

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

USO DE MICROARRAY PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA  
DIFERENCIAL EM OÓCITOS *BOS TAURUS INDICUS* E *BOS TAURUS TAURUS*  
SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO

JANAHI SOUSA TICIANELLI

Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

USO DE MICROARRAY PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO  
GÊNICA DIFERENCIAL EM OÓCITOS *BOS TAURUS INDICUS* E *BOS  
TAURUS TAURUS* SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO

JANAHI SOUSA TICIANELLI

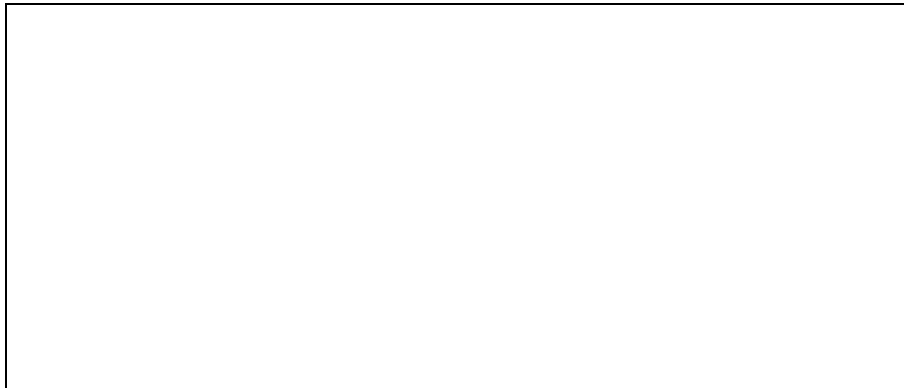
Tese apresentada ao Programa de Pós-  
graduação do Instituto de Biociências de  
Botucatu, Universidade Estadual Paulista -  
UNESP, para a obtenção do título de Doutor(a)  
em Ciências Biológicas, Área Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabíola Freitas de Paula Lopes

Botucatu – SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*



Nome da Autora: Janahi Sousa Ticianelli

Título: Uso de microarray para determinação da expressão gênica diferencial em oócitos *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico.

### **Banca Examinadora**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Freitas de Paula Lopes

Presidente e orientadora

Departamento de Ciências Biológicas

Inst. de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas - UNIFESP – Diadema – SP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisele Zoccal Mingoti

Membro Titular

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP – Araçatuba – SP

Prof. Dr. José Antônio Visintin

Membro Titular

Departamento de Reprodução Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP – São Paulo - SP

Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Membro Titular

Departamento de Ciências Biológicas

Faculdade de Ciências e Letras - UNESP – Assis- SP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda da Cruz Landim

Membro Titular

Departamento de Reprodução Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu - SP

Data da Defesa: 27 de março de 2014

Dedicatória

**Aos meus pais, Maria Angélica e Jeremias,  
os responsáveis pela pessoa e profissional  
que sou hoje ...**

**aos meus irmãos, Iana e Ata, que me  
me mostram todo dia que  
nunca estarei sozinha nesse mundo...**

**e ao meu noivo Bruno que, pacientemente,  
esteve ao meu lado todo o tempo.**

**Todo esse trabalho não teria sentido sem minha família! Amo vocês!**

*Agradecimentos*

À **Deus** pela oportunidade de crescimento a cada fase concluída. A toda **espiritualidade** que me cerca me intuindo e me guiando pelos melhores caminhos.

Ao meu pai **Jeremias**, que sempre estimulou o crescimento profissional dos 3 filhos e nunca mediu esforços para isso. Seu exemplo de determinação e coragem me ajudaram a chegar até aqui!!!

À minha mãe **Maria Angélica**, um anjo disfarçado de gente (!), que sempre me cercou de carinho, energia e estímulo tornando mais fácil a caminhada. A pessoa que mais me ensinou sobre o poder do coração e da humildade nas tarefas do dia a dia e que me mostrou que o crescimento deve andar ao lado do amor e do respeito ao próximo.

Aos meus irmãos **Ianahi** e **Atanaí** por toda a alegria, brincadeiras, risadas, conversas, e-mails, mensagens e visitas de incentivo. As trocas de experiências e as opiniões fizeram toda a diferença pra mim. Eu escolheria vocês de irmãos todas as vezes que me perguntassem! A você também **Rodolfo**, que agora é da família, pela torcida!

Imensamente ao meu noivo **Bruno**, que participou diretamente do meu trabalho nesses anos todos. Pelas madrugadas no laboratório, pelas noites em claro, pela companhia nas viagens, pelas conversas e principalmente pelo incentivo, carinho e colo quando eu mais precisei. Você é (e sempre vai ser) a minha paz e o lugar onde eu sempre quero estar. Essa conquista também é sua. Amo você!

À minha segunda família, **S. Jair, D. Estela, Juliano e Renata** por me acolherem como uma filha/irmã, e agora também como madrinha do **João Bernardo**! Vocês são muito importantes para mim.

À todos os amigos da **Casa da Luz** que me deram suporte para realizar o meu trabalho, para entender e aceitar os ensinamentos que ele me trouxe. Em especial ao **Chico, S. Antônio e Marco** pelo carinho e por sempre se preocuparem comigo!

À minha orientadora **Profª. Dr.ª Fabíola Freitas de Paula Lopes** pela oportunidade de realizar esse trabalho e por proporcionar e participar do meu crescimento científico, profissional e também pessoal. Pela confiança depositada em mim em um estudo tão importante. Com certeza sou uma pessoa diferente, e melhor, depois desse trabalho. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Ciro Moraes Barros**, que gentilmente me abriu as portas do laboratório e da UNESP e sempre me tratou com muito respeito e atenção. Pelo exemplo de pessoa e pesquisador. O Sr. também é responsável por todo o meu crescimento durante esses anos!

Aos membros da Banca de defesa do doutorado **Prof. Dr. Marcelo F. G. Nogueira, Prof. Dr. José A. Visintin, Profª. Dr.ª. Fernanda C. Landim e Profª. Dr.ª. Gisele Z. Mingoti** por aceitarem participar da finalização do meu trabalho, e pelos comentários, críticas e sugestões que com certeza, deixarão esse estudo ainda melhor.

Ao **Prof. Dr. Roberto Sartori, ao Ricardo Surjus** e à toda equipe da ESALQ - USP pela colaboração com os animais e por estarem sempre dispostos a ajudar.



*Ao Prof. José Buratini e aos colegas do departamento de Fisiologia, pelo apoio e colaboração.*

*Aos amigos que passaram pelo laboratório, e aos que estão lá até hoje, pelas risadas, conversas, churrascos, cafés intermináveis na cozinha da Farmaco, SBTEs inesquecíveis e principalmente pela amizade que tivemos nesse tempo. Vocês com certeza fizeram dos meus anos aqui mais leves e divertidos: **Du**, pela amizade carinhosa e pelos comentários mais engraçados; **Paty**, por ser o meu braço direito (e esquerdo) nas tardes de manipulação dos oócitos; **Rafael**, pelos churras feitos na sua casa e por ter me apresentado a **Dé** e a **Laura**, **Thony**, pela enorme ajuda com a biologia molecular, por passar dias fazendo minhas estatísticas e pelas conversas de fim de tarde, **Mary**, por ter me ensinado o 5678, **Bárbara** e **Maurício** por toda ajuda com o microarray e por terem colocado a **Isa** na nossa convivência, **Lucacin**, pelas risadas e presentes do Paraguai, **Ronaldo**, pela amizade e pelas fotos divertidas durante as viagens, **Vinícius**, pelas histórias engraçadas e **Isabele**, pela ajuda no laboratório e pelas corridas no Lageado.*

*Em especial à **Rafaela**, que me presenteou com sua amizade divertida e despreocupada e que mesmo não estando mais em Botucatu, continua torcendo pelo meu sucesso. Seu jeito de tratar e respeitar a todos é um exemplo pra mim! Obrigada por tudo!*

*E também ao **Kaká**, **Carol**, que me hospedou na sua casa logo que cheguei aqui em Botucatu, **Cíntia**, **Fernanda** e **Zé Renato**.*

*Às amigas queridas de fora do laboratório **Raquel** e **Débora**, que levarei sempre no meu coração.*

*À **Paula**, **Fernanda** e **Ester** por sempre estarem disponíveis quando eu precisei.*

*Aos amigos do Laboratório da UNIFESP de Diadema **Cássia**, **Thaís**, **Débora** e **Rafaela** por toda colaboração e pela ótima convivência. Em especial ao **Pedro**, **Jéssica** e **Dani**, por me darem um “teto” quando precisei, além de toda ajuda com meu experimento. Nunca vou esquecer o que fizeram por mim!!!*

*Às minhas amigas de tantos anos **Van**, **Carlinha**, **Fran**, **Carol** e **Maria Angélica**, que entenderam a minha ausência e “sumiço”, mas que independente do tempo sem nos falarmos e da distância, continuam sendo minhas melhores amigas. Sinto muita falta de vocês!*

*Aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, pelas oportunidades de estágio de docência, pelos ensinamentos nas disciplinas e por toda atenção disponibilizada.*

*Ao Prof. Dr. Flamarion Tenório de Albuquerque, professor de Biotecnologia Aplicada à Reprodução Animal e Fisiopatologia da Reprodução da Fêmea na Universidade Federal de Lavras – UFLA, por ter sido meu primeiro orientador. Seu incentivo me ajudou a chegar até aqui! Minha eterna gratidão e admiração!*

*Aos veterinários **Rafael A. Satrapa**, **Luciano Muddin**, **Henrique de Paula Eduardo** e **Ricardo Tiveron** por aspirarem voluntariamente os animais durante todo experimento.*

*À equipe técnica da **Affymetrix** pelo suporte; ao **Carlos Kawamata** pela paciência em ensinar tudo que eu precisava saber e por responder minhas infinitas dúvidas.*

*Ao **Mateus J. Sudano**, profissional que admiro muito, por realizar as estatísticas e estar sempre disponível para me ajudar.*

*Aos funcionários da Farmacologia, principalmente a **Cris** e à minha madrinha **Janete**, pelas tardes e conversas compartilhadas.*

*Ao **Victor Bauer**, excelente profissional da saúde, por me dar suporte durante os dois últimos anos do doutorado.*

*À **Maria Eugênia R. De Camargo** e ao **Dr. Jörge Kobarg** do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio – LNLS) em Campinas pelo suporte e solicitude durante todo o experimento.*

*Ao **Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)** pelo apoio técnico e por permitir que o meu experimento tenha sido realizado.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão das bolsas de Jovem Pesquisador (2007/53323-0) à minha orientadora e de mestrado a mim (2010/04718-5), sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.*

*À **CAPES**, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro.*

*E por último, à cidade de **Botucatu**, “cidade dos bons ares”, que me proporcionou tantas coisas boas nesses 4 anos e que com certeza mudou a minha vida.*

**MUITO OBRIGADA!**

*“De nada vale o brilho da inteligência  
se o coração permanece às escuras.”*

Bezerra de Menezes

## RESUMO

Divergências genéticas de termotolerância foram demonstradas entre animais *Bos taurus taurus* (Holandesa) e *Bos taurus indicus* (Nelore). O efeito deletério do estresse térmico sobre o potencial de desenvolvimento do oócito é maior para *Bos taurus taurus* em comparação aos oócitos *Bos taurus indicus*. Portanto, o presente estudo determinou o perfil do transcriptoma em oócitos das raças Nelore e Holandesa submetidos ao estresse térmico durante a maturação *in vitro* (MIV), bem como a abundância de RNAm de genes candidatos em oócitos e células do cumulus submetidos aos mesmos tratamentos. Vacas não lactantes das raças Holandesa e Nelore foram submetidas à aspiração folicular guiada por ultra-som durante a estação fria. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aleatoriamente distribuídos nos tratamentos controle (38,5 °C por 22 horas) e estresse térmico (41 °C por 12 horas, seguido de 38,5 °C por 10 horas) durante a MIV. Oócitos desnudados foram submetidos à análise de microarray bovino (Affymetrix). Genes com *fold change* de pelo menos 1,5 e  $P < 0,05$  foram considerados diferencialmente expressos. A análise de microarray demonstrou 127, 9 e 6 genes diferencialmente expressos entre Raça, Temperatura e interação Raça x Temperatura, respectivamente. Os genes diferencialmente expressos foram avaliados por RT-PCR em oócitos e nas suas respectivas células de cumulus. Houve uma correlação positiva entre o *fold change* do microarray e do RT-PCR dos oócitos para os genes *KIF3A*, *CLDN11*, *BIRC3*, *DAP*, *MTIE*, *CCT4*, *DICER1* e *DENND3*. Em particular, o gene membro da família cinesina 3A (*KIF3A*) foi induzido em oócitos de Holandesa, enquanto que os genes da proteína associada à morte (*DAP*) e de tráfego intracelular de membrana domínio DENN/MADD 3 (*DENND3*) foram reprimidos em oócitos de Holandesa quando comparados a Nelore. A abundância relativa do RNAm da molécula antioxidante metalotioneína 1E (*MTIE*) foi maior nas células do cumulus da raça Holandesa, enquanto que, o RNAm da claudina 11 (*CLDN11*), que participa das junções oclusivas, foi maior na raça Nelore. O estresse térmico *in vitro* reduziu a expressão do RNAm do *MTIE* em células do cumulus. Em conclusão, o perfil de expressão gênica global em oócitos da raça Nelore e Holandesa submetidos ao estresse térmico indicou uma forte diferença entre as raças. Tais diferenças oocitárias não foram reguladas pela temperatura. No entanto, os fatores Temperatura e Raça afetaram a abundância de RNAm nas células do cumulus.

## ABSTRACT

Genetic divergences in thermotolerance have been demonstrated between *Bos taurus taurus* (Holstein) and *Bos taurus indicus* (Nelore) animals. The deleterious effect of heat stress on oocyte developmental potential is greater for *Bos taurus taurus* as compared to *Bos taurus indicus* oocytes. Therefore, the present study determined transcriptome profile in Nelore and Holstein oocytes subjected heat shock during *in vitro* maturation (IVM) as well as mRNA abundance of selected candidate genes in Nelore and Holstein heat-shocked oocytes and cumulus cells. Non-lactating Holstein and Nelore cows were subjected to ultrasound-guided follicle aspiration during the cool season. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were randomly assigned to control (38.5°C for 22 hours) and heat shock (41°C for 12 hours followed by 38.5°C for 10 hours) treatments during IVM. Denuded oocytes were subjected to Affymetrix bovine microarray. Genes with fold change of at least 1.5 and  $P < 0.05$  were considered differently expressed. Microarray analyses demonstrated 127, 9 and 6 genes differentially expressed between Breed, Temperature and Breed x Temperature interaction, respectively. Selected differentially expressed genes were evaluated by RT-PCR in oocytes and respective cumulus cells. There was a positive correlation between oocyte microarray and RT-PCR fold change for the genes *KIF3A*, *CLDN11*, *BIRC3*, *DAP*, *MTIE*, *CCT4*, *DICER1* and *DENND3*. In particular, the member of the kinesin family 3A (*KIF3A*) gene was up-regulated in Holstein oocytes, while the death-associated protein (*DAP*) and the protein trafficking gene DENN/MADD domain containing 3 (*DENND3*) were down-regulated in Holstein oocytes as compared to Nelore. The mRNA relative abundance of the antioxidant molecule metallothionein 1E (*MTIE*) was higher in Holstein cumulus cells, whereas, claudin 11 (*CLDN11*) that participates in cellular tight junctions, was higher in Nelore. Moreover, heat shock down regulated *MTIE* mRNA abundance in cumulus cells. In conclusion, global gene expression profile in Nelore and Holstein oocytes subjected to heat shock indicated a strong difference between breeds. Such differences were not regulated by temperature. However, cumulus cells mRNA relative abundance was affected by Breed and Temperature.

