in embryos
3642 cultured in medium supplemented with CLA compared to embryos cultured in the FCS in the
3643 absence and presence of CLA ($P < 0.05$). The reexpansion rate was higher in the Control group
3644 (70.4%) compared to the CLA (47.1%) and lowest for FBS+CLA (43.3%) ($P < 0.05$). The hatching
3645 rates were similar among treatments, observing 42.1%; 23.1%; 25% for control; FBS + CLA; CLA
3646 respectively ($P > 0.05$). Only one pregnancy was observed in early and confirmatory diagnosis,
3647 result of a Control group embryo transfer. Although embryos cultured with CLA have shown
3648 smaller intracytoplasmic lipid content, no difference was observed in viability following
3649 vitrification between treatments.

3650 **Keywords:** Conjugated linoleic acid, conjugated linoleic acid trans-10, cis-12, CLA, embryo
3651 cryopreservation, embryo vitrification.

3652

3653 INTRODUÇÃO

3654 Atualmente, o maior obstáculo para disseminação da produção *in vitro* de embriões bovinos
3655 (PIVE) é a baixa taxa de sobrevivência dos embriões ao descongelamento. O alto teor lipídico
3656 citoplasmático implica em reduções na qualidade embrionária e na resistência ao congelamento dos
3657 mesmos (Mezzalira e Vieira, 2006; Pereira *et al.*, 2007). A criopreservação de embriões e gametas
3658 possibilita a manutenção da viabilidade de embriões excedentes e a utilização do estro natural de
3659 receptoras, que resulta em taxas de gestação mais altas do que os animais sincronizados, além de
3660 diminuir o custo com aplicação de hormônios (Gonçalves *et al.*, 2008). Neste contexto, são
3661 realizados diversos estudos sobre criopreservação para o estabelecimento de protocolos eficientes
3662 em manter a viabilidade celular. Um protocolo de criopreservação ideal visa atingir temperaturas
3663 criogênicas sem danos químicos e sem formação de gelo intracelular (Carvalho *et al.*, 2011).

3664 A vitrificação é a técnica de criopreservação cujos resultados são os mais consistentes em
3665 embriões PIVE, pois as altas velocidades de resfriamento e o tempo reduzido de exposição das
3666 células embrionárias a temperaturas críticas e aos efeitos tóxicos dos crioprotetores minimizam os
3667 danos à membrana das células embrionárias (Dinnyes *et al.*, 2000; Mezzalira e Vieira, 2006;
3668 Gonçalves *et al.*, 2008).

3669 Uma estratégia para se obter embriões bovinos produzidos *in vitro* de melhor qualidade e
3670 aumentar a sobrevivência dos mesmos pós-descongelamento seria a adição do ácido linoleico
3671 conjugado *trans-10, cis-12* (CLA) no meio de cultura. O CLA é um ácido graxo poli-insaturado
3672 natural que apresenta atividade anti-arterosclerótica, anti-obesidade e inibidora da expressão de
3673 genes codificadores da produção de enzimas que estimulam a síntese de lipídeos nos adipócitos
3674 (Mitchell e McLeod, 2008). Acredita-se que a suplementação de meios de cultivo *in vitro* com este
3675 composto promova modificações na membrana do tecido adiposo e altere a expressão de genes
3676 relacionados com a adipogênese, diminuindo a deposição de gordura intracelular nos embriões,
3677 podendo apresentar efeitos positivos na criopreservação de embriões bovinos (Hochi *et al.*, 1999,
3678 Pereira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Rahme, 2012).

3679 Considerando a importância de fêmeas mestiças F1 HZ para a produção leiteira no Brasil e
3680 as inconsistências existentes na técnica de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*,
3681 foi avaliado o efeito da adição do CLA no meio de cultivo *in vitro* como estratégia para diminuir a
3682 quantidade de gotículas intracelulares de gordura depositadas nos embriões, de modo a melhorar
3683 sua congelabilidade pelo processo de vitrificação.

3684

3685 **MATERIAL E MÉTODOS**

3686 O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fecundação *in vitro* de Embriões do EV-
3687 UFMG, durante o período de outubro de 2012 a abril de 2014. Todos os procedimentos adotados
3688 foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo nº 134/2012).
3689 Todos os reagentes utilizados no trabalho foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO,
3690 USA), exceto quando explicitado.

3691 Os embriões foram produzidos a partir de oócitos de ovários de fêmeas Nelore, obtidos em
3692 matadouro, transportados até o laboratório em solução fisiológica (0,9% de NaCl) aquecida à 35°C,
3693 em tempo não superior a quatro horas após o término do abate. Os folículos com diâmetro entre 2 e
3694 8mm foram puncionados com o auxílio de seringa e agulha descartáveis, em seguida os Complexos
3695 *cumulus-oophorus* (CCOs) aspirados foram classificados de acordo com a qualidade do citoplasma
3696 e número de camadas de células do *cumulus* (Constantinescu e Schatten, 2007). Os CCOs de graus I
3697 e II selecionados foram divididos aleatoriamente em três grupos e sequencialmente foram
3698 submetidos à maturação *in vitro* (MIV) por 24 horas em estufa incubadora a 38,5°C, com 5% de
3699 CO₂ em ar atmosférico, 95% de umidade em meio base de TCM-199 bicarbonato (Gibco Life
3700 Technologies, Grand Island, USA) acrescido de 10% de SFB, 0,5µg/mL de FSH (Folltropin-V®,
3701 Bioniche Inc, Canadá), 5g/mL de LH (Lutropin-V®, Bioniche Inc., Canadá), 10µg/ml de estradiol,
3702 22µg/mL de piruvato e 83,4µg/mL de amicacina. Para a fecundação *in vitro* (FIV) utilizou-se
3703 sêmen de touro da raça Holandesa sexado para fêmea, previamente avaliado quanto à fertilidade em
3704 sistemas de produção *in vitro*. Foi utilizado apenas um touro e uma partida de sêmen durante todo o
3705 experimento. A seleção de espermatozoides viáveis para a FIV foi realizada utilizando-se o método
3706 do gradiente descontínuo de *Percoll* e o *pellet* resultante da centrifugação foi lavado em meio de
3707 capacitação espermática (TALP-SÊMEN), e a concentração foi ajustada para $0,3 \times 10^6$
3708 espermatozoides/mL (Xu *et al.*, 2006). O meio de FIV utilizado foi constituído por FERT-TALP
3709 (Parrish *et al.*, 1995) suplementado com amicacina (83,4µg/mL), penicilamina (27µg/mL),
3710 hipotaurina (1µg/mL), epinefrina (0,3µg/mL), albumina sérica bovina (5µg/mL), piruvato
3711 (22µg/mL) e heparina (10µg/mL). Os CCOs foram fecundados e incubados nas mesmas condições
3712 da MIV, por um período de 18 a 22 horas, sendo o dia da fecundação considerado o D0. Os meios
3713 de maturação e fecundação não diferiam entre os grupos experimentais, somente os meios de
3714 cultivo apresentavam diferença de composição entre os tratamentos.

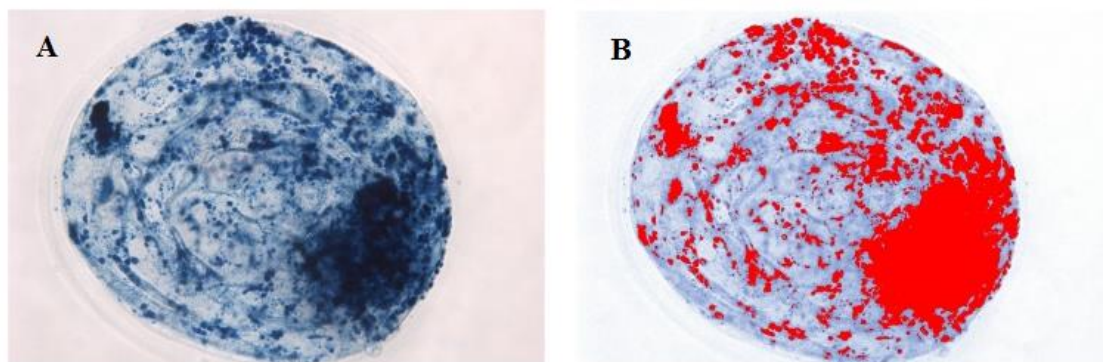
3715 Após a FIV, os zigotos foram debridados das células do CCOs, utilizando-se micropipeta
3716 automática e, posteriormente, estes foram submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV), em três tratamentos:
3717 meio *Synthetic Oviduct Fluid Medium* (SOF) suplementado com 0,5% de albumina sérica bovina