Listas

## LISTA DE FIGURAS

**Figure 1.** Venn Diagram illustrating genes differentially expressed between Breed (red - 127 genes), Temperature (blue - 9 genes) and Breed x Temperature interaction (green - 6 genes). Intersections indicate comun genes.....119

**Figure 2.** Biological processes from oocyte differentially expressed genes involved in each of the following effects: Breed (A), Temperature (B) and Breed x Temperature interaction (C). Data were obtained through *Ingenuity Pathways Analysis* software ..127

**Figure 3.** Quantification (fold change  $\log_2$ ) of the mRNA profile in oocyte selected genes. *KIF3A*, *CLDN11*, *BIRC3* and *DAP* genes were differentially expressed between Breed; *MTIE* gene was differentially expressed between Temperature; *CCT4*, *DICER1* and *DENND3* were differentially affected by Breed x Temperature interaction. Gray bars represent the differential level of expression of transcripts detected in the microarray study, while white bars represent the differential level of expression of the same transcripts obtained by real-time PCR. Pearson's correlation coefficient between PCR and microarray fold change values is  $r = 0.7853$  ( $P = 0.02$ ).....128

**Figure 4.** Breed (Holstein and Nelore - A) and Temperature (control and heat shock - B) effects on oocyte mRNA abundance of differentially expressed genes. Results are least-squares means  $\pm$  SEM of 3 replicates using 75 oocytes per group. (\* $P < 0.05$ ). Gene names are described in Table 1. ....129

**Figure 5.** Breed x Temperature interaction effect on oocyte mRNA abundance of differentially expressed genes. Results are least-squares means  $\pm$  SEM of 3 replicates using 75 oocytes per group. Different superscripts above each bar indicate  $P < 0.001$ . Gene names are described in Table 1. (HS: heat shock). ....130

**Figure 6.** Breed (Holstein and Nelore - A) and Temperature (control and heat shock - B) effects on cumulus cells mRNA abundance. Results are least-squares means  $\pm$  SEM of 5 replicates. Significant differences are indicated by \* $P < 0.05$  and \*\* $P = 0.06$ . Gene names are described in Table 1. ....131

**Supplementary Figure 1.** Environmental temperature (ET; °C; black triangle) and relative humidity (RH; %; black circle) by hour during OPU period. Results are least squares means  $\pm$  SEM. .... 132

**Supplementary Figure 2.** Characterization of animal comfort and heat stress according to the Temperature and Humidity Index (THI) during the experimental period (99 days). Results are least squares means  $\pm$  SEM. .... 133

**Supplementary Figure 3.** Rectal temperature (Panel A) and respiration rate (Panel B) of Holstein and Nelore animals measured during OPU. Results are least squares means  $\pm$  SEM. (\*P< 0.05). .... 134



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Temperaturas da ZTN para *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.....40

### CAPÍTULO 2

**Table 1.** Selected genes for validation by RT-PCR. ....117

**Table 2.** Primers sequences and amplicon size (base pairs – bp) used for RT-PCR....118

**Table 3.** Differentially expressed genes in Holstein and Nelore oocytes (Breed effect).....120

**Table 4.** Differentially expressed genes in control and heat-shocked oocytes (Temperature effect). ....124

**Table 5.** Differentially expressed genes affected by Breed x Temperature interaction in bovine oocytes. ....125

**Table 6.** Further analysis of differentially expressed genes modulated by Breed x Temperature interaction in bovine oocytes. ....126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADH</b>	Hormônio antidiurético
<b>AMPc</b>	Monofosfato de adenosina cíclica
<b>aRNA</b>	Ácido ribonucleico amplificado ( <i>amplified ribonucleic acid</i> )
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BMP15</b>	Proteína morfogenética óssea 15
<b>BP</b>	<i>Base pairs</i>
<b>CCs</b>	Células do cumulus ( <i>cumulus cells</i> )
<b>CCNB1</b>	Ciclina B1
<b>CCOs</b>	Complexo cumulus-oócitos
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar ( <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
<b>CGP</b>	Células germinativas primordiais
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>COCs</b>	<i>Cumulus-oocyte complexes</i>
<b>CP</b>	Corpúsculo polar
<b>D8</b>	Dia 8
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>E<sub>2</sub></b>	Estradiol
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ET</b>	<i>Environmental temperature</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal bovine serum</i>
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GDF9</b>	Fator de crescimento diferencial 9
<b>GH</b>	Hormônio de crescimento
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>GWAS</b>	Associação Genômica Ampla ( <i>Genome Wide Association Studies</i> )
<b>GVBD</b>	Quebra da vesícula germinativa ( <i>Germinal Vesicle Break-Down</i> )
<b>H</b>	Hora ( <i>hour</i> )

<b>HHA</b>	Hipotalâmico-hipofisário-adrenal
<b>HHG</b>	Hipotalâmico-hipofisário-gonadal
<b>Hol</b>	<i>Holstein</i>
<b>hpi</b>	Horas pós inseminação
<b>HSP</b>	Proteína do estresse térmico ( <i>heat shock protein</i> )
<b>HSP70</b>	Proteína do estresse térmico 70 ( <i>heat shock protein 70</i> )
<b>IGF</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina
<b>IGF-I</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina-I
<b>IGF-II</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina-II
<b>IHH</b>	Indian hedgehog
<b>ITGU</b>	Índice de temperatura do globo negro e umidade
<b>ITU</b>	Índice de temperatura e umidade
<b>IVM</b>	<i>In vitro maturation</i>
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>M</b>	Metros
<b>MG</b>	Miligrama
<b>mRNA</b>	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
<b>MI</b>	Metáfase I
<b>MII</b>	Metáfase II
<b>MIV</b>	Maturação <i>in vitro</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mm</b>	Milímetros
<b>MMP9</b>	Metalopeptidase da matrix 9
<b>MOS</b>	<i>Moloney sarcoma oncogene</i>
<b>Mg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>Mm</b>	Micrômetro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>NEL</b>	Nelore
<b>Ng</b>	Nanograma
<b>OPU</b>	Aspiração folicular guiada por ultra-sonografia ( <i>ovum pick up</i> )
<b>P<sub>4</sub></b>	Progesterona

<b>PAP</b>	Polimerase poli(A)
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
<b>POU5F1</b>	Classe 5 de domínio POU fator de transcrição 1
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>QTL</b>	<i>Quantitative trait loci</i>
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real ( <i>real-time polymerase chain reaction</i> )
<b>REL</b>	Reticulo endoplasmático liso
<b>RH</b>	<i>Relative air humidity</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>RR</b>	<i>Respiratory rate</i>
<b>RT</b>	<i>Rectal temperature</i>
<b>S</b>	<i>South</i>
<b>SNPs</b>	Polimorfismo de nucleotídeo único ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>TBS</b>	Temperatura de bulbo seco
<b>TCM 199</b>	<i>Tissue Culture Medium 199</i>
<b>Tgn</b>	Temperatura do globo negro
<b>THI</b>	<i>Temperature and humidity index</i>
<b>TMZ</b>	Transição materno-zigótica
<b>TPM</b>	Transição da permeabilidade mitocondrial
<b>Tpo</b>	Temperatura do ponto de orvalho
<b>TR</b>	Temperatura retal
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
<b>UR</b>	Umidade relativa
<b>UV</b>	Radiação ultravioleta
<b>VG</b>	Vesícula germinativa
<b>W</b>	<i>West</i>
<b>ZP</b>	Zona pelúcida
<b>ZTM</b>	Zona de termoneutralidade

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
<b>G</b>	Gauge
=	Igual
<b>IU</b>	International unit
$^{\circ}\text{K}$	Kelvin
>	Maior que
<	Menor que
$\pm$	Mais ou menos
®	Marca registrada
<b>M</b>	Molar
%	Porcentagem
v/v	volume per volume

## Sumário

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>pag. 24</b>
1 INTRODUÇÃO .....	pag. 26
2 HIPÓTESE .....	pag. 30
3 OBJETIVO .....	pag. 32
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	pag. 34
4.1 Gametogênese Feminina .....	pag. 34
4.2 Maturação Oocitária.....	pag. 36
4.3 Estresse Térmico em Bovinos.....	pag. 39
4.4 Índice de Estresse Térmico.....	pag. 42
4.5 <i>Bos taurus taurus</i> e <i>Bos taurus indicus</i> .....	pag. 44
4.5.1 Diferenças Reprodutivas entre <i>Bos t. taurus</i> e <i>Bos t. indicus</i> .....	pag. 45
4.5.2 Diferenças na Termorregulação entre <i>Bos t. taurus</i> e <i>Bos t. indicus</i> ..	pag. 46
4.6 Estresse Térmico na Reprodução .....	pag. 48
4.6.1 Efeitos no Ciclo Estral e Perfil Hormonal.....	pag. 48
4.6.2 Efeitos na Fertilidade.....	pag. 50
4.6.3 Efeitos na competência oocitária: estudos <i>in vivo</i> .....	pag. 52
4.6.4 Efeitos na competência oocitária: estudos <i>in vitro</i> .....	pag. 54
4.6.5 Alterações Celulares na Maturação Oocitária <i>in vitro</i> .....	pag. 56
4.6.6 Alterações Moleculares Transcricionais no Oócito .....	pag. 59
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	pag. 62
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>pag. 80</b>
Abstract .....	pag. 83
Introduction .....	pag. 84
Materials and Methods.....	pag. 86
Results .....	pag. 92
Discussion .....	pag. 96
Conclusion .....	pag. 102
References .....	pag. 104
Supplementary Figures .....	pag. 132
6 CONCLUSÕES .....	pag. 135

# Capítulo 1

Introdução

Hipóteses

Objetivos

Revisão da Literatura

Referências Bibliográficas



## Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

As projeções da FAO (*Food and Agriculture Organization*, 2013) para a próxima década indicam um crescimento mundial de 75 milhões de pessoas a cada ano. Neste mesmo período, as estimativas são de que o consumo mundial de carne aumente em 54 milhões de toneladas, assim como o consumo mundial de leite e de seus derivados, que deve crescer 30% entre 2010 e 2020. As projeções de produção de carne para o Brasil também indicam que esse setor deve apresentar intenso crescimento nos próximos anos. A pecuária de corte se projeta com grandes taxas de crescimento da produção no período de 2012/2013 a 2022/2023, com uma perspectiva de crescimento anual de 2%. A expansão prevista para a exportação de carne pelo Brasil coloca-o em posição de destaque no mercado mundial (BRASIL, 2013). O Brasil também é um grande produtor mundial de leite bovino e sua projeção de crescimento será em torno de 1,9% ao ano (BRASIL, 2013). O clima tipicamente tropical e subtropical do país prejudica a produtividade e fertilidade das vacas leiteiras (WILTBANK et al., 2006), o que torna necessário a importação de lácteos, prevista em 1 bilhão de litros em 2023, para suprir a demanda nacional do consumo desse produto (BRASIL, 2013).

Os efeitos da mudança climática, e do aquecimento global em particular, afetam imensamente a saúde dos bovinos (NARDONE et al., 2010). As altas temperaturas típicas do Brasil promovem o aumento da temperatura corporal em animais de interesse zootécnico para a produção de leite e carne, o que resulta em diminuição da produtividade e fertilidade. Os processos reprodutivos nos mamíferos são muito sensíveis e estão sujeitos a transtornos causados pelo estresse térmico (HANSEN, 2009) como desordens no crescimento folicular (WOLFENSON et al., 1995), na secreção hormonal (ROTH et al., 2000), na função do endométrio (MALAYER et al., 1988), no fluxo sanguíneo para o útero (ROMAN-PONCE et al., 1978) e principalmente na capacidade de desenvolvimento do oócito (AL-KATANANI et al., 2002; LIMA, 2012; MAYA-SORIANO et al., 2013) e do embrião (PUTNEY et al., 1988; EALY et al., 1993; SILVA et al., 2013).

Perturbações na fisiologia do oócito durante seu desenvolvimento e maturação podem potencializar a perda da competência dessa célula em suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário (ROTH e HANSEN, 2004a). O estresse térmico durante a maturação *in vitro* (MIV) aumentou o número de células do cumulus apoptóticas (NABENISHI et al., 2012), reduziu a maturação nuclear, a fecundação (ROTH e

HANSEN, 2005) e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (JU et al., 2005). A exposição de oócitos bovinos à temperatura severa de 42-43 °C (ROTH e HANSEN, 2004b) ou à temperatura moderada de 40-41 °C (ROTH; HANSEN, 2004a) durante as primeiras 12 horas de MIV bloqueou/reduziu o desenvolvimento embrionário. *In vivo*, as alterações oocitárias também são elevadas, como demonstrado em animais expostos a altas temperaturas sazonais (ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI et al., 2002) ou em câmara climática (PUTNEY et al., 1989; TORRES JR et al., 2008). Nestes estudos o estresse térmico causou alterações morfológicas e na competência de desenvolvimento do oócito em relação aos animais mantidos em termoneutralidade (AL-KATANANI et al., 2002; TORRES JR et al., 2008).

A qualidade oocitária tem um papel muito importante na diminuição da fertilidade de raças termossensíveis durante períodos de altas temperaturas ambientais. Estudos realizados com estresse térmico demonstraram diferenças quanto à termotolerância em oócitos das subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Quando oócitos de vacas Holandesas foram aspirados durante altas temperaturas do verão e submetidos à fecundação *in vitro* (FIV), houve redução no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, quando comparados a aqueles coletados durante o inverno (ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI et al., 2002). No entanto, não foram observadas diferenças nestes parâmetros quando vacas Brahman foram expostas as mesmas condições no verão (ROCHA et al., 1998).

O oócito bovino está rodeado por inúmeras camadas de células do cumulus. Essas células oferecem suporte nutricional para o desenvolvimento do oócito e têm papel importante no crescimento, metabolismo (HAGHIGHAT e VAN WINKLE, 1990) e maturação oocitária (TANGHE et al., 2002). A comunicação entre o oócito e as células do cumulus se dá principalmente via junções comunicantes (tipo *gap*) que permitem o transporte bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras (ALBERTINI et al., 2001). A remoção das células do cumulus antes MIV é prejudicial para a maturação do oócito em bovinos (FUKUI e SAKUMA, 1980; CHIAN e SIRARD, 1995). Do mesmo modo, uma diminuição da função destas células pode afetar ambos os tipos celulares. A exposição de complexos cumulus-oócito (CCOs) ao estresse térmico durante a MIV induz a fragmentação do DNA nas células do cumulus (NABENISHI et al., 2012) e altera o perfil transcriptoma destas células, diminuindo abundância relativa de marcadores de competência oocitária nos bovinos (RISPOLI et al., 2013).

Está claro que a produtividade e fertilidade em bovinos é um componente importante na cadeia agrícola. Estratégias que visam ampliar as taxas de fertilidade estão associadas a melhorar a compreensão sobre os mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares que regulam o funcionamento dos órgãos, tecidos e células do sistema reprodutivo (EVANS et al., 2008). Os mecanismos moleculares acionados pelas elevadas temperaturas em complexo cumulus-oócito (CCOs) bovinos durante a maturação ainda não estão bem esclarecidos bem como os fatores determinantes da divergência genética de termotolerância entre células de animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. O aprimoramento de tecnologias celulares e moleculares associadas às biotécnicas da reprodução permite um estudo aprofundado destes mecanismos. A tecnologia de microarray possibilita a determinação do perfil transcricional global de genes expressos em um tecido ou célula alvo (EVANS et al., 2008). Sendo assim, a avaliação genômica de oócitos a partir da técnica de microarray é uma importante ferramenta utilizada para promover o melhor entendimento dos processos moleculares envolvidos na redução da sobrevivência e competência dos oócitos bovinos submetidos ao estresse térmico.

Hipóteses

## 2 HIPÓTESE

### HIPÓTESE GERAL

As diferenças celulares de tolerância térmica em oócitos e células do cumulus de vacas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* devem-se à expressão diferencial de genes relacionados à termotolerância.

### HIPÓTESES ESPECÍFICAS

1. A exposição de CCOs de vacas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* ao estresse térmico *in vitro* durante as primeiras 12 horas de MIV altera o padrão global de expressão gênica em oócitos e o perfil de genes específicos em células do cumulus;
2. Oócitos e células do cumulus de vacas *Bos taurus indicus* apresentam expressão diferenciada de genes associados à termoproteção e sobrevivência celular em relação aos oócitos e células do cumulus de *Bos taurus taurus*.

Objetivos

### 3 OBJETIVOS

1. Determinar o perfil de expressão gênica global em oócitos de vacas *Bos taurus indicus* (Nelore) e *Bos taurus taurus* (Holandesas) submetidos as temperaturas controle (38,5 °C por 22 horas) e estresse térmico *in vitro* (41 °C por 12 horas, seguido de 38,5 °C por 10 horas) durante a MIV.