3718 (BSA) e 2,5% de Soro Fetal Bovino (SFB; grupo controle) ($n = 340$); meio SOF suplementado com
3719 0,5% de BSA, 2,5% de SFB e 100 μ M de ácido linoleico conjugado (CLA; grupo SFB+CLA) ($n =$
3720 359); meio SOF contendo 0,5% de BSA, 100 μ M de CLA e sem SFB (grupo CLA) ($n = 339$). No
3721 D2 foi avaliada a taxa de clivagem. No D7 foi avaliada a produção de blastocistos de cada
3722 tratamento e, todos os embriões produzidos foram vitrificados, pelo método de *Open Pulled Straw*
3723 (OPS), e armazenados em nitrogênio líquido à -196°C, por no mínimo duas semanas, de acordo com
3724 cada tratamento.

3725 Os embriões selecionados para vitrificação foram lavados em solução DPBS acrescida de
3726 5% de SFB (*Holding Medium - HM*) e, então, desidratados por um minuto em solução de 10% de
3727 etilenoglicol e 10% de DMSO em HM. Posteriormente, os embriões foram desidratados novamente
3728 em uma segunda solução contendo 20% de etilenoglicol e 20% de DMSO por 20 segundos e
3729 envasados em OPS (Vajta *et al.*, 1996).

3730 Após a vitrificação, quarenta e cinco blastocistos (quinze blastocistos de cada grupo
3731 experimental) foram fixados para posterior quantificação do conteúdo lipídico por coloração com
3732 *Sudan Black B* (Merck Ag Darmstadt, Germany) conforme descrito por Sudano (2012) que está
3733 demonstrado na Fig. 1.

3734



3735

3736 **Figura 1:** Quantificação lipídica de embriões bovinos por coloração com *Sudan Black B*. Imagem obtida por
3737 microscópio óptico com objetiva de 40X. (A) Embrião corado por *Sudan Black B*. (B) Conversão *color-*
3738 *threshold* para quantificação da área ocupada pelas gotículas lipídicas através do software *Image J* (Wayne
3739 Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3740

3741 Setenta e quatro blastocistos (sendo, Controle = 28, SFB+CLA = 29 e CLA = 17) foram
3742 desvitrificados e cultivados em estufa incubadora à 38,5°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade,
3743 para avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro* observando-se a reexpansão e eclosão dos

3744 embriões 24, 48 e 72 horas após o início do cultivo. Setenta e um blastocistos (sendo, controle = 23,
3745 SFB+CLA = 20 e CLA = 28) foram transferidos para fêmeas receptoras de embrião para avaliação
3746 do desenvolvimento embrionário *in vitro* por meio da taxa de gestação. Foram realizadas
3747 transferências um ou dois embriões por receptora para avaliação da sobrevivência *in vivo*: T1
3748 [receptoras que receberam um blastocisto ($n = 17$ embriões, sendo Controle = 5, SFB+CLA = 6 e
3749 CLA = 6)]; T2 [receptoras que receberam dois blastocistos, ($n = 54$ embriões, sendo Controle = 18,
3750 SFB+CLA = 14 e CLA = 22)].