2. Validar por RT-PCR os genes candidatos em oócitos de vacas *Bos taurus indicus* (Nelore) e *Bos taurus taurus* (Holandesas) submetidos as temperaturas controle (38,5 °C por 22 horas) e estresse térmico *in vitro* (41 °C por 12 horas, seguido de 38,5 °C por 10 horas) durante a MIV. Estes genes candidatos serão selecionados a partir do painel global de genes diferencialmente expressos em oócitos pela técnica de microarray.

3. Avaliar por RT-PCR a expressão dos genes candidatos em células do cumulus de CCOs de vacas *Bos taurus indicus* (Nelore) e *Bos taurus taurus* (Holandesas) submetidos as temperaturas controle (38,5 °C por 22 horas) e estresse térmico *in vitro* (41 °C por 12 horas, seguido de 38,5 °C por 10 horas) durante a MIV. Estes candidatos serão selecionados a partir do painel global de genes diferencialmente expressos em oócitos pela técnica de microarray.



Revisão de Literatura

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 GAMETOGENESE FEMININA

A gametogênese é um processo pelo qual os gametas são produzidos nos organismos dotados de reprodução sexuada. Esse processo acontece nas gônadas, órgãos que também produzem os hormônios sexuais e que por sua vez participam da diferenciação das características sexuais de machos e fêmeas. Em mamíferos, as fêmeas apresentam uma população finita de oócitos que estão presentes no ovário desde seu nascimento, diferente dos machos que produzem espermatozoides continuamente a partir da puberdade (AUSTIN e SHORT, 1982; FAIR, 2003). A gametogênese feminina é denominada oogênese e inicia-se no interior dos folículos ovarianos, que são as unidades funcionais e fundamentais dos ovários (ARAÚJO et al., 2007).

O desenvolvimento dos oócitos de mamíferos tem início ainda na vida fetal (HAPER, 1994; PEPLING, 2006). Durante a embriogênese, as células germinativas primordiais (CGP) são identificadas como um aglomerado de aproximadamente 40 células na base do alantóide em desenvolvimento (SAITOU e YAMAGI, 2012). Essas células migram do endoderma do intestino posterior em desenvolvimento até o mesentério e colonizam as cristas genitais (YOSHIMIZU et al., 2001; SAITOU; YAMAGI, 2012). Nessa fase vão sofrer extensiva proliferação por mitose (ADAMS et al., 2008; SAITOU; YAMAGI, 2012) sendo chamadas de oogônias.

As oogônias apresentam citoplasma claro, devido a pouca quantidade de organelas e a alta frequência de divisões mitóticas (ERICKSON, 1966). Subsequentemente estas oogônias entram em meiose com interrupção no diplóteno da prófase tornando-se assim oócitos primários (RAHMAN et al., 2008; AERTS; BOLS, 2008; SAITOU; YAMAGI, 2012). Nesta fase o oócito pode ser identificado morfológicamente pela visualização da vesícula germinativa (VG), que caracteriza o oócito com núcleo bem desenvolvido, imaturo e em final de prófase I.

Nesta fase de VG, apesar do oócito estar quiescente em termos de divisão nuclear, observa-se intensa atividade metabólica e de crescimento. O crescimento do oócito caracteriza-se pelo aumento no tamanho da célula de 20 µm até 120 µm (FAIR et al., 1995; LUCCI et al., 2002), por alterações ultra-estruturais, aumento no número e tamanho das organelas, bem como redistribuição das mesmas (FAIR, 2003). Morfológicamente, durante o crescimento do oócito, inicia-se o desenvolvimento e

deslocamento do retículo endoplasmático liso (REL), do complexo de Golgi e de gotículas de lipídeos para a periferia do oócito que servirão como reserva energética para o embrião, aparecimento da zona pelúcida (ZP) no espaço perivitelínico, diferenciação das mitocôndrias, quebra dos centríolos e formação dos grânulos corticais, que são pequenas vesículas esféricas com a função principal de evitar a poliespermia durante a fecundação (HAPER, 1994; FAIR et al., 1996; HOSOE e SHIOYA, 1997). Além disso, ocorre também a formação das junções comunicantes (gap junctions) que associam intimamente o oócito às suas células somáticas circundantes sendo necessárias para a aquisição da competência oocitária (CANIPARI et al., 1984).

Do ponto de vista bioquímico a fase de crescimento do oócito caracteriza-se pela síntese e acúmulo de ácidos ribonucleicos mensageiros (RNAm) maternos que serão, posteriormente, traduzidos em proteínas pelos ribossomos (FAIR et al., 1996; HYTTEL et al., 1997; DE SOUSA et al., 1998; FERREIRA et al., 2009). Essas moléculas darão suporte não só à maturação, mas também ao desenvolvimento embrionário inicial após a fecundação, até que o genoma embrionário se torne transcricionalmente ativo e as mensagens derivadas do embrião comecem a regular a embriogênese (BARNES e FIRST, 1991; CHA e CHIAN, 1998; MERMILLOD et al., 2000; MEIRELLES et al., 2004).

Da retomada da meiose até essa transição materno-zigótica (TMZ), a transcrição ocorre em um nível muito baixo, quase ausente, por isso os oócitos necessitam ter estoques de RNAm (LEQUARRE et al., 2005; RACEDO et al., 2008). A capacidade dos oócitos apresentarem uma maturação bem sucedida está relacionada aos transcritos acumulados durante a fase de crescimento. A síntese proteica após a retomada da meiose é dependente dos estoques de RNAm adquiridos durante o crescimento oocitário. Oócitos no estágio de metáfase II (MII) apresentam alta atividade traducional (OH et al., 1997), e essa produção de proteínas é crucial para a meiose oocitária, além de preparar proteínas maternas para posterior fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (MINAMI et al., 2007).

A quebra de vesícula germinativa (em inglês, *Germinal Vesicle Break-Down - GVBD*) marcará a continuidade da meiose e do processo de maturação oocitária (ARAÚJO et al., 2007). Assim, os oócitos estocados na fase de prófase I da primeira divisão meiótica necessitam da ação hormonal desencadeada durante a puberdade para a retomada e finalização da meiose I e para uma correta maturação citoplasmática (WANG e SUN, 2007).

## 4.2 MATURAÇÃO OOCITÁRIA

A maturação oocitária envolve uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares pelos quais o oócito adquire habilidade para a fecundação e para expressar seu máximo potencial de desenvolvimento (TIBARY et al., 2005). O processo de maturação é fundamental para o desenvolvimento do embrião, pois é nessa etapa que o oócito bovino se torna capaz de ser fertilizado e de manter o desenvolvimento embrionário inicial até que ocorra a TMZ (HYTTEL et al., 1997).

A maturação citoplasmática pode ser subdividida, didaticamente, em redistribuição das organelas, dinâmica dos filamentos do citoesqueleto e maturação molecular (FERREIRA et al., 2009). As organelas citoplasmáticas, como os grânulos corticais e as mitocôndrias, desempenham papéis importantes durante os eventos de maturação e fecundação do oócito. Durante a maturação, os grânulos corticais migram do complexo de Golgi para a superfície, localizando-se entre 0,4 e 0,6  $\mu\text{m}$  abaixo da membrana plasmática do oócito (DUCIBELLA e BUETOW, 1994). Esta é a mudança mais aparente da maturação citoplasmática (HYTELL et al., 1997). Apenas quando estão situados logo abaixo da membrana plasmática é que podem sofrer exocitose por fusão com a membrana. Esta fusão permite a liberação do conteúdo dos grânulos corticais no espaço perivitelino e é um importante passo no bloqueio da poliespermia (SZOLLOSI, 1962; HOSOE e SHIOYA, 1997; WANG et al., 1997). Oócitos bovinos que exibem melhor distribuição dos grânulos corticais no citoplasma após a MIV, apresentam maior capacidade de fecundação normal e diminuição da polispermia (NAGANO et al., 1999).

As mitocôndrias são organelas multi-tarefas envolvidas na síntese de trifosfato de adenosina (ATP), produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), sinalização por cálcio e apoptose (RAMALHO-SANTOS et al., 2009). Estas organelas apresentam um papel vital no metabolismo energético, pois produzem a maior parte da energia celular em forma de ATP, por fosforilação oxidativa a partir do metabolismo dos carboidratos e dos ácidos graxos contidos no citoplasma (WILDING et al., 2001; CUMMINS, 2004).

A distribuição das mitocôndrias durante a maturação está bem caracterizada em oócitos de mamíferos. Em estágio de VG, as mitocôndrias são encontradas predominantemente na periferia do citoplasma, e com pequenos grupos dispersos mais ao centro do oócito; em oócitos em estágio de MII, as mitocôndrias ocupam posição

mais centralizada no citoplasma (HYTTEL et al., 1997; SUN et al., 2001; ADONA et al., 2008). A alta concentração de mitocôndrias no oócito viabiliza a intensa atividade metabólica oocitária e a elevada síntese de moléculas necessárias aos processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento. A mitocôndria pode ser utilizada para avaliação da qualidade oocitária, pois mudanças na fisiologia mitocondrial durante a maturação podem promover produção excessiva de EROs, resultando em subsequente apoptose (INOUE et al., 2004; WANG et al., 2009a).

O citoesqueleto é uma rede de filamentos protéicos que permite as células organizarem seus componentes, realizarem movimentos coordenados e interagirem mecanicamente com o ambiente (KIM et al., 2000), além de ser essencial à manutenção da forma da célula, à movimentos que envolvem a superfície celular, como a locomoção e também para processos como a divisão celular. Os microtúbulos e filamentos de actina são os principais componentes do citoesqueleto no oócito e, durante o crescimento e maturação oocitária, sofrem constante polimerização e despolimerização para dar suporte aos processos celulares. Durante a fase de transição de VG à anáfase I e no oócito em MII, os filamentos de actina encontram-se abundantes e distribuídos na região cortical do oócito (FERREIRA et al., 2009), fornecendo a estrutura para a divisão celular (KIM et al., 2000). Durante a metáfase I (MI) e MII os microtúbulos formam o fuso meiótico e a placa metafásica. Dessa maneira, os microtúbulos são responsáveis por manter o fuso meiótico e os cromossomos na posição periférica e pela extrusão dos corpúsculos polares durante a maturação e a fertilização (WEBB et al., 1986).

A maturação molecular corresponde às fases de crescimento e maturação do oócito e é assim definida por se tratar da transcrição, armazenamento e processamento dos RNAm expressos pelos cromossomos, que serão, posteriormente, traduzidos em proteínas pelos ribossomos (FERREIRA et al., 2009).

Durante o período de maturação oocitária até o estágio de embrião de 8 células, fase em que ocorre a ativação do genoma embrionário bovino, o RNAm é gradualmente esgotado (GILBERT et al., 2009; VALLÉE et al., 2009) sofrendo degradação, poliadenilação citoplasmática e tradução (PICCIONI et al., 2005; BELL et al., 2008). Índícios em camundongo sugerem que esse declínio de RNAm é importante para a ativação do genoma embrionário (LI et al., 2010). Como visto anteriormente, a produção do estoque de RNAs ocorre durante o crescimento folicular e cessa com o rompimento da vesícula germinativa e retomada da meiose (FAIR et al., 1995; HYTTEL et al., 1997; DE SOUSA et al., 1998; GANDOLFI e GANDOLFI, 2001). Isto

ocorre porque a retomada da meiose envolve a condensação dos cromossomos, o que resulta em um súbito bloqueio da transcrição nuclear (WU et al., 1996; LONERGAN et al., 1997).

A síntese proteica que ocorre após a retomada da meiose é extremamente dependente dos estoques maternos de RNAm adquiridos durante o crescimento do oócito. Essas proteínas estão envolvidas tanto na maturação (nuclear e citoplasmática) quanto nos eventos celulares subsequentes: fertilização, formação de pronúcleos e embriogênese inicial (SIRARD, 2001). Durante a progressão da meiose, no decorrer da maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos, observam-se quatro fases de síntese proteica: proteínas necessárias para a GVBD, para completar a meiose I, para progressão até meiose II, e, finalmente, para manutenção da MII (SIRARD et al., 1989).

A maturação nuclear do oócito bovino refere-se à segregação cromossômica (FERREIRA et al., 2009) e inicia-se com a GVBD, onde os cromossomos se condensam e o envelope nuclear é desfeito. Este processo é caracterizado pela progressão da meiose a partir do estágio dictiato (diplóteno da prófase da primeira meiose - profase I) até a fase de MII (MINGOTI et al., 1995; MEINECKE et al., 2001; ARAÚJO et al., 2007). O objetivo da maturação nuclear é reduzir o número de cópias da cromatina materna de quatro para dois. O oócito sofre divisão meiótica, originando duas células filhas, sendo que uma delas contém a maior parte do citoplasma e constitui o oócito propriamente dito e a outra, muito menor, é expulsa para o espaço perivitelino, sendo denominada de corpúsculo polar (CP). Este corpúsculo possui uma variedade de organelas, incluindo mitocôndrias, ribossomos, grânulos corticais e cromossomos (CHAVES et al., 2010). Além de contribuir com metade do material genético, o oócito também fornece quase todo citoplasma para o zigoto recém-formado provendo transcritos e proteínas fundamentais para o desenvolvimento inicial do embrião (SCHULTZ, 2002).

A segunda retomada da meiose acontecerá somente depois da fertilização, finalizando a meiose II e ocorrendo a extrusão do segundo CP (ARAÚJO et al., 2007). *In vivo*, a maturação oocitária ou competência meiótica é induzida pelo pico de LH a cada ciclo estral (GORDON, 1994). *In vitro*, a maturação é induzida pela remoção do oócito imaturo do seu ambiente folicular através da aspiração folicular (HYTTEL et al., 1986). A retirada do oócito desse ambiente de maneira artificial, o priva de fatores inibitórios, como por exemplo, o monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), fazendo com que ocorra a retomada da meiose espontaneamente. A redução do AMPc é um

indício para a maturação oocitária, pois seus níveis elevados dentro dessa célula sinalizam a manutenção do bloqueio meiótico (CONTI et al., 1998; EYERS et al., 2005).

### 4.3 ESTRESSE TÉRMICO EM BOVINOS

No Brasil, o clima predominantemente subtropical e tropical caracteriza-se por altas temperatura e umidade, o que pode promover aumento da temperatura corporal em bovinos de aptidão de corte e, principalmente, leiteira. O resultado desta hipertermia é a diminuição da produtividade e fertilidade desses animais.

O termo estresse (*stress*) foi utilizado pela primeira vez em 1936 pelo austríaco Hans Selye em artigo publicado na revista Nature (SELYE, 1936). Em seu artigo, Selye definiu estresse como "estado do organismo, o qual, após a atuação de agentes ambientais de quaisquer naturezas, responde com uma série de reações não específicas de adaptação, entre as quais estão em primeiro plano uma hipertrofia do córtex adrenal e aumentada secreção de seus hormônios" (AZEVEDO e ALVES, 2009).

O estresse térmico é definido então, como o conjunto de forças externas ao animal homeotérmico que agem alterando sua temperatura corporal normal (DIKMEN e HANSEN, 2009). Frente ao estresse, o animal ativa uma série de mecanismos a fim de restabelecer o equilíbrio, e a adaptação a tais desafios térmicos está associada à diferença genética, em que fatores estressantes podem ser mais nocivos a alguns indivíduos do que a outros.

A zona de termoneutralidade (ZTN) é uma faixa de temperatura ambiente ideal na qual o animal não sofre estresse pelo frio ou pelo calor (BACCARI JR., 1998). Dentro da ZTN, o custo fisiológico é mínimo, a retenção de energia da dieta é máxima, a temperatura corporal e o apetite são normais e a produção é ótima, permitindo que o animal manifeste totalmente seu potencial genético para produção (AZEVEDO e ALVES, 2009). O gasto de energia para manutenção do animal ocorre a um nível mínimo e, assim, a energia do organismo pode ser dirigida para os processos produtivos, além daqueles de manutenção, não ocorrendo desvio de energia para manter o equilíbrio. Na ZTN, a frequência respiratória do animal está dentro do padrão fisiológico e não ocorre sudorese, apenas a difusão de água por meio da pele (AZEVEDO e ALVES, 2009).

Na literatura, existe grande variação no que concerne às temperaturas que delimitam ZNT, pois o conforto térmico também depende de outros fatores tais como

umidade relativa do ar, adaptação e *status* metabólico do animal (AZEVEDO e ALVES, 2009; Tabela 1).

Tabela 1. Temperaturas da ZTN para *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.

	Subespécies		Referência
	<i>Bos taurus taurus</i>	<i>Bos taurus indicus</i>	
Termoneutralidade	0 °C a 16 °C	10 °C a 27 °C	Curtis (1981)
Termoneutralidade (em lactação)	- 5 °C a 21 °C (raça Holandesa)	-5 °C a 29 °C	Muller (1982)
	-5 °C a 24 °C (raças Jersey e Schwyz)		
Termoneutralidade	13 °C a 18 °C	13 °C a 18 °C	Nããs (1989)
Termoneutralidade	-1 °C a 16 °C	-----	Baeta e Souza (1997)

Assim, pode-se constatar que a maior parte do Brasil apresenta frequentemente temperaturas superiores por várias horas do dia, em grande parte do ano, sujeitando os animais, principalmente de aptidão leiteira, ao estresse térmico por calor (AZEVEDO; ALVES, 2009). O estresse térmico por calor só ocorre com a temperatura ambiente acima da temperatura crítica superior, que é de 27 °C para *Bos taurus taurus* e 35 °C para *Bos taurus indicus* (CURTIS, 1981). A temperatura crítica inferior é de -10 °C para *Bos taurus taurus* e 0 °C para *Bos taurus indicus* (CURTIS, 1981), em que, abaixo dessas temperaturas, os animais entram em estresse pelo frio.

Os bovinos são animais homeotérmicos, ou seja, controlam a temperatura corporal dentro de uma faixa estreita, mesmo quando expostos a variações de temperatura ambiente (MEDEIROS e VIERIA, 1997). A temperatura retal fisiológica nesta espécie varia entre 35 °C e 39 °C (SWENSON e REECE, 1996; DU PREEZ, 2000), sendo regulada pela produção e perda de calor para o ambiente através dos mecanismos de condução, convecção, radiação e evaporação.

O estresse térmico provoca respostas de termoregulação em bovinos. O aumento da temperatura corporal resulta na redução de ingestão de alimentos, aumento da frequência respiratória e da ingestão de água, além de alterações na resposta hormonal (WEST, 2003; BERNABUCCI et al., 2010).

Em exposições prolongadas a altas temperaturas do ar, a redução na ingestão de alimentos ocorre como adaptação fisiológica a fim de minimizar a produção de calor interna e a taxa metabólica, propiciando o equilíbrio entre o calor endógeno e do



ambiente (MADER e DAVIS, 2004; BEATTY et al., 2008). Concomitantemente, devido a redução na ingestão de matéria seca, o animal terá menor motilidade gástrica, predileção por alimentos concentrados (menor fermentação no rúmen), redução do pH ruminal promovendo maior produção de ácido láctico, redução do pH sanguíneo e, como consequência, acidose metabólica (MACHADO, 1998).

A diminuição da ingestão de alimentos precede um declínio na produção de leite quando as vacas estão submetidas ao estresse térmico (RHOADS et al., 2009). Em casos graves de estresse térmico, as vacas utilizam a água que seria aproveitada na síntese de leite para os processos metabólicos de dissipação de calor (JONES e STALLINGS, 1999). O estresse térmico aumenta a ingestão de água, uma vez que as propriedades físicas da água são importantes para a transferência do calor corporal para o ambiente, ou seja, a hidratação mantém a temperatura corporal do animal dentro dos limites de normalidade (MADER e DAVIS, 2004; GAUGHAN et al., 2010; SULLIVAN et al., 2011). Os requerimentos de água durante o estresse aumentam de 1,2 a 2-fold quando comparado aos requerimentos dos animais sob termoneutralidade (BEED e COLLIER, 1986).

Adaptações metabólicas são requeridas para organizar a utilização alterada de nutrientes ocasionadas pelo estresse. Devido ao considerável envolvimento do sistema endócrino na coordenação do metabolismo, é esperado que o estresse térmico resulte na alteração das concentrações séricas hormonais (BEED e COLLIER, 1986). Os hormônios associados à adaptação ao estresse são prolactina (PRL), hormônio de crescimento (GH), hormônios da tireóide, glicocorticóides e hormônio antidiurético (ADH) (FAROOQ et al., 2010).

Vários estudos demonstraram a influência térmica do ambiente sobre respostas fisiológicas dos animais domésticos, representadas pelas frequências cardíaca e respiratória, produção e dissipação do calor e, principalmente, temperatura retal. À medida que aumenta a temperatura ambiente, ultrapassando os limites da temperatura crítica superior, observa-se o aumento da frequência respiratória e da temperatura retal nos animais domésticos (MEDEIROS e VIERIA, 1997).

A frequência respiratória é muito susceptível ao aumento da carga térmica ambiental. O aumento da taxa respiratória é um processo pelo qual as secreções mucosas aquosas da região da boca perdem calor via evaporação por constante movimento de ar inalado e exalado (ROBERTSHAW e DMI'EL, 1983). Os bovinos apresentam de 12 a 36 movimentos respiratórios por minuto (mpm) em condições de

termoneutralidade (SMITH, 2006). Vacas em ambientes sombreados apresentam reduzida frequência respiratória quando comparadas a vacas em ambientes não sombreados (54 versus 82 bpm), bem como menor temperatura retal (38,9 versus 39,4 °C; ROMAN-PONCE et al., 1977).

O aumento dos ciclos respiratórios como resposta ao estresse térmico, pode resultar em redistribuição do fluxo de sangue para os músculos envolvidos na atividade respiratória. O maior fluxo sanguíneo para a periferia associado com a termorregulação, simultaneamente, reduz o fluxo sanguíneo para os órgãos internos, incluindo o trato reprodutivo. Por exemplo, o fluxo de sangue para o ovário, o colo uterino e a tuba uterina diminuem de 20-30% durante o estresse térmico, enquanto que o fluxo sanguíneo vulvar aumenta em 40% (ROCHA et al., 2012). A temperatura retal é o indicador mais importante entre os parâmetros fisiológicos que podem ser mensurados para verificar o estresse térmico (HANSEN, 2005) já que o seu aumento indica falha ou esgotamento dos mecanismos de termoregulação (MOTA, 1997).

#### 4.4 ÍNDICE DE ESTRESSE TÉRMICO

O estresse térmico é causado pela combinação de fatores climáticos, ambientais e térmicos. Dessa forma, a temperatura ambiente não pode ser usada como o único indicativo de estresse. Entre os fatores responsáveis pela carga de calor recebida pelo animal, podemos destacar a radiação solar, umidade relativa do ar, vento, pressão atmosférica, altitude e precipitação (MEDEIROS e VIEIRA, 1997).

O índice de estresse térmico mais comumente usado em vacas Holandesas em lactação é o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) (MCDOWELL et al., 1976). O ITU é calculado a partir da temperatura ambiente ou temperatura de bulbo seco (TBS) e da umidade relativa do ar (UR), a partir da fórmula (NRC, 1971):

$$ITU = (0,8 \times TBS) + [(UR/100) \times (TBS - 14,4)] + 46,4$$

onde

ITU = Índice de temperatura e umidade

TBS = Temperatura de bulbo seco

UR = Umidade relativa

O valor do ITU abaixo de 72 é considerado ausência de estresse, entre 72 e 78, estresse ameno ou brando, entre 79 e 88, estresse moderado e de 89 a 98, estresse severo (ARMSTRONG, 1994). Embora o ITU só considere a temperatura ambiente e umidade do ar, descartando os outros agentes climáticos como radiação, este é amplamente aceito e utilizado como indicador de estresse térmico (WEST, 1997; MADER et al., 2002).

Existem índices que utilizam outros fatores ambientais para determinar o grau de estresse animal. O Índice da Temperatura do Globo Negro e Umidade (ITGU) é calculado com base na temperatura do ar, radiação, umidade relativa, pressão barométrica e efeito do vento (MEDEIROS e VIERIA, 1997). O globo de Vernon ou globo negro ou globotermômetro consiste em uma esfera oca, de cobre, com aproximadamente 0,15 m de diâmetro, pintada externamente com duas camadas de tinta preto-fosca para maximizar a absorção de radiação solar. Em seu interior, é inserido um termômetro para leitura da temperatura. O globo negro indica, por meio do valor lido no termômetro, os efeitos combinados da energia radiante, temperatura e velocidade do ar, três importantes fatores que afetam o conforto térmico dos animais. É um meio prático para determinar o componente energia radiante no ambiente e está consolidado nas pesquisas em bioclimatologia, ou seja, na determinação de índices que expressam o grau de conforto dos animais (AZEVEDO e ALVES, 2009).

O cálculo do ITGU é feito a partir da fórmula

$$\text{ITGU} = T_{\text{gn}} + 0,36 T_{\text{po}} - 330,08$$

onde

$T_{\text{gn}}$  = temperatura do globo negro em Kelvin (°K)

$T_{\text{po}}$  = temperatura do ponto de orvalho em Kelvin (°K)

Este índice é muito mais eficiente do que o ITU, já que não engloba só a temperatura do ar, mas também o efeito da radiação, da umidade relativa, da pressão barométrica e o efeito do vento. Quando o ITGU é < 74, o ambiente é propício para qualquer criação de animais Europeus; de 74 a 78, os animais elevam a frequência respiratória sem afetar basicamente a homeostase; de 79 a 84, os animais elevam a frequência respiratória, sua temperatura corpórea e há necessidade de manejo diário, alimentar e reprodutivo cuidadoso para se obter sucesso; de 82 a 86, somente com meios artificiais de termólise, haverá produção condizente com o potencial genético; e

ITGU > 86, caso quase insuportável em que, economicamente, será difícil obter sucesso com os animais de grande precocidade e produção (MEDEIROS e VIERIA, 1997). No entanto, apesar de prático, o globo negro tem sofrido modificações em sua forma, tamanho e material de confecção, decorrentes principalmente do preço do globo de cobre utilizado no instrumento padrão, o que torna seu uso menos comum (AZEVEDO e ALVES, 2009).

#### 4.5 *Bos taurus taurus* E *Bos taurus indicus*

Segundo a nomenclatura clássica de Linneu (Carolus Linnaeus), em sua obra clássica “Systema Naturae” publicada em 1735, os taurinos europeus e os zebuínos indianos foram considerados espécies distintas, denominadas *Bos taurus* e *Bos indicus*, respectivamente (LINNAEUS, 1735). No entanto, a literatura moderna preconiza que taurinos e zebuínos descenderam do mesmo grupo de animais e por terem fecundidade completa entre si pertencem a uma única espécie denominada *Bos taurus*. Assim, o gado bovino é denominado *Bos taurus*. Devido a notável diferença fenotípica e a distância genética, taurinos (bovinos sem cupim) e zebuínos (bovinos com cupim) foram classificados como subespécies distintas, denominadas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, respectivamente (ASSIS, 2007).

Por centenas de milhares de anos a evolução das subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* ocorreu sob diferentes condições ambientais (HANSEN, 2004). Os bovinos taurinos evoluíram em clima temperado e não foram expostos ao desafio dos estresses presentes nas regiões tropicais, sendo pouco produtivos nestes ambientes. Já os zebuínos evoluíram nos trópicos na presença de elevadas cargas de calor, de doenças tropicais e de alto desafio de parasitas internos e externos (ASSIS, 2007). Além disso, esses animais tendem a ter uma menor exigência nutricional e a responder melhor do que animais *Bos taurus taurus* em ambientes com certo grau de restrição nutricional (MEDEIROS e VIEIRA, 1997).

Com o passar dos anos, os bovinos tem sido criados e selecionados especialmente para a produção de carne e leite. Algumas das raças da subespécie *Bos taurus taurus* (raças Holandesa, Pardo Suíça, Jersey, Angus, Simental e Schwyz, por exemplo) foram selecionadas para a produção leiteira, diferente das raças da subespécie *Bos taurus indicus* (raças Nelore, Brahman, Hereford e Gir, por exemplo) que apresentam uma maior aptidão para produção de carne (SARTORI et al., 2010).

Os animais zebuínos são conhecidos por serem menos férteis e apresentarem uma menor produção leiteira do que animais das raças taurinas, porém são mais adaptados às condições ambientais, o que os faz mais apropriados ao sucesso reprodutivo nos trópicos (SARTORI et al., 2010). Uma ferramenta muito utilizada para superar ou minizar os problemas relacionados à baixa produção de animais *Bos taurus taurus* de raças puras em ambientes tropicais (SARTORI et al., 2010) é o cruzamento entre raças de taurino e zebuínos, proporcionando melhor adaptabilidade aos trópicos (GAUGHAN et al., 1999).

#### **4.5.1 Diferenças reprodutivas entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus***

Diferenças fisiológicas reprodutivas entre as subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* tem sido relatadas em muitos estudos (ALVES et al., 2002; CAMARGO et al., 2007; BARUSELLI et al., 2007; SARTORI et al., 2010). A puberdade é um fenômeno muito estudado entre animais das diferentes idades e subespécies. Novilhas *Bos taurus taurus* apresentam maturidade sexual e puberdade mais cedo que novilhas *Bos taurus indicus* (RODRIGUES et al., 2002). Zebuínos criados nos trópicos apresentam idade estimada de puberdade entre 16 e 40 meses, enquanto que animais taurinos entram em puberdade de 6 a 12 meses mais cedo (ABEYGUNAWARDENA e DEMATAWEWA, 2004; NOGUEIRA, 2004).

As características comportamentais de estro também diferem entre as subespécies. A duração do cio varia, sendo de 13 e 16 horas em média nas fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, respectivamente (BARUSELLI et al., 2007). Por apresentarem a duração do estro mais curta, a detecção do cio em fêmeas zebuínas se torna mais difícil (BARUSELLI et al., 2007). Além disso, mais da metade dos animais *Bos taurus indicus* iniciam a manifestação de cio no período da noite (entre 18:00 e 6:00 h), sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite (PINHEIRO et al., 1998), dificultando o manejo e a eficácia da detecção de cio. Outro diferencial entre zebuínos e taurinos é o número de ondas foliculares. Um estudo conduzido por Wolfenson et al. (2004) demonstrou que vacas Holandesas em lactação e novilhas púberes apresentam predominância de duas ou três ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Por outro lado, vacas da raça Gir apresentam a incidência de três até quatro ondas de crescimento folicular por ciclo estral (GAMBINI et al., 1998).

Além das diferenças no ciclo estral e no número de ondas foliculares, a população de pequenos folículos no ovário de vacas Nelore é maior que em ovários de vacas Holandesas (SARTORI et al., 2010). No início de cada onda folicular foram detectados cerca de 24 folículos antrais pequenos em vacas *Bos taurus taurus* (GINTHER et al., 1996) e cerca de 50 folículos pequenos em *Bos taurus indicus* (BURATINI JR et al., 2000). O diâmetro do folículo dominante/ovulatório é maior em vacas *Bos taurus taurus* (17 mm aproximadamente) quando comparadas a vacas *Bos taurus indicus* (12 mm aproximadamente; GINTHER et al., 1989; SARTORELLI et al., 2005). Corroborando com os dados acima, um estudo recente realizou a análise temporal da dinâmica folicular de novilhas da raça Holandesa e da raça Gir mantidas sob as mesmas condições de manejo ambiental e nutricional. Foram demonstradas diferenças significativas entre o número de ondas foliculares por ciclo estral, sendo de  $2,6 \pm 0,17$  para as fêmeas da raça Holandesa e  $3,4 \pm 0,24$  para as fêmeas da raça Gir, o número de folículos recrutados após a primeira onda folicular foi menor nas novilhas Holandesas ( $26,1 \pm 1,7$ ) do que nas novilhas Gir ( $66,2 \pm 15,9$ ), os diâmetros dos folículos dominantes ( $11,8 \pm 0,73$  e  $9,4 \pm 0,52$ ) e o diâmetro máximo do corpo lúteo ( $26,8 \pm 0,54$  e  $22,3 \pm 0,98$ ) foram maiores nas novilhas da raça Holandesa em comparação as novilhas da raça Gir, respectivamente (BALDRIGHI, 2013).