3751 O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado. Os grupos de oócitos
3752 foram considerados as unidades experimentais. Os resultados de taxas de clivagem e blastocisto,
3753 segundo rotina laboratorial, foram considerados como réplicas, enquanto que o teor de lipídeos foi
3754 analisado para cada embrião separadamente. Os dados foram submetidos aos testes de *Kolmogorov-*
3755 *Smirnov* e *Cochran* e *Bartlett* para verificação de normalidade e homocedasticidade
3756 respectivamente, antes de serem submetidos à análise de variância, utilizando-se o nível de
3757 significância de 5%. O programa de estatística utilizado para comparação dos resultados obtidos no
3758 presente trabalho foi o *GraphPad InStat*. Para os resultados de embriões clivados, produção de
3759 embriões em relação ao total de clivados e produção de embriões em relação ao total de oócitos
3760 inseminados foi utilizado o teste de *Tukey*. Para avaliação da viabilidade embrionária *in vitro*, a
3761 reexpansão e eclosão, foi realizada análise de contingência pelos testes Exato de *Fisher* ou *Qui-*
3762 *quadrado*, de acordo com o tamanho dos grupos amostrais (T1 vs T2/ T1 vs T3/ T2 vs T3). Os
3763 resultados da análise lipídica foram analisados pelo teste de *Student-Newman-Keuls* (SNK) para
3764 verificar se houve diferença entre a área ocupada pelas gotículas lipídicas coradas pelo *Sudan Black*
3765 *B* entre os grupos experimentais.

3766

3767 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

3768 A presença ou ausência do soro fetal bovino e/ou do ácido linoleico conjugado *trans-10, cis-*
3769 *12* (CLA) no meio de cultivo de embriões não interferiu na clivagem embrionária (Tab. 1). O
3770 mesmo ocorreu com a taxa de produção de blastocistos avaliada no sétimo dia de cultivo
3771 embrionário (D7) que não diferiu entre os grupos experimentais (Tab. 1).

3772

3773

3774

3775 **Tabela 1.** Taxa de clivagem embrionária, taxa de produção de blastocistos em relação ao número de
 3776 embriões clivados e taxa de produção de blastocistos em relação ao total de oócitos inseminados, de acordo
 3777 com cada grupo experimental.

Tratamento	Número de oócitos inseminados	Taxa de clivagem n (%)	Taxa produção embrião/clivados n (%)	Taxa produção embrião/total n (%)
Controle	340	211 (62,1%)	126 (59,7%)	126 (37,1%)
SFB + CLA	359	266 (74,0%)	127 (47,7%)	127 (35,4%)
CLA	339	251 (74,0%)	96 (38,3%)	96 (28,3%)

3778 Percentual médio de clivagem, produção de embriões/clivados e produção de embrião/total (P>0,05).
 3779

3780 Pereira (2008) e Marinho (2010) demonstraram que a adição do CLA *trans-10, cis-12* ao
 3781 meio de cultura não afetou a taxa de clivagem e a qualidade ou desenvolvimento para o estágio de
 3782 blastocisto, assim como foi encontrado no presente estudo. A partir desses resultados pode-se
 3783 confirmar que é possível alcançar boas taxas de produção *in vitro* de embriões utilizando-se meios
 3784 de cultivo que não contenham soro fetal bovino, sem prejuízo à taxa de produção de blastocistos.

3785 Em relação à taxa de clivagem na presença ou ausência de SFB e em meios contendo ou não
 3786 100µM de CLA *trans-10, cis-12*, Pereira (2008) e Marinho (2010) também encontraram taxas de
 3787 clivagem média próxima a 70%, já Rahme (2012) encontrou taxas de clivagem ligeiramente
 3788 inferiores, de 46% e 51,9%, sendo que nestes trabalhos foi utilizado sêmen convencional. Marinho
 3789 (2010) encontrou taxa de clivagem de 74% para embriões cultivados em meio contendo 100 µM de
 3790 CLA e clivagem superior (79%) para embriões cultivados em 50µM de CLA. Porém em relação à
 3791 taxa de produção de blastocistos a concentração de 100µM de CLA foi superior. Esse atraso na
 3792 clivagem de embriões cultivados na ausência de SFB ocorre porque o SFB acelera o
 3793 desenvolvimento embrionário (Abe e Hoshi, 2003).