O período de gestação entre as subespécies também é distinto. A duração da gestação em *Bos taurus indicus* (292 dias em média) é mais longa que a de *Bos taurus taurus* (282 dias em média; PASCHAL et al., 1991).

#### **4.5.2 Diferenças na termorregulação entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus***

As influências genéticas na regulação da temperatura corporal tem sido bem estudadas em bovinos. Já foi demonstrado que animais de subespécies diferentes apresentam habilidades termorregulatórias distintas (HAMMOND et al., 1996; GAUGHAN et al., 1999; PEREIRA et al., 2008). Os animais *Bos taurus indicus* possuem maior capacidade de termorregulação do que os animais *Bos taurus taurus*. Esse aspecto está provavelmente associado a diferenças anatômicas e fisiológicas presentes em zebuínos que intensificam a perda de calor e a termorregulação (HANSEN, 2004).

O padrão da pelagem e as propriedades da pele são fatores que influenciam diretamente na termorregulação. A presença de pêlos densos e espessos, típicos de

muitos *Bos taurus taurus*, diminuem o fluxo de calor por condução e convecção aumentando os efeitos do estresse térmico (FINCH et al., 1984). Já os pelos lisos, brilhantes e de cores claras característicos dos *Bos taurus indicus* refletem maior quantidade de raios do sol, aumentando a perda de calor para o ambiente (HUTCHINSON e BROWN, 1969; HANSEN, 2004). Olson et al., (2003) identificaram um gene, chamado de *slick hair*, responsável por produzir uma pelagem curta e lisa em animais taurinos, e que está altamente relacionado com a manutenção das temperaturas retais mais baixas nos períodos mais quentes do ano. Quando submetidas ao estresse térmico em câmara climática, vacas da raça Holandesa que possuem o gene *slick hair* apresentaram uma regulação da temperatura corporal mais eficiente do que vacas da mesma raça com ausência desse gene (DIKMEN et al., 2008). Um dos motivos para isso é que animais de pelo liso são capazes de regular a temperatura através do aumento da taxa de transpiração (DIKMEN et al., 2008).

Um estudo comparando a transmissão da radiação ultravioleta (UV) através do pelame e da epiderme de bovinos das raças Holandesa e Nelore demonstrou que em um ambiente caracterizado por altos níveis de UV, a combinação mais adequada é o pelame de cor branca, sobre uma epiderme de cor negra. Entretanto, um pelame negro constitui uma superfície de grande absorvidade da radiação térmica, de modo que a temperatura da superfície cutânea nestes animais é mais elevada que naqueles com pelame branco (SILVA et al., 2001). A abundância de pele solta também contribui para a habilidade de resistir a climas quentes, aumentando a superfície corporal para dissipar o calor.

A presença de glândulas sudoríparas de densidade e tamanhos maiores, com maior número de camadas de células no epitélio e localização mais próxima da superfície da pele permite, aos animais zebuínos, uma maior habilidade em dissipar o calor para o ambiente via evaporação (GAUGHAN et al., 1999; HANSEN, 2004; VEERASAMY et al., 2012). Além disso, animais *Bos taurus indicus* tem uma menor produção de calor endógeno, proveniente de um menor metabolismo basal (BLACKSHAW e BLACKSHAW, 1994), o que contrasta com o intenso metabolismo associado à lactação em animais de aptidão leiteira. Uma possível razão para essa taxa de metabolismo reduzida seria o tamanho diminuído dos órgãos internos nesses animais quando comparados aos tamanhos dos órgãos de animais da subespécie *Bos taurus taurus* (HANSEN, 2004).

A frequência respiratória atua como um mecanismo para a perda de calor durante o estresse térmico e sua alteração ocorre logo após os mecanismos de

vasodilatação e sudorese (BACCARI JR., 2001). Essa via evaporativa de perda de calor é maior nas raças européias (*Bos taurus taurus*) quando comparadas as raças zebuínas. Foi verificado que *Bos taurus indicus* nascidos no Brasil apresentam média de 15 movimentos respiratórios por minuto enquanto *Bos taurus taurus* também nascidos no Brasil apresentam frequência respiratória média de 35 movimentos por minuto (CARVALHO et al., 1995). Além disso, o estresse térmico causado por exercício físico em alta temperatura ambiente e alta umidade relativa causou taquipnéia (frequência respiratória elevada) e hipertermia em bovinos da raça Simental (CARVALHO et al., 1995). Sob condições de altas temperaturas, durante o verão na Flórida, novilhas Angus apresentaram temperatura retal e frequência respiratória maiores quando comparadas as novilhas Brahman, indicando maior habilidade de animais *Bos taurus indicus* em dissipar o calor (HAMMOND et al., 1996).

A seleção de animais com maior termotolerância dentro das raças de maior susceptibilidade térmica certamente melhorariam o potencial produtivo destas raças. Um estudo de Associação Genômica Ampla (GWAS, do inglês *Genome Wide Association Studies*) e identificação de SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) em vacas Holandesas quanto à temperatura retal demonstrou a existência de QTL (quantitative trait loci) para prever alguma variação genética em temperatura retal. Estes QTL podem revelar-se importantes para a seleção genética de termotolerância (DIKMEN et al., 2013).

## **4.6 ESTRESSE TÉRMICO NA REPRODUÇÃO**

### **4.6.1 Efeitos no ciclo estral e perfil hormonal**

Os processos reprodutivos nos mamíferos, tanto em machos quanto em fêmeas, são amplamente afetados e estão sujeitos a transtornos causados pelo estresse térmico (HANSEN, 2009). Estudos iniciais demonstraram que o estresse térmico em fêmeas induz um aumento na atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) com diminuição na função reprodutiva e possível relação com os hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) (SELYE, 1936).

Deste modo, as altas temperaturas podem comprometer a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e, conseqüentemente, a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do LH (ROCHA et al., 2012) provocando inúmeras



desordens reprodutivas. Roth et al. (2000) observaram depressão da dominância folicular em vacas Holandesas expostas a altas temperaturas em comparação a vacas em termoneutralidade. Este efeito foi expresso por uma diminuição pronunciada na inibina plasmática e por aumento das concentrações de FSH circulante (ROTH et al., 2000). Já foi observado que a frequência de liberação pulsátil de LH no dia 5 do ciclo estral foi menor em vacas estressadas em comparação a vacas mantidas em ambientes com refrigeração (WISE et al., 1988). A diminuição na liberação das gonadotrofinas (LH e FSH) afeta produção de estrógenos (BUTLER et al., 2003; DE RENSIS; e SCARAMUZZI, 2003), acarretando em diversos problemas de ordem reprodutiva assim como redução na intensidade e duração do estro com consequentes falhas de detecção.

A duração do estro nas fêmeas taurinas é de, aproximadamente, 14 a 18 horas durante o inverno, enquanto que no período de verão, essa duração é reduzida para oito a dez horas (BARBOSA e DAMASCENO, 2002 apud CRUZ, 2011). Não só a duração do estro é reduzida, mas também o número de montas diminui em períodos de clima quente em relação aos períodos de clima frio (PENNINGTON et al., 1985) e por isso, nos meses mais quentes do ano, o índice de falha na detecção do estro chega a 75-80% (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999).

Os efeitos do estresse térmico na concentração de progesterona ( $P_4$ ) e estradiol ( $E_2$ ) circulantes são controversos. Em vacas *Bos taurus indicus* da raça Gir expostas ao estresse térmico severo (38 °C e 80% UR) por 28 dias em câmara climática foi observada redução na concentração de  $P_4$  circulante, anestro prolongado e redução do ciclo estral mesmo após o período de exposição (TORRES-JÚNIOR et al., 2008). A  $P_4$  plasmática reduzida afeta a esteroidogênese do folículo dominante e consequentemente a formação do futuro corpo lúteo, além de alterar a morfologia e função endometrial no ciclo subsequente (WOLFENSON et al., 2000). Contraditoriamente, Wise et al. (1988) constataram que as concentrações plasmáticas de  $P_4$  e  $E_2$  foram semelhantes entre vacas Holandesas em lactação submetidas ao estresse térmico durante o verão no Arizona (maio a setembro) e vacas em condições de termoneutralidade em câmara climática (22 °C em ar refrigerado). Já Trout et al. (1998) reportaram que houve marcado aumento nas concentrações plasmáticas de  $P_4$  em vacas Holandesas lactantes submetidas ao estresse térmico de 38,3 °C em câmara climática por 10 dias.

Alguns estudos demonstraram que a exposição crônica a altas temperaturas *in vivo* promoveu a supressão da concentração plasmática de  $E_2$  (GWAZDAUSKAS et al., 1981; WOLFENSON et al., 1995; WILSON et al., 1998), enquanto que Wise et al.,

(1988) constataram que as concentrações plasmáticas de  $E_2$  foram semelhantes entre vacas Holandesas em lactação submetidas ao estresse térmico e vacas em condições de termoneutralidade.

As altas temperaturas perturbam o equilíbrio entre as secreções de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) e prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), o que provavelmente diminui a motilidade do músculo liso do oviduto, importante para o transporte do gameta e do embrião, promovendo redução na fertilidade em bovinos durante o verão (KOBAYASHI et al., 2013).

As concentrações plasmáticas do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) também são afetadas em animais submetidos a situações de estresse térmico. Rhoads et al. (2009) observaram que vacas Holandesas lactantes submetidas a altas temperaturas em câmara climática tiveram redução na concentração plasmática de IGF-I quando comparadas a vacas Holandesas lactantes em condições termoneutras. Similarmente, Shehab-El-Deen et al. (2010) demonstraram que vacas Holandesas no período pós-parto apresentaram menores concentrações plasmáticas de IGF-I durante o verão em relação ao inverno. A diminuição das concentrações plasmáticas foi acompanhada pela redução na expressão hepática do gene IGF-I, que decresceu aproximadamente 25% em vacas Holandesas lactantes estressadas termicamente (RHOADS et al., 2010). Assim, a exposição de vacas produtoras de leite ao estresse térmico *in vivo* reduz os níveis circulantes de IGF-I, o que compromete a reprodução nesses animais (DE RENSIS e SCARAMUZZI, 2003).

#### **4.6.2 Efeitos na fertilidade**

Episódios cumulativos de estresse e de variação aguda das condições climáticas podem comprometer o sucesso da gestação durante os períodos quentes do ano. Segundo Garcia-Spierto et al. (2006), o estresse térmico compromete o sucesso da gestação durante o período peri-implantacional. Quando vacas leiteiras foram submetidas ao exame de ultrassonografia dos dias 1 a 40 de gestação durante o verão e inverno houve forte associação entre as perdas gestacionais com o período de maior temperatura do ano, indicando que os valores de alto índice de temperatura e umidade para o período de 21-30 dias de gestação são um fator de risco para a perda fetal precoce subsequente (GARCIA-SPIERTO et al., 2006).

Em vacas leiteiras de alta produção, a perda gestacional de 6,7% ocorreu quando o ITU foi maior que 85 durante os primeiros meses de gestação (SANTOLARIA et al., 2010). Dados de um estudo retrospectivo demonstraram uma relação negativa entre a taxa de concepção e a temperatura ambiente um dia após a inseminação em vacas e novilhas *Bos taurus taurus*. Vacas lactantes Pardo Suíça, Jersey e Holandesas apresentaram reduzidos índices de concepção durante os meses de estresse térmico (BADINGA et al., 1985). As taxas de concepção diminuíram de 52 para 32% quando a temperatura ambiente aumentou de 24 para 32 °C, e as novilhas apresentaram maior fertilidade que as vacas (BADINGA et al., 1985). No Brasil, a taxa de gestação de vacas Holandesas em lactação reduziu no verão em relação ao período de inverno a (THI: 75,8 e 65,3 no verão e inverno, respectivamente; PIRES et al., 2002)

Em bovinos de corte, o efeito da alta temperatura na reprodução também já foi relatado. Dunlap e Vincent (1971) demonstraram que a taxa de concepção de novilhas Hereford foi de 0% quando expostas a alta temperatura (32,2 °C) por 72 horas em câmara climática em comparação a uma taxa de concepção de 48% quando os animais foram mantidos em uma temperatura controle (21,1 °C), também em câmara climática.

A recuperação pós-parto e o retorno à ciclicidade também são acometidos pelo estresse térmico. Uma das principais causas do anestro pós parto em vacas de alta produção leiteira é o prolongado balanço energético negativo (WATHES et al., 2007) e o agravamento desse balanço durante o verão diminui ainda mais a fertilidade (DE RENSIS e SCARAMUZZI, 2003). Animais inseminados durante os períodos quentes do ano apresentaram redução na ciclicidade e aumento na incidência de ovários inativos e desordens reprodutivas. Al-Katanani et al.(1999) demonstraram que o estresse térmico antes, depois e no dia da inseminação é associado com uma maior taxa de retorno ao cio 90 dias após a inseminação. O clima ameno parece então preservar a fertilidade e reduzir os riscos de alterações reprodutivas (LOPEZ-GATIUS, 2003).

Vacas submetidas ao estresse térmico apresentam redução no fluxo sanguíneo para o útero e aumento da temperatura uterina, o que compromete o ambiente intrauterino, reduzindo a fertilidade (DE RENSIS e SCARAMUZZI, 2003). Essa diminuição do fluxo sanguíneo para o útero ocorre devido à redistribuição de fluxo dos órgãos viscerais para a periferia com a finalidade de reduzir a temperatura corpórea (THATCHER e COLLIER, 1986). O aumento em 0,5 °C na temperatura uterina no dia posterior à inseminação provoca uma queda de 6,9% na taxa de concepção (THATCHER et al., 2010). Roman-Ponce et al. (1978) relataram que houve redução de

128 mL de sangue por minuto em vacas Suíça Marrom que permaneceram na sombra durante o verão para 109 mL em animais estressados termicamente que permaneceram, durante o verão, em local sem sombra.

#### 4.6.3 Efeitos na competência oocitária: estudos *in vivo*

Desordens na fisiologia dos oócitos durante o longo período de desenvolvimento folicular e durante o processo de maturação podem potencialmente levar a uma redução na competência de fertilização e subsequente comprometimento do desenvolvimento embrionário (ROTH, 2008). Os efeitos da temperatura elevada na função oocitária já foram demonstrados em estudos conduzidos *in vivo*.

Um estudo pioneiro realizado por Putney et al. (1989) demonstrou os efeitos deletérios do estresse térmico durante a maturação do oócito. Neste experimento, a exposição de novilhas Holandesas ao estresse térmico de 42 °C em câmara climática por 8 horas, entre o estro e a inseminação, aumentou a incidência de embriões com desenvolvimento retardado e/ou anormais com blastômeros degenerados quando comparados ao grupo controle (temperatura de 20 °C em câmara climática).

Outro estudo *in vivo* também demonstrou que oócitos na fase de vesícula germinativa (VG) coletados de vacas Holandesas durante as estações quentes do ano (abril a setembro, Flórida, Estados Unidos) sofreram declínio na proporção de oócitos e embriões clivados que se desenvolveram até o estágio de blastocistos no dia 8 (D8) após fecundação *in vitro* (FIV) em comparação a oócitos coletados durante períodos de clima frio (outubro a março) (AL-KATANANI et al., 2002). Este efeito negativo do estresse térmico foi ainda mais acentuado em vacas repetidoras de cio (animais subfêrteis sem qualquer alteração anatômica ou infecção, que não emprenham até o terceiro serviço ou após este período; FERREIRA et al., 2011). Neste estudo a taxa de recuperação oocitária foi menor em animais submetidos à OPU no verão ( $6,5 \pm 0,56$ ) em comparação ao inverno ( $15,14 \pm 1,29$ ), assim como a taxa de blastócitos no dia D7 foi menor na estação quente do ano em relação à estação fria. Além disso, a qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* foi comprometida pelo verão (FERREIRA et al., 2011).

Rocha et al. (1998) demonstraram a ação do estresse térmico em oócitos VG das diferentes subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Quando oócitos de vacas Holandesas foram aspirados durante verão e fecundados *in vitro*, houve redução na qualidade e competência oocitária, indicada pelo baixo desenvolvimento embrionário *in*

*vitro* em relação àqueles oócitos aspirados no inverno. Em contraste, não houve efeito sazonal na qualidade e competência de oócitos aspirados de vacas Brahman coletados no verão e inverno (ROCHA et al., 1998).

A exposição de vacas Nelores e Holandesas ao estresse térmico por 28 dias em câmara climática (dias 0 à 14: 37 °C - 70% de umidade relativa (UR) durante o dia e 30 °C - 90% UR durante a noite; dias 14 à 28: 38 °C - 75% UR durante o dia e 30 °C - 90% UR durante a noite) reduziu o número total de complexos cumulus-oócitos (CCOs) recuperados por vaca em relação ao grupo termoneutro (sob sombra, em ambiente aberto e arejado) nos animais da raça Nelore (RISOLIA, 2013). Além disso, a porcentagem de CCOs grau I recuperados de animais sob estresse na câmara climática foi reduzida em relação aos animais em termoneutralidade, independente da raça (RISOLIA, 2013). Já na produção *in vitro* de embriões, o estresse térmico *in vivo* afetou a competência oocitária refletida pela redução na porcentagem de clivagem e blastocistos em ambas as raças (RISOLIA, 2013).

Apesar da tolerância térmica constatada nos animais da subespécie *Bos taurus indicus*, existem evidências de que a temperatura elevada tem efeito deletério e acumulativo sobre a competência oocitária destes animais. Um estudo retrospectivo, utilizando 2.395 sessões de aspiração folicular (OPU) em vacas Nelore, demonstrou que o índice de produção embrionária *in vitro* foi reduzido após os meses quentes do ano (FERRAZ et al., 2005). Da mesma forma, quando vacas da raça Gir foram submetidas à temperatura e umidade elevada controladas em câmara climática por 28 dias (38 °C durante o dia e 30 °C durante a noite, com 80% de UR) houve diminuição na taxa de CCOs recuperados e a produção de blastocistos caiu de 27,2% no grupo controle para 13,3% no grupo estresse térmico durante 119 dias pós-estresse (período compreendido do dia 28 ao dia 147), sugerindo que os efeitos do estresse térmico sejam mais pronunciados na fase folicular pré-antral (TORRES JR et al., 2008).

O efeito acumulativo do estresse térmico já foi também demonstrado em vacas Holandesas. Badinga et al. (1985) demonstraram que o estresse térmico sazonal no oócito se prolonga do verão até o outono subsequente, promovendo redução nos índices de concepção. Esta redução na competência oocitária só é então recuperada 2 a 3 ciclos estrais após o final da estação quente, indicando que o estresse térmico pode ter um efeito deletério em oócitos que iniciaram seu crescimento ainda no período quente (ROTH et al., 2001).

#### 4.6.4 Efeitos na competência oocitária: estudos *in vitro*

Estudos *in vitro* demonstraram a susceptibilidade oocitária aos efeitos diretos da temperatura elevada. Oócitos na fase de VG e também, durante a maturação até o estágio de MII, podem ser afetados pelas altas temperaturas.

Oócitos em VG submetidos ao estresse térmico *in vitro* de 41° C por 12 horas apresentaram redução na proporção de oócitos que progrediram até MII após a MIV, além de ter apresentado redução no desenvolvimento de blastocistos (PAYTON et al., 2004). Lima (2012) constatou que a exposição de oócitos bovinos no estágio de VG ao estresse térmico *in vitro* de 41 °C por 14 horas reduziu a competência de desenvolvimento do oócito, diminuindo as taxas de clivagem e de blastocistos.

A exposição de oócitos bovinos à temperatura severa de 42-43 °C ou à temperatura moderada de 40-41 °C durante a MIV bloqueia ou reduz a competência oocitária e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário. O estresse térmico *in vitro* de 40 e 41 °C durante as primeiras 12 horas da MIV reduziu a taxa de clivagens em oócitos e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto quando comparado aos oócitos maturados a 38,5 °C (ROTH e HANSEN, 2004a). Ju et al. (2005) submeteram oócitos de vacas de corte e leite a uma temperatura de estresse térmico *in vitro* de 42 °C durante as horas finais da maturação por 0 (controle), uma, duas ou quatro horas. A porcentagem de formação de blastocisto foi menor no grupo 4 horas em comparação ao grupo controle (JU et al., 2005). Em outro estudo, esse mesmo grupo de autores submeteu oócitos bovinos a um estresse térmico severo de 43 °C por 45 ou 60 minutos durante a MIV, o que resultou numa redução significativa da competência de desenvolvimento oocitária, diminuindo a taxa de formação de blastocistos (JU et al., 1999). Oócitos em MII submetidos ao estresse térmico *in vitro* durante a fertilização também apresentam reduzida produção de blastocistos. Rivera e Hansen (2001) submeteram oócitos a temperaturas de 38,5, 40 e 41 °C por 8 horas durante a fertilização. A fertilização dos oócitos a 41 °C reduziu a taxa de clivagem e a porcentagem de oócitos que se tornaram blastocistos quando comparados a fertilização nas temperaturas de 38,5 e 40 °C.

Block et al. (2002) demonstraram que a contribuição do oócito é mais importante para a resistência genética embrionária ao estresse térmico do que a contribuição do espermatozoide. Para isso, oócitos de vacas Brahman e de vacas Holandesas foram fecundados *in vitro* com sêmen de touros Angus. Quando em estágio

de 9 ou mais células, os embriões produzidos foram submetidos ao estresse térmico *in vitro* de 41 °C por 6 horas. Neste estudo, a taxa de produção de blastocistos indicou que embriões originados de oócitos Brahman foram mais resistentes ao estresse térmico do que embriões produzidos a partir de oócitos de vacas Holandesas (Block et al., 2002). No entanto, quando oócitos vacas Holandesas foram fecundados *in vitro* com sêmen de Angus ou Brahman e os embriões submetidos às mesmas condições de estresse térmico, a redução no desenvolvimento a blastocisto foi similar para embriões fecundados com espermatozoides das duas raças (Block et al., 2002). Ainda nesse trabalho, embriões de 9 células ou mais de vacas Holandesas, oriundos da fertilização com sêmen de Angus ou Brahman, submetidos às mesmas condições de estresse térmico, apresentaram semelhante redução no desenvolvimento em blastocisto (Block et al., 2002). Similarmente, Satrapa et al. (2011) verificaram que o estresse térmico (41,0 °C durante 12 h, 96 horas pós inseminação - hpi) diminuiu igualmente o desenvolvimento de embriões bovinos até o estágio de blastocisto produzidos a partir de oócitos da raça Holandesa fertilizados com sêmen de touros da raça Gir (*Bos taurus indicus*) ou com sêmen de touros da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*).

Fatores de crescimento, hormônios e diversos antioxidantes são utilizados com a finalidade de minimizar os efeitos negativos do estresse térmico em oócitos. Já foi observado que o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) apresenta efeitos termoprotetores em oócitos e embriões bovinos. A família dos IGFs é formada por dois ligantes, IGF-I e IGF-II, que desempenham importante papel na maturação oocitária (ITOH et al., 2002; SIROTKIN et al., 2000). Satrapa et al. (2013) demonstraram que oócitos de vacas Nelore apresentam uma maior biodisponibilidade do IGF em comparação a oócitos de vacas Holandesas.

Adicionado ao meio de maturação, o IGF-I apresenta um efeito termoprotetor em oócitos bovinos submetidos ao estresse térmico, melhorando a qualidade e competência oocitárias (LIMA, 2012; ISPADA et al., 2010 e 2011; RODRIGUES, 2013). A adição de 100 ng/ml de IGF-I ao meio de maturação tornou a maturação nuclear mais rápida em oócitos bovinos (LORENZO et al., 1994; SAKAGUCHI et al., 2002).

Por serem considerados antioxidantes e poderosos captadores de radicais livres (ADRIAENS et al., 2006; KANG et al., 2009), a melatonina e seus metabólitos apresentam um efeito multifatorial nos animais, modulando a reprodução (REITER, 1991), a gestação e o parto (TAMURA et al., 2008a,b). Cebrian-Serrano et al. (2013)

constatarem que  $10^{-4}$ M de melatonina adicionada ao meio de maturação atenuou os efeitos nocivos do estresse oxidativo e dos altos níveis de EROs em oócitos causados pelo estresse térmico de 41,5 °C durante a MIV quando comparado ao grupo controle (MIV a 38,5 °C).

O emprego da melatonina em bovinos *in vivo* também já foi relatado. Seu uso sob a forma de implante subcutâneo (concentração de 216 mg) durante a estação quente do ano também demonstrou eficácia em melhorar o desempenho reprodutivo bovino (GARCIA-ISPIERTO et al., 2013). A sua utilização diminuiu a síndrome de repetição de cio e as perdas gestacionais de vacas em lactação, sendo 0,36 e 0,19 vezes menores, respectivamente, em relação aos animais não tratados com melatonina (GARCIA-ISPIERTO et al., 2013).

Outros agentes antioxidantes já foram utilizados em estudos para reverter os efeitos deletérios do estresse térmico. O retinol (ou vitamina A) e seus metabólitos são reguladores do crescimento celular, da diferenciação de muitos tipos de células (HIDALGO et al., 2005) e possuem atividade captadora de EROs (IKEDA et al., 2005). Devido a essa atividade antioxidante, Maya-Soriano et al. (2012) utilizaram o retinol (1,43 µg/ml) no meio de maturação e demonstraram seu papel protetor na maturação nuclear de oócitos sob estresse térmico *in vitro* de 41,5 °C. Quando adicionado ao meio, os oócitos estressados termicamente mostraram uma alta porcentagem de maturação nuclear correta (alcançaram o estágio de MII) em relação aos oócitos estressados termicamente sem retinol no meio de maturação. Lawrence et al. (2004) demonstraram que o retinol adicionado ao meio de MIV melhorou a competência de oócitos comprometidos pelo estresse térmico. O desenvolvimento embrionário de oócitos maturados a 41 °C (nas primeiras 12 horas de MIV), com 5 µM de retinol foi semelhante àqueles maturados a 38 °C com ou sem retinol adicionado ao meio de MIV (LAWRENCE et al., 2004).

#### **4.6.5 Alterações celulares na maturação oocitária *in vitro***

A diminuição da função do oócito induzida pelo estresse térmico ocorre devido a uma série de alterações celulares que afetam os compartimentos citoplasmáticos e nucleares dos oócitos bovinos (PAULA-LOPES et al., 2012).

Entre as alterações citoplasmáticas induzidas pelas altas temperaturas está a redução na síntese protéica. A exposição de oócitos a temperatura de 41 °C durante as



12 primeiras horas da MIV diminui a quantidade de HSP70 (proteína do estresse térmico) e das proteínas intracelulares totais sintetizadas pelo gameta (EDWARD e HANSEN, 1997). Além disso, ocorre uma maior porcentagem de redução na síntese de proteínas em oócitos desnudados quando comparados àqueles com cumulus intacto, ambos submetidos às temperaturas de 41 e 42 °C durante a MIV (EDWARD e HANSEN, 1996; EDWARD e HANSEN, 1997). É possível que as células do cumulus transfiram elementos como aminoácidos e/ou precursores de antioxidantes para o oócito através das junções *gap*, promovendo assim um efeito termoprotetor sobre essa célula (EDWARD e HANSEN, 1997).

Os elementos do citoesqueleto, microtúbulos e microfilamentos, tem suas estruturas e organizações alteradas pelas altas temperaturas. Estas alterações comprometem o transporte e distribuição de organelas citoplasmáticas, bem como a separação dos cromossomos durante a fertilização e clivagem (TSENG et al., 2004; JU et al., 2005).

Oócitos submetidos ao estresse térmico de 41 °C nas 12 primeiras horas de MIV, se mantiveram em MI, exibiram fusos anormais, com formas arredondadas, além de alguns cromossomos desalinhados, desorganizados e amorfos (ROTH e HANSEN, 2005). O mesmo aconteceu aos fusos meióticos de oócitos submetidos ao estresse de 41,5 °C durante as primeiras 4 horas de MIV que alcançaram o estágio de MII (TSENG et al., 2004). Além disso, esses oócitos apresentaram ausência completa ou grande condensação da cromatina (TSENG et al., 2004).

Mudanças na morfologia e tamanho do fuso meiótico indicam que o estresse térmico afeta a polimerização e despolimerização dos microtúbulos. As alterações nos microtúbulos do fuso provavelmente contribuem para segregação incorreta dos cromossomos durante a fertilização e clivagem embrionária (TSENG et al., 2004; JU et al., 2005). O estresse térmico de 41 °C por 14 horas durante a MIV em oócitos bovinos alterou a organização dos microtúbulos na placa metafásica e reduziu a organização dos filamentos de actina na região cortical do oócito (RODRIGUES, 2013). O anel de actina pericelular e o processo trans-zonal da actina foram diminuídos em oócitos maturados *in vitro* a 41°C (ROTH e HANSEN, 2005) e a 41,5 °C (TSENG et al., 2004), e também apresentaram uma conformação mais dispersa no citoplasma (TSENG et al., 2004; ROTH e HANSEN, 2005).

As alterações no citoesqueleto induzidas pelo estresse térmico também comprometem a translocação dos grânulos corticais para a região abaixo da membrana

plasmática do oócito durante a maturação (WESSEL et al., 2002). O estresse durante o período final de maturação (41,5 °C no período de 18 a 21 h da MIV) de oócitos bovinos resultou na perda da camada contínua dos grânulos corticais (ANDREU-VÁZQUEZ et al., 2010; MAYA-SORIANO, 2013). A exposição de oócitos a um estresse térmico de 41°C por 12 ou 24 horas aumentou a quantidade de oócitos que apresentavam grânulos corticais dispersos em monocamadas na região cortical do oócito sugerindo que a alta temperatura durante a MIV tenha acelerado a maturação citoplasmática (EDWARDS et al., 2005). Em oócitos de camundongos a porcentagem de oócitos com migração incompleta dos grânulos corticais após a MIV foi significativamente maior em oócitos maturados a 40°C do que a 37°C (WANG et al., 2009b).

O estresse térmico durante a MIV causa um aumento da produção de EROs que desencadeiam a transição da permeabilidade mitocondrial (TPM) e subsequente apoptose (WANG et al., 2009b), além do bloqueio da síntese de ATP (THOUAS et al., 2006). A exposição de oócitos bovinos a temperaturas de estresse térmico durante a MIV reduziu a atividade mitocondrial e aumentou as concentrações de EROs intracelulares e a proporção de oócitos TUNEL-positivos (ISPADA et al., 2011; NABENISHI et al., 2012).

Há evidências de que o citoplasma oocitário é mais susceptível aos efeitos adversos das temperaturas elevadas do que o núcleo (SHEN et al., 2010). Estudos de transferência nuclear em oócitos *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* indicaram que a exposição do núcleo da célula doadora ao estresse térmico não afetou o desenvolvimento embrionário em *Bos taurus indicus* e nem em *Bos taurus taurus*. No entanto, exposição do ooplasma receptor ao estresse térmico diminuiu capacidade de desenvolvimento de oócitos *Bos taurus taurus*, indicando uma maior sensibilidade dessa subespécie a alta temperatura (SHEN et al., 2010).

Estudos *in vitro* demonstraram a susceptibilidade nuclear oocitária aos efeitos diretos da temperatura elevada. Oócitos maturados a 41 °C apresentaram menor proporção de progressão para MII depois da MIV, ficando bloqueados em MI (LENZ et al., 1983; ROTH e HANSEN, 2005; PAULA-LOPES et al., 2008). Somado a essas alterações na progressão meiótica está a fragmentação do DNA, característica de apoptose. A apoptose induzida pelo estresse térmico tem sido bem documentada em oócitos bovinos expostos a elevadas temperaturas durante a maturação. A exposição de oócitos ao estresse térmico durante a MIV aumentou a proporção de oócitos com alta

atividade enzimática das caspases do Grupo II (por exemplo, caspases 2, 3, e 7) e as reações TUNEL-positivas (ROTH; e HANSEN, 2004a,b; ISPADA et al., 2011).