3794 Rahme (2012) encontrou 24,2% de taxa de produção de blastocisto em relação aos clivados
 3795 para o grupo com SFB e grupo com SFB acrescido de CLA. Já para o grupo sem SFB acrescido de
 3796 CLA verificou taxa de 15%, indicando sua menor eficiência na produção *in vitro* de embriões
 3797 (P<0,05). Pereira (2008) não observou prejuízos à produção de embriões em meio de cultivo
 3798 suplementado com CLA e sem SFB (23,2% ± 1,3) em relação à produção de embriões convencional
 3799 com SFB (22,9% ± 1,5), porém comparando-se as taxas encontradas com as de Pereira (2008), entre
 3800 grupos experimentais semelhantes, as taxas de produção de blastocistos deste estudo, para todos os
 3801 grupos experimentais, foram superiores, pois, no trabalho comparativo, os embriões foram
 3802 criopreservados e biopsados.

3803 O conteúdo lipídico intracitoplasmático nos blastômeros embrionários, para os diferentes
3804 grupos experimentais, foi avaliado a partir da área ocupada por gotas lipídicas marcadas pelo
3805 corante *Sudan Black B* dos blastocistos submetidos à coloração. Houve diminuição de gotículas
3806 lipídicas nos embriões cultivados em meio suplementado com CLA em relação aos embriões
3807 cultivados na presença do SFB e na ausência do CLA ($P<0,05$). O grupo CLA, apresentou menor
3808 área corada, representada por 272.554,5 pixels, referente a 22% da área dos embriões submetidos à
3809 coloração. O grupo SFB+CLA apresentou área média ocupada pelos lipídeos corados de 301.960,7
3810 pixels, referente a 26,7% da área total dos blastocistos deste grupo. Finalmente, o teor lipídico foi
3811 superior no grupo com SFB e sem CLA comparado aos demais grupos experimentais ($P<0,05$),
3812 apresentando área média de lipídeos de 413.124,9 pixels, correspondente à ocupação de 29,6% da
3813 área média dos blastocistos deste grupo.

3814 Resultados semelhantes foram encontrados por Batista (2009) e Rahme (2012), que
3815 reportaram redução significativa na quantidade de lipídeos em embriões cultivados em meio
3816 acrescido de SFB e CLA. Segundo Pereira *et al.* (2007), a presença de CLA no meio de cultivo
3817 embrionário leva à redução na expressão de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos,
3818 como o acilglicerol 3-fosfato aciltransferase responsável por catalisar a síntese de triglicérides,
3819 resultando, conseqüentemente, em redução da deposição lipídica nas células embrionárias.

3820 As taxas de reexpansão e de eclosão foram inferiores nos grupos contendo CLA e
3821 CLA+SFB comparadas as do grupo controle (Tab. 2). Também trabalhando com o CLA, Pereira *et al.*
3822 *al.* (2008) obteve taxa de reexpansão de 77,5% e Rahme (2012) encontrou taxa de 64,6% para
3823 embriões cultivados com SFB + CLA. Rahme (2012) obteve taxa de reexpansão de 71,8% em meio
3824 contendo somente o CLA. Em relação à taxa de eclosão em meio de cultivo com SFB + CLA,
3825 Pereira *et al.* (2008) e Rahme (2012) obtiveram, respectivamente 60% e 86%. Rahme (2012) obteve
3826 taxa de eclosão de 56,2% em meio contendo somente o CLA.

3827 De maneira semelhante ao encontrado no presente estudo, Batista *et al.* (2014) encontraram
3828 taxas de eclosão inferiores aos de Pereira *et al.* (2008) e Rahme (2012), no presente trabalho foi
3829 observado 14% de eclosão para o grupo controle e 16,5% para o grupo de embriões cultivados com
3830 SFB e CLA. Diante deste resultado foi hipotetizado que a suplementação do meio de cultivo com o
3831 CLA pode ter afetado os mecanismos associados com a digestão enzimática da zona pelúcida pelo
3832 trofoblasto, prejudicando a capacidade de eclosão do embrião.

3833
3834
3835
3836

3837 **Tabela 2.** Taxas de reexpansão e eclosão dos embriões bovinos produzidos *in vitro* e submetidos à
 3838 vitrificação no sétimo dia de cultivo, de acordo com o grupo experimental.

Tratamento	Nº de embriões	Taxas de	
	reaquecidos	reexpansão	Taxas de eclosão
	<i>n</i>	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Controle	27	19 (70,4%) ^a	8 (42,1%)
SFB + CLA	30	13 (43,3%) ^c	3 (23,1%)
CLA	17	8 (47,1%) ^b	2 (25,0%)

3839 Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si pelo Teste Qui-Quadrado ou pelo
 3840 Teste Exato de Fisher (P<0,05).