#### 4.6.6 Alterações moleculares transcricionais no oócito

O estresse térmico desencadeia um programa complexo de expressão gênica e de respostas bioquímicas adaptativas em vários tipos celulares nos mamíferos (OHNISHI et al., 1996; DIAMOND et al., 1999; SONNA et al., 2002). Entretanto, as alterações na transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento do oócito e do embrião bovino, induzidas pela temperatura elevada, não estão bem esclarecidas e vem sendo estudadas nesses últimos anos.

Não existem muitas informações disponíveis na literatura sobre alterações da expressão gênica induzidas pelo estresse térmico durante a maturação oocitária. Os trabalhos enfatizam os efeitos moleculares do estresse térmico no período em que o RNA está sendo transcrito e acumulado (estádio de VG). Camargo et al. (2007) analisaram a abundância na expressão do gene *HSP70* (*heat shock protein 70*: indicador de estresse em mamíferos) em oócitos imaturos de vacas da raça Gir e da raça Holandesa durante o verão no Brasil. Oócitos de vacas Holandesas apresentaram maiores níveis de expressão de *HSP70* do que oócitos de vacas Gir, sugerindo que estes oócitos de Holandesas estavam sob maior estresse do que os da outra raça (CAMARGO et al., 2007). Em outro estudo, oócitos de vacas Holandesas coletados durante o verão em Israel (estresse térmico *in vivo*) tiveram menores níveis de RNAm de genes relacionados a maturação meiótica (*MOS* - Moloney sarcoma oncogene), crescimento e diferenciação celular, (*GDF9* - fator de crescimento diferencial 9) e desenvolvimento embrionário (*POU5F1* - Classe 5 de domínio POU fator de transcrição 1; *GAPDH* - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) após a MIV quando comparados aos oócitos coletados no inverno, indicando um efeito deletério das altas temperaturas na competência oocitária a nível molecular (GENDELMAN e ROTH, 2012a). O mesmo resultado também foi observado *in vitro*, em oócitos bloqueados em VG submetidos ao estresse de 41,2 °C durante 16 horas (GENDELMAN e ROTH, 2012b).

Além disso, as alterações de expressão gênica induzidas pelo estresse térmico *in vitro* durante a maturação oocitária afetam os embriões produzidos após a fertilização. Um estudo demonstrou que oócitos submetidos ao estresse térmico durante a MIV não apresentaram alterações na abundância de transcritos relacionados ao crescimento e

diferenciação celular e à poliadenilação (*GDF9*; *BMP15* – proteína morfogenética óssea 15; *CCNBI* – ciclina B1; e *PAP* – polimerase poli(A)) quando comparados aos oócitos não estressados (PAYTON et al., 2011). Em contrapartida, os blastocistos originados desses oócitos demonstraram menor abundância relativa dos mesmos transcritos quando comparados a blastocistos produzidos a partir de oócitos não estressados (PAYTON et al., 2011). Essas diferenças moleculares em embriões oriundos de oócitos estressados evidenciam a importância de minimizar a exposição ao estresse térmico durante a maturação meiótica, a fim de obter embriões competentes no seu desenvolvimento (PAYTON et al., 2011).

As alterações induzidas pelas altas temperaturas em oócitos podem também ser influenciadas pelas células do cumulus, que estão intimamente associadas ao oócito e, diferente dele, são transcricionalmente ativas durante a maturação (REGASSA et al., 2011). Essas células são essenciais para a progressão da MII e para a aquisição da competência embrionária (ZHANG et al., 1995, GESHI et al., 2000) e quando expostas ao estresse térmico prejudicam o desenvolvimento do oócito (YUAN et al., 2008; QIAO et al., 2008). Uma análise de microarray demonstrou que a exposição de CCOs ao estresse térmico durante as primeiras 12 horas de MIV reduziu a abundância de transcritos do *MMP9* (metalopectidase da matrix 9) e aumentou a abundância de transcritos *IHH* (Indian hedgehog) em células do cumulus de bovinos em relação aos maturados em termoneutralidade (RISPOLI et al., 2013). O gene *MMP9* está associado com a competência de desenvolvimento do oócito e, assim, é aceitável propor que algumas consequências negativas de estresse térmico no CCOs devem ser mediadas através de perturbações que ocorram nas células do cumulus circundante (RISPOLI et al., 2013). Em oócitos murinos, a sinalização aumentada do Hedgehog resultou em uma expansão desorganizada das células do cumulus (REN et al., 2009).

Referências

Bibliográficas

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYGUNAWARDENA, H.; DEMATAWEWA, C.M.B. Pré-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 373-387, 2004.

ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72-80, 2008.

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 49-65, 2008.

ADRIAENS, I.; JACQUET, P.; CORTVRINDT, R.; JANSSEN, K.; SMITZ, J. Melatonin has dose dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, v. 228, p. 333-343, 2006.

AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 171-179, 2008.

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

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

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, p. 647-653, 2001.

ALVES, N.G.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; SILVA, M.R.; ZAMPERLINI, B.; COSTA, F.M.J.; SANTOS, A.D.F.; NETO, T.M. Atividade ovariana em fêmeas bovinas da raça Holandesa e mestiças Holandês X Zebu durante dois ciclos estrais normais consecutivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.627-634, 2002.

ANDREU-VAZQUEZ, C.; LOPEZ-GATIUS, F.; GARCIA-ISPIERTO, I.; MAYA-SORIANO, M.J.; HUNTER, R.H.; LOPEZ-BEJAR, M. Does heat stress provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation? **Zygote**, v. 18, p. 293-299, 2010.

ARAÚJO, C.H.M.; ARAÚJO, M.C.P.M.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.A.; REIS, R.M. Gametogênese: estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. **Medicina**, v. 40, p. 551-558, 2007.

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

ASSIS, R.E.F. Evolução da espécie *Bos taurus* e formação das Raças Zebuínas (*Bos taurus indicus*) com ênfase na Raça Nelore. Uberaba: Brasil. Faculdades Associadas de Uberaba-FAZU. **Monografia** 2007.

AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. Germ cells and fertilization: reproduction in mammals: **Ed. Cambridge: New York**, 1. 2 ed., 177 p, 1982.

AZEVEDO, D.M.M.R.; ALVES, A.A. Bioclimatologia Aplicada à Produção de Bovinos Leiteiros nos Trópicos, Embrapa Meio-Norte, **Teresina, PI**. 83p, 2009.

BACCARI JR, F. Manejo ambiental para produção de leite em climas quentes. In: Congresso Brasileiro de Biometeorologia. **Goiânia, GO**. Universidade Católica de Goiás. Anais, v. 2, p. 136-161, 1998.

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

BADINGA, L.; COLLIER, R.J.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 78-85, 1985.

BAETA, F.C.; SOUZA, C.F. Ambiência em edificações rurais: conforto animal. **Viçosa: Editora UFV**, 246 p, 1997.

BALDRIGHI, J.M. Estudo temporal da dinâmica folicular e parâmetros endócrinos de novilhas taurinas, zebuínas e bubalinas mantidas sob o mesmo manejo nutricional. Pirassununga, Brasil. USP. **Tese** 2013.

BARNES, F.L.; FIRST, N.L. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 29, p. 117-123, 1991.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 205-211, 2007.

BEATTY, D.T.; BARNES, A.; TAYLOR, E.; MALONEY, S.K. Do changes in feed intake or ambient temperature cause changes in cattle rumen temperature relative to core temperature? **Journal of Thermal Biology**, v. 33, p. 12-19, 2008.

BEED, D.K.; COLLIER, R.J. Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. **Journal of Animal Science**, v. 62, p543-554, 1986.

BELL, C.E.; CALDER, M.D.; WATSON, A.J. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, p. 691-701, 2008.

BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; BAUMGARD, L.H.; RHOADS, R.P.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v. 4, p. 1167-1183, 2010.

BLACKSHAW, J.K.; BLACKSHAW, A.W. Heat stress in cattle and the effect of shade on production and behavior: a review. **Australian Journal of experimental Agriculture**, v. 34, p. 285-295, 1994.

BLOCK, J.; CHASE, C.C.JR.; HANSEN, P.J. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of maternal versus paternal contribution. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 32-37, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. AGE – Assessoria de Gestão Estratégica. **Projeções do Agronegócio-Brasil 2012/2013 a 2022/2023**. Brasília. 96 p. 2013.

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

BUTLER, S.T.; MARR, A.L.; PELTON, S.H.; RADCLIFF, R.P.; LUCY, M.C.; BUTLER, W.R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **Journal of Endocrinology**, v. 176, p. 205-217, 2003.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; SERAPIÃO, R.V.; DE SA, W.F.; FERREIRA, A.M.; GUIMARÃES, M.F.M.; DO VALE FILHO, V.R. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, p. 626–632, 2007.

CANIPARI, R.; PALOMBI, F.; RIMINUCCI, M.; MANGIA, F. Early programming of maturation competence in mouse oogenesis. *Developmental Biology*, v.102, p. 519-524. 1984.

CARVALHO, F.A.; LAMMOGLIA, M.A.; SIMOES, M. J.; RANDEL, R. D. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3570 – 3573, 1995.

CEBRIAN-SERRANO, A.; SALVADOR, I.; RAGA, E.; DINNYES, A.; SILVESTRE, M.A. Beneficial effect of melatonin on blastocyst in vitro production from heat-stressed bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 48, p. 738-746, 2013.

CHA, K.Y.; CHIAN, R.C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction Update**, v. 4, p.103-120, 1998.

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistema de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 37-49, 2010.

CHIAN, R.C.; SIRARD, M.A. Effects of cumulus cells and follicle-stimulating hormone during in vitro maturation on parthenogenetic activation of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 425–431, 1995.

CONTI, M.; ANDERSEN, C.B.; RICHARD, F.J.; SHITSUKAWA, K.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 9–14, 1998.



CRUZ, L.V.; ANGRIMANI, D.S.R.; RUI, B.R.; SILVA, M.A. Efeitos do estresse térmico na produção leiteira: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, 1-18, 2011.

CUMMINS, J.M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **European Journal of Obstetrics e Gynecology and Reproduction in Domestic Animals**, v. 115, p. 23-29, 2004.

CURTIS, S. E. Environment management in animal agriculture. **Illinois: Animal Environment Services**, p. 97-122, 1981.

DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. **Theriogenology**, v. 60, p. 1139–1151, 2003.

DE SOUSA, P.A.; CAVENEY, A.; WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, v. 49, p.115-128, 1998.

DIAMOND, D.A.; PARSIAN, A.; HUNT, C.R.; LOFGREN, S.; SPITZ, D.R.; GOSWAMI, P.C.; GIUS, D. Redox factor-1 (Ref-1) mediates the activation of AP-1 in HeLa and NIH 3T3 cells in response to heat shock. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 16959-16964, 1999.

DIKMEN, S.; ALAVA, E.; PONTES, E.; FEAR, J.M.; DIKMEN, B.Y.; OLSON, T.A.; HANSEN, P.J. Differences in thermoregulatory ability between slick-haired and wild-type lactating Holstein cows in response to acute heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 91, 3395-3402, 2008.

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

DIKMEN, S.; COLE, J.B.; NULL, D.J.; HANSEN, P.J. Genome-wide association mapping for identification of quantitative trait loci for rectal temperature during heatstress in Holstein cattle. **Plos One**, v. 8, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0069202

DU PREEZ, J.H. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. **Journal of Veterinary Research**, v.67, p. 263-271, 2000.

DUCIBELLA, T.; BUETOW, J. Competence to undergo normal, fertilization-induced cortical activation develops after metaphase I of meiosis in mouse oocytes. **Developmental Biology**, v. 165, p. 95–104, 1994.

DUNLAP, S.E.; VINCENT C.K. Influence of postbreeding thermal stress on conception rate in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 32, p. 1216-1218, 1971.

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

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 340-346, 1996.

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

EDWARDS, J.L.; SAXTON, A.M.; LAWRENCE, J.L.; PAYTON, R.R.; DUNLAP, J.R. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens *in vitro* maturation in bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 4326-4333, 2005.

ERICKSON, B.H. Developmental and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 10, p. 97-105, 1966.

EVANS, A.C.O; FORDE, N.; O’GORMAN, G.M.; ZIELAK, A.E.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Use of microarray technology to profile gene expression patterns important for reproduction in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 359-367, 2008.

EYERS, P.A.; LIU, J.; HAYASHI, N.R.; LEWELLYN, A.L.; GAUTIER, J.; MALLER, J.L. Regulation of the G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP dependent protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 24339- 24346, 2005.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine Oocyte Diameter in Relation to Maturational Competence and Transcriptional Activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p.437-442, 1995.

FAIR, T.; HITTEL, P.; GREVE, T.; Boland, M. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 503-512, 1996.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203-216, 2003.

FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations. **Statistics**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em 15 dezembro 2013.

FAROOQ, U.; SAMAD, H.A.; SHEHZAD, F.; QAYYUM, A. Physiological responses of cattle to heat stress. **World Applied Sciences Journal**, v. 8, p. 38-43, 2010.

FERRAZ, M.L.; WATANABE, Y.F.; SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L.; BARUSELLI, P.S. Influência dos meses do ano no número, na qualidade oocitária e na produção *in vitro* de embriões em vacas Nelore (*Bos indicus*). **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, Goiânia-GO. CBRA, v. 16, p. 1-1, 2005

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M.R.; FERRAZ, M.L.; ARAÚJO, A.B.; RODRIGUES, C.A.; WATANABE, Y.F.; VIREQUE, A.A.; JOAQUIM, D.C.; SMITH, L.C.; MEIRELLES, F.V.; BARUSELLI, P.S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2383-2392, 2011.

FINCH, V.A.; BENNETT, I.L.; HOLMES, C.R. Coat colour in cattle: effect on thermal balance, behaviour and growth, and relationship with coat type. **Journal Agricultural Science**, v. 102, p. 141-147, 1984.

FUKUI, Y.; SAKUMA, Y. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 669-673, 1980.

GAMBINI, A.L.G.; MOREIRA, M.B.P.; CASTILHO, C.; BARROS, C.M. Follicular development and synchronization of ovulation in Gir cows. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, p. 201-210, 1998.

GANDOLFI, B.T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p. 1255-1276, 2001.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J.L.; NOGAREDA, C.; LOPEZ-BEJAR, M.; DE RENSIS, F. Relationship between heat stress during the periimplantation period and early fetal loss in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 799-807, 2006.

GARCIA-ISPIERTO, I.; ABDELFATAH, A.; LOPEZ-GATIUS, F. Melatonin treatment at dry-off improves reproductive performance postpartum in high-producing dairy cows under heat stress conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 577-583, 2013.

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

GAUGHAN, J.B.; BONNER, S.; LOXTON, I.; MADER T.L.; LISLE A.; LAWRENCE, R. Effect of shade on body temperature and performance of feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 4056-4067, 2010.

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

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. In vivo vs. in vitro models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. **Animal Reproduction Science**, v. 134, p. 125-134, 2012b.

GESHI, M.; TAKENOUCHE, N.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1730-1734, 2000.

GILBERT, I.; SCANTLAND, S.; SYLVESTRE, E.; GRAVEL, C.; LAFLAMME, I.; SIRARD, M.; ROBERT, C. The dynamics of gene products fluctuation during bovine pre-hatching development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, p. 762-772, 2009.

GINTHER, O.J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. **Cambridge University Press**, v. 30, p. 30-142, 1994.

GWAZDAUSKAS, F.C.; THATCHER, W.W.; KIDDY, C.A.; PAAPE, M.J.; WILCOX, C.J. Hormonal pattern during heat stress following than salt induced luteal regression in heifers. **Theriogenology**, v. 16, p. 271–285, 1981.

HAGHIGHAT, N.; VAN WINKLE, L.J. Developmental change in follicular cell enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. **Journal of Experimental Zoology**, v. 253, p. 71–82, 1990.

HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; CHASE JR. C.C.; BOWERS, E.J.; RANDEL, R.D.; MURPHY, C.N.; VOGT, D.W.; TEWOLDE, A. 1996. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 295–303, 1996.

HANSEN, P.J.; ARÉCHIGA, C.F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 36-50, 1999.

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

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 349-360, 2004.

HANSEN, P.J. Managing the Heat-Stressed Cow to Improve Reproduction. **Proceedings of the 7 th Western Dairy Management Conference**. Reno, NV. Anais, p. 63-76, 2005.