3841

3842 Vajta *et al.* (1996), utilizando o método de *Open Pulled Straw* (OPS) para vitrificação de
 3843 embriões, obtiveram taxas de reexpansão variando entre 81 e 92% e taxa de eclosão entre 50 e 75%,
 3844 demonstrando que o método é eficiente para vitrificar embriões produzidos em condições
 3845 convencionais e, portanto, os resultados encontrados para sobrevivência embrionária pós
 3846 desvitrificação não estão ligados à técnica de criopreservação utilizada no trabalho.

3847 Uma possível explicação para que a diminuição da deposição lipídica nos blastômeros não
 3848 tenha sido referendada pelas taxas de reexpansão e eclosão embrionárias é que o cultivo *in vitro*
 3849 com altas concentrações de CLA, durante longos períodos, pode ser prejudicial ao desenvolvimento
 3850 embrionário (Absalón-Medina *et al.*, 2014). Possivelmente, a concentração de 15µM do CLA *trans-*
 3851 *10, cis-12* ou a suplementação do meio de cultivo com isômeros do ácido linoleico conjugado 36
 3852 horas antes da vitrificação tenha resultados mais promissores (Absalón-Medina *et al.*, 2014).

3853 Pereira *et al.* (2007) encontraram taxas satisfatórias de reexpansão (84,7% ± 4,1) e eclosão
 3854 (63,7% ± 4,1) pós descongelamento de embriões cultivados com CLA. Estes resultados foram
 3855 decorrentes da renovação diária do meio de cultivo e da adição do antioxidante glutatona para de
 3856 mitigar os danos causados pelo estresse oxidativo resultante da peroxidação de lipídios
 3857 intracitoplasmáticos.

3858 Diferentemente do esperado, os embriões do grupo controle evoluíram mais lentamente do
 3859 que os embriões dos demais tratamentos. Segundo Abe e Hoshi (2003), a presença do SFB nos
 3860 meios de cultivo *in vitro* acelera o desenvolvimento embrionário. Reiterando os resultados
 3861 anteriores, Marinho (2010) encontrou que a ausência do SFB nos meios de cultivo *in vitro* atrasa a
 3862 clivagem embrionária, haja vista que fornece fatores de crescimento, hormônios, nutrientes e

3863 componentes antioxidantes, aumentando a produção de embriões e acelerando a desenvolvimento
3864 embrionário (Abe e Hoshi, 2003).

3865

3866 **Tabela 3.** Taxa de reexpansão e eclosão de embriões bovinos em 24, 48 e 72 horas de cultivo pós
3867 desvitrificação, de acordo com o grupo experimental.

Tratamento	24 horas		48 horas		72 horas	
	Reexpansão (n/total)	Eclosão (n/total)	Reexpansão (n/total)	Eclosão (n/total)	Reexpansão (n/total)	Eclosão (n/total)
Controle	73,7% (14/19) ^b	37,5% (3/8) ^b	26,3% (5/19) ^b	62,5% (5/8) ^b	0,0% (0/19)	0,0% (0/8)
SFB + CLA	100,0% (13/13) ^a	100,0% (3/3) ^a	0,0% (0/13) ^a	0,0% (0/3) ^a	0,0% (0/13)	0,0% (0/3)
CLA	100,0% (8/8) ^a	100,0% (2/2) ^a	0,0% (0/8) ^a	0,0% (0/2) ^a	0,0% (0/8)	0,0% (0/2)

3868 Cultivo pós desvitrificação de embriões bovinos produzidos em meio suplementado ou não com soro fetal
3869 bovino (SFB) e ácido linoleico conjugado (CLA). Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna,
3870 diferem entre si pelo Teste Exato de Fisher (P<0,05).

3871

3872 Na avaliação da sobrevivência embrionária após a transferência para receptoras de embrião,
3873 apenas uma gestação foi verificada nos diagnósticos precoce e confirmatório, resultado da
3874 transferência de um embrião do grupo Controle. As taxas de gestação para os grupos Controle,
3875 SFB+CLA e CLA foram, respectivamente, de 4,35% (1/23), 0% (0/20) e 0% (0/28). Novas
3876 transferências embrionárias deverão ser realizadas para se avaliar o efeito do CLA na sobrevivência
3877 embrionária *in vivo*, referendando a taxa de reexpansão e de eclosão *in vitro*.

3878

3879 CONCLUSÕES

3880 A adição do ácido linoleico conjugado em meios de cultivo *in vitro*, na presença ou não do
3881 soro fetal bovino, não reduziu a produção de blastocistos, sendo possível conseguir taxas de
3882 clivagem e produção de embrionárias semelhante a meios que não contém esse composto. O
3883 isômero do ácido linoleico conjugado *trans-10, cis-12* foi eficaz em reduzir da deposição de
3884 lipídeos intracitoplasmáticos nas células embrionárias, porém não houve diferença de viabilidade
3885 após a desvitrificação dos embriões. Possivelmente, modificações na dose e momento de
3886 administração do CLA ou a associação do CLA com substâncias que aumentam a produção de
3887 antioxidantes poderão incrementar os resultados de sobrevivência embrionária obtidos neste
3888 trabalho.

3889

3890 **AGRADECIMENTOS**

3891 À FAPEMIG (Projeto CVZ APQ 0912-12), ao CNPq (Projeto 484602/2012-8) e à CAPES
3892 pelo apoio financeiro. Ao Cenatte Embriões, pelo fornecimento dos meios e pelo o suporte técnico.
3893 À EPAMIG pela parceria.

3894

3895 **REFERÊNCIAS**

3896 ABE, H., HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free
3897 media. *J. Reprod. Dev.*, v. 49, p. 193-202, 2003.

3898 ABE, H., YAMASHITA, S., SATOH, T. *et al.* Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in
3899 bovine embryos and criotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-
3900 free or serum containing media. *Mol. Reprod.Dev.*, v. 61, p. 57-66, 2002.

3901 ABSALÓN-MEDINA, V. A., BEDFORD-GAUS, S. J., GILBERT, R. O. *et al.* The effects of
3902 conjugated linoleic acid isomers *cis-9*, *trans-11* and *trans-10*, *cis-12* on *in vitro* bovine embryo
3903 production and cryopreservation. *J. Dairy Sci.*, v. 97, p. 6164-6176, 2014.

3904 BATISTA, R. I. T. P. Efeito do ácido linoleico conjugado *trans-10*, *cis-12* na regulação do acúmulo
3905 de lipídeos e expressão gênica de embriões produzidos *in vitro*. Dissertação (Mestrado). Escola de
3906 Ciências Biológicas da UFJF, Juiz de Fora/MG, 2009.

3907 BATISTA, R. I. T. P., RAPOSO, N. R. B., CAMPOS-JÚNIOR, P. H. A. *et al.* *Trans-10*, *cis-12*
3908 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of *in vitro*-
3909 produced crossbred bovine embryos. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, v. 5, n. 33, p. 1-8, 2014.

3910 CARVALHO, A. A., FAUSTINO, L. R., FIGUEIREDO, J. R. *et al.* Vitrificação: uma alternativa
3911 para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Vet.*
3912 *Bras.*, v. 5, n. 3, p. 236-248, 2011.

3913 CONSTANTINESCU, G. M., SCHATTEN, H. *Comparative Reproductive Biology*. Editora
3914 Blackwell Publishing Asia, Carlton, Australia. 402 p., 2007.

3915 DINNYES, A., DAI, Y., JIANG, S. *et al.* High developmental rates of vitrified bovine oocytes
3916 following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol.*
3917 *Reprod.*, v. 63, p. 513-518, 2000.

3918 GONÇALVES, P. B. D., VISITIN, J. A., OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* Produção *in vitro* de
3919 embriões. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. Editora Rocca. São Paulo, p.261-301, 2008.

3920 HOCHI, S., KIMURA, K., HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on
3921 freezing sensitivity of *in vitro*-produced bovine morulae. *Theriogenology*, v.52, p.497-504, 1999.

3922 MARINHO, L. S. R. Ácido linoleico conjugado na criotolerância de embriões bovinos produzidos
3923 *in vitro*. Dissertação (mestrado). Universidade do Estado de Santa Catarina, 76p., 2010.

3924 MEZZALIRA, A., VIEIRA, A. D. Cryopreservation of cows oocytes and embryos. *Acta Scient.*
3925 *Vet.*, v.34, n. 1, p.191-196, 2006.

3926 MITCHELL, P. L., McLEOD, R. S. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal
3927 models. *Biochem. Cell Biol.*, v. 86, p. 293–301, 2008.

3928 PARRISH, J.J., KROGRNAES, A., SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by
3929 either swim-up and *Percoll* method on success of “*in vitro*” fertilization and early embryonic
3930 development. *Theriogenology*. v.44, p.859-869, 1995.

3931 PEREIRA, R. M., CARVALHAIS, I., PIMENTA, J. *et al.* Biopsed and vitrified bovine embryos
3932 viability is improved by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid supplementations during *in vitro*
3933 embryo culture. *Anim. Reprod. Sci.*, v.106, p.322-332, 2008.

3934 PEREIRA, R. M., BAPTISTA, M. C., VASQUES, M. I. *et al.* Cryosurvival of bovine blastocysts is
3935 enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). *Anim.*
3936 *Reprod.Sci.*, v.98, p.293-301, 2007.

3937 PETERSON, D. G., MATITASHVILI, E. A., BAUMAN, D. E. Diet-induced milk fat depression in
3938 dairy cows results in increase trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of
3939 RNAm abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J. Nut.*, v. 133, p.3098-
3940 3102, 2003.

3941 RAHME, L.S.T.R. Efeito do ácido linoleico conjugado na sobrevivência pós criopreservação de
3942 embriões bovinos produzidos *in vitro*. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas
3943 Gerais, 42p., 2012.

3944 SUDANO, M. J., SANTOS, V. G., TATA, A. *et al.* Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles
3945 vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. *Biol.*
3946 *Reprod.*, v. 87, p. 1-11, 2012.

3947 SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., RASCADO, T. S. *et al.* Lipid content and apoptosis of *in*
3948 *vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*,
3949 v.75, p.1211-1220, 2011.

3950 VAJTA, G., HOLM, P., GREVE, T. *et al.* Overall efficiency of *in vitro* embryo production and
3951 vitrification in cattle. *Theriogenology*, v.45, p.683-689, 1996.

3952 XU, J., GUO, Z., SU, L. *et al.* Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized
3953 *in vitro* with sex-sorted sperm. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 2510-2518, 2006.

3954

3955

10. ANEXO I:

3956

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO CEUA/UFMG – EXPERIMENTOS 1, 2 E 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito do choque térmico no desenvolvimento in vitro de oócitos e embriões bovinos e estratégias para sua mitigação", protocolo do CEUA: 129/2017 sob a responsabilidade de Alan Maia Borges que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 29/05/2017.

Vigência do Projeto (requerida pelo pesquisador)	24/05/2017 a 24/02/2019
Finalidade	Pesquisa

Considerações posteriores:

29/05/2017	Aprovado na reunião do dia 29/05/2017. Validade: 29/05/2017 à 28/05/2022
------------	--

Belo Horizonte, 04/01/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

3957

3958

11. ANEXO II:

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO CEUA/UFMG – EXPERIMENTO 4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 134/2012**, relativo ao projeto intitulado "**Viabilidade de embriões F1 Holandês x Zebu produzidos in vitro usando sêmen sexado para fêmea e vitrificados**", que tem como responsável(is) **Álan Maia Borges**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **23/ 05/2012**.

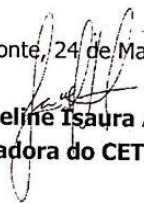
Este certificado expira-se em **23/ 05/ 2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 134/2012**, related to the project entitled "**Viability of F1 Holstein x Zebu in vitro produced embryos using sexed semen and vitrification**", under the supervisors of **Álan Maia Borges**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 23, 2012**.

This certificate expires in **May 23, 2017**.

Belo Horizonte, 24 de Maio de 2012.


Prof.ª Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpg.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)