HANSEN, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions Royal Society**, v. 364, p. 3341-3350, 2009.

HAPER, M.J.K. Gamete and zygote transport. IN: KNOBIL, E.; NEILL, D.J. The physiology of reproduction, v.1, 2 ed. **Ed. Raven Press: New York**, p. 123-187, 1994.

HIDALGO, C.; DIEZ, C.; DUQUE, P.; PRENDES, J.M.; RODRIGUEZ, A.; GOYACHE, F.; FRENÁNDEZ, I.; FACAL,N.; IKEDA, S.; ALONSO-MONTES, C.; GÓMEZ, E. Oocytes recovered from cows treated with retinol become unviable as blastocysts produced in vitro. **Reproduction**, v. 129, p. 411–21, 2005.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p. 371–376, 1997.

HUTCHINSON, J.C.D.; BROWN, G.D. Penetrance of cattle coats by radiation. **Journal of Applied Physiology**, v.26, p. 454–464, 1969.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, p. 645-656, 1986.

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

INOUE, M.; SATO, E.F.; NISHIKAWA, M.; HIRAMOTO, K.; KASHIWAGI, A.; UTSUMI, K. Free radical theory of apoptosis and metamorphosis. **Redox Report**, v. 9, p. 237–247, 2004.

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology of Reproduction**, v. 67, p.1099-105, 2002.

IKEDA, S.; KITAGAWA, M.; IMAI, H.; YAMADA, M. The roles of vitamin A for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, p. 23–35, 2005.

ISPADA, J.; LIMA R.S.; RISOLIA, P.H.B.; ANDRADE, E.S.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A.; PAULA-LOPES, F.F. The role of insulin-like growth factor-1 on inhibition of heat-induced apoptosis in bovine oocytes. **Animal Reproduction**, v. 7, p. 333, 2010 (resumo).

ISPADA, J.; LIMA R.S.; RISOLIA, P.H.B.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A.; PAULA-LOPES, F.F. Insulin-like growth factor-1 exerts a thermoprotective role on mitochondrial function of bovine oocytes exposed to heat-shock. **Reproduction Fertility and Development**, v. 24, p. 209, 2011 (resumo).

JONES, G.M.; STALLINGS, C.C. Reducing heat stress for dairy cattle. **Virginia Cooperative Extension Publication**, v. 404-200. 1999.

JU, J.C.; PARKS, J.E.; YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 336-340, 1999.

JU, J.C.; JIANG, S.; TSENG, J.K.; PARKS, J.E.; YANG, X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 64, p. 1677-1689, 2005.

KANG, J.T.; KOO, O.J.; KWON, D.K.; PARK, H.J.; JANG, G.; KANG, S.K.; LEE, B. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. **Journal of Pineal Research**, v. 46, p. 22–28, 2009.

KIM, N.H.; CHO, S.K.; CHOI, S.H.; KIM, E.Y.; PARK, S.; PILL LIM, J.H. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes in vitro maturation. **Zygote**, v. 8, p. 25-32, 2000.

KOBAYASHI, Y.; WAKAMIYA, K.; KOHKA, M.; YAMAMOTO, Y.; OKUDA, K. Summer heat stress affects prostaglandins synthesis in the bovine oviduct. **Reproduction**, v. 146, p. 103-110, 2013.

LAWRENCE, J.L.; PAYTON, R.R.; GODKIN, J.D.; SAXTON, A.M.; SCHRICK, F.N.; EDWARDS, J.L. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2449-2454, 2004.

LENZ, R.W.; BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L.; AX, R.L.; FIRST, N.L. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 173-179, 1983.

LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influences of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v. 63, p. 841-859, 2005.

LI, L.; ZHENG, P.; DEAN, J. Maternal control of early mouse development. **Development**, v. 137, p. 859-870, 2010.

LIMA, R.S. O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa. Botucatu, Brasil: UNESP. **Tese** 2012.

LINNAEUS, C. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus differentiis, synonymis, locis. 1ª ed. 10 p, 1735.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production in vitro following inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.355-365, 1997.

LOPEZ-GATIUS, F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. **Theriogenology**, v. 60, p. 89-99, 2003.

LORENZO, P.L.; ILLERA, M.J.; ILLERA J.C.; ILLERA, M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 697-701, 1994.

LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, JR.; BÃO, S.N. Zebu (*Bos taurus indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 15, p. 1467-1483, 2002.

MACHADO, P.F. Efeitos da alta temperatura sobre a produção, reprodução e sanidade de bovinos leiteiros. **Simpósio Brasileiro de Ambiente na Produção de Leite**, Piracicaba: FEALQ. Anais, p. 179-188, 1998.

MADER, T.L.; HOLT, S.M.; HAHN, G.L.; DAVIS, M.S.; SPIERS, D.E. Feeding strategies for managing heat load in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2373-2382, 2002.

MADER, T.L.; DAVIS, M.S. Effect of management strategies on reducing heat stress of feedlot cattle: feed and water intake. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3077-3087, 2004.

MALAYER, JR.; HANSEN, P.J.; BUHI, W.C. Effect of day of the oestrous cycle, side of the reproductive tract and heat shock on *in vitro* protein secretion by bovine endometrium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 567-578, 1988.

MAYA-SORIANO, M.J.; TABERNER, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Retinol improves *in vitro* oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. **Zygote**, v. 11, p. 1-8, 2012.

MAYA-SORIANO, M.J.; LÓPEZ-GATIUS, F.; ANDREU-VÁZQUEZ, C.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. **Theriogenology**, v. 79, p. 299-305, 2013.

MCDOWELL, R.E.; HOOVEN, N.W.; CAMOENS, J.K. Effects of climate on performance of Holsteins in first lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 965-973, 1976.

MEDEIROS, L.F.D.; VIEIRA, D.H. Bioclimatologia Animal. Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **Seropédica, RJ**. 126p. 1997.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p.183-188, 2001.

MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K.; GARCIA, S.M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 13-20, 2004.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 89-95, 2000.

MINAMI, N.; SUZUKI, T.; TSUKAMOTO, S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 707-715, 2007.

MINGOTI, G.Z.; GARCIA J.M.; ROSA e SILVA, A.A.M. The effect of serum on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes cocultured with granulosa cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 2, p. 213-217, 1995.

MOTA, L.S. Adaptação e interação genótipo-ambiente em vacas leiteiras. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. **Tese** 1997.

MULLER, P.B. Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos. 2. ed. **Porto Alegre: Sulina**, 158 p, 1982.

NÃÃS, I. A. Princípios de conforto térmico na produção animal. **São Paulo: Ícone**, 183 p, 1989.

NABENISHI, H.; TAKAGI, S.; KAMATA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZAWA, K.; TSUZUKI, Y. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporine A. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, p. 31-41, 2012.

NAGANO, M.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S. *In vitro* fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters, **Journal of Veterinary Medical Science**, v.61, p.531-535, 1999.

NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; RANIERI, M.S.; BERNABUCCI, U. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, v. 130, p. 57-69, 2010.

NOGUEIRA, G.P. Puberty in south american *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 361-372, 2004.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide to Environmental Research on Animals. **Washington, DC: Natl. Acad. Sci.** 1971. 366p.

OH, B.; HWANG, S.Y.; SOLTER, D.; KNOWLES, B.B. Spindlin, a major maternal transcript expressed in the mouse during the transition from oocyte to embryo. **Development**, v. 124, p. 493-503, 1997.

OHNISHI, T.; WANG, X.; OHNISHI, K.; MATSUMOTO, H.; TAKAHASHI, A. p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 14510-14513, 1996.

OLSON, T.A.; LUCENA, C.; CHASE, C.C.JR.; HAMMOND, A.C. Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 80-90, 2003.

PASCHAL, J.C.; SANDERS, J.O.; KERR, J.L. Calving and weaning characteristics of Angus-, Gray Brahman-, Gir-, Indu- Brazil-, Nellore-, and Red Brahman-sired F1 calves. **Journal of Animal Science**, v.69, p.2395-2402, 1991.

PAULA-LOPES, F. F.; MILAZZOTTO, M.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; VISINTIN, J. A. Heat shock-induced damage in bovine oocytes. In: International Congress on Animal Reproduction, Budapest. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlin: Wiley-Blackwell, v. 43, p. 208, 2008.

PAULA-LOPES, F.F.; LIMA, R.S.; RISOLIA, P.H.B.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 395-403, 2012.

PAYTON, R.R.; ROMAR, R.; COY, P.; SEXTON, A.M.; LAWRENCE, J.L.; EDWARDS, J. L. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1303-1308, 2004.

PAYTON, R.R.; RISPOLI, L.A.; SAXTON, A.M.; EDWARDS, J.L. Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA population. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, p. 481-491, 2011.



PENNINGTON, J.A.; ALBRIGHT, J.L.; DIEKMAN, M.A.; CALLAHAN, C.J. Sexual activity of Holstein cows: seasonal effects. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 3023–3030, 1985.

PEPLING, M.E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. **Genesis**, v. 44, p. 622–632, 2006.

PEREIRA, A.M.; BACCARI, J.R. F.; TITTO, E.A.; ALMEIDA, J.A. Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. **International Journal Biometeorology**, v. 52, p. 199–208, 2008.

PICCIONI, F.; ZAPPAVIGNA, V.; VERROTTI, A.C. Translational regulation during oogenesis and early development: the cap-poly (A) tail relationship. **Comptes Rendus Biologies**, v. 328, p. 863–881, 2005.

PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEREDO, R.A.; VALLE, E.R.; ENCARNAÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 $\alpha$  or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, p. 667–681, 1998.

PIRES, M.F.A.; FERREIRA, A.M.; SATURNINO, H.M.; TEODORO, R.L. Taxa de gestação em fêmeas da raça Holandesa confinadas em *free stall*, no verão e inverno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 57–63, 2002.

PUTNEY, D.J.; MALAYER, J.R.; GROSS, T.S.; THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J.; DROST, M. Heat Stress-Induced Alterations in the Synthesis and Secretion of Proteins and Prostaglandins by Cultured Bovine Conceptuses and Uterine Endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 39, p.717–28, 1988.

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

QIAO, T.W.; LIU, N.; MIAO, D.Q.; ZHANG, X.; HAN, D.; GE, L.; TAN, J.H. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor(s). **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 521–528, 2008.

RACEDO, S.E.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; SALAMONE, D.; NIEMANN, H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 17–25, 2008.

RAHMAN, A.N.M.A.; ABDULLAH, R.B.; WAN-KHADIJAH, W.E. Gametogenesis, fertilization and early embryogenesis in mammals with a special reference to goat: a review. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 1115–1128, 2008.

RAMALHO-SANTOS, J.; VARUM, S.; AMARAL, S.; MOTA, P.C.; SOUNA, A.P.; AMARAL, A. Mitochondrial functionality in reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. **Human Reproduction Update**, v. 15, p. 553–572, 2009.

REITER, R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 151–180, 1991.

REGASSA, A.; RINGS, F.; HOELKER, M.; CINAR, U.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TEFAYE, D. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. **BMC Genomics**, v. 12: 57, 2011.

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

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

RISOLIA, P.H.B. O efeito do fator de crescimento semelhante à insulina-I em oócitos coletados de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* expostas ao estresse térmico *in vivo*. Botucatu, Brasil: UNESP. **Tese** 2013.

RISPOLI, L.A.; PAYTON, R.R.; GONDRO, C.; SAXTON, A.M.; NAGLE, K.A.; JENKINS, B.W.; SCHRICK, F.N.; EDWARDS, J.L. Heat stress effects on the cumulus cell surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. **Reproduction**, v. 146, p. 193-207, 2013.

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

ROBERTSHAW, D.; DMI'EL, R. The effect of dehydration on the control of panting and sweating in the Black bedouin goat. **Physiological Zoology**, v. 56, p. 412-418, 1983.

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

ROCHA, D.R.; SALLES, M.G.F.; MOURA, A.A.A.N.; ARAÚJO, A.A. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 18-24, 2012.

RODRIGUES, H.D.; KINDER, J.E.; FITZPATRICK, L.A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 603-609, 2002.

RODRIGUES, R.A. O papel do fator de crescimento semelhante a insulina-I sobre as alterações do citoesqueleto induzidas pelo estresse térmico em oócitos bovinos. Diadema, Brazil: UNIFESP. **Tese**, 2013.

ROMAN-PONCE, H.; THATCHER, W.W.; BUFINGTON, D.E.; WILCOX, C.J.; VAN HORN, H.H. Physiological and production responses of dairy cattle to a shade structure in a subtropical environment. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 424-430, 1977.

ROMAN-PONCE, H.; THATCHER, W.W.; CANTON, D.; BARRON, D.H.; WOLCOX, C.J. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 46, p. 175-180, 1978.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 83-90, 2000.

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

ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1898-1906, 2004a.

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

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

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

SAITOU, M.; YAMAJI, M. Primordial germ cells in mice. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, p. 1-19, 2012.

SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; YAMAUCHI, N.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NAGAI, T.; FIRST, N.L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors *in vitro*. **Reproduction**, v. 123, p. 135-142, 2002.

SANTOLARIA, P.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; BECH-SÀBAT, G.; ÀNGULO, E.; CARRETERO, T.; SÁNCHEZ-NADAL, J.A.; YÁNIZ, J. Effects of cumulative stressful and acute variation episodes of farm climate conditions on late embryo/early fetal loss in high producing dairy cows. **International Journal of Biometeorology**, v. 54, p. 93-98, 2010.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382-2394, 2005.

SARTORI, R.; BASTOS, M.R.; BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; ERENO, R.L.; BARROS, C.M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Society of Reproduction and Fertility**, v. 67, p. 357-375, 2010.

SATRAPA, R.A.; NABHAN, T.; SILVA, C.F.; RAZZA, E.M.; PUELKER, R.Z.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 76, p. 1162-1167, 2011.

SATRAPA, R.A.; CASTILHO, A.C.S.; RAZZA, E.M.; PEGORER, M.F.; PUELKER, R.Z.; BARROS, C.M. Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 155-158, 2013.

SCHULTZ, R.M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Human Reproduction Update**, v. 8, p. 323-331, 2002.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.

SHEHAB-EL-DEEN, M.A.M.M.; LEROY, J.L.M.R.; FADEL, M.S.; SALEH, S.Y.A.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 189-200, 2010.

SHEN, P.C.; LEE, J.W.; CHENG, W.T.; SU, H.Y.; LEE, S.N.; LIU, B.T.; WANG, C.H.; CHEN, J.R.; JU, J.C. Differential thermal sensitivity between the recipient ooplasm and the donor nucleus in Holstein and Taiwan native yellow cattle. **Theriogenology**, v. 74, p. 1587-1595, 2010.

SILVA, C.F.; SARTORELLI, E.S.; CASTILHO, A.C.S.; SATRAPA, R.A.; PUELKER, R.Z.; RAZZA, E.M.; TICIANELLI, J.S.; EDUARDO, H.P.; LOUREIRO, B.; BARROS, C.M. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos Taurus* embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 79, p. 351-357, 2013.

SILVA, R.G.; SCALA JR, N.L.; POCA Y, P.L.B. Transmissão de radiação ultravioleta através do pelame e da epiderme de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1939-1947, 2001.

SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 1247-1263, 1989.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.

SIROTKIN, A.V.; DUKESOVA, J.; MAKAREVICH, A.V.; KUBEK, A.; BULLA, J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 40, p. 559-69, 2000.

SMITH, B.P. Tratado de medicina interna dos grandes animais. **São Paulo: Manole**, 3 ed. 1784p, 2006.

SONNA, L.A.; FUJITA, J.; GAFFIN, S.L.; LILLY, C.M. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 1725-1742, 2002.

SULLIVAN, M.L.; CAWDELL-SMITH, A.J.; MADER T.L.; GAUGHAN J.B. Effect of shade area on performance and welfare of short-fed feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 2911-2925, 2011.

SUN, Q.Y.; WU, G.M.; LAI, L.; PARK, K.W.; CABOT, R.; CHEON, G.H.T.; DAY B.N.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. **Reproduction**, v. 122, p. 155-163, 2001.

SZOLLOSI, D. Cortical granules: a general feature of mammalian eggs? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 4, p. 223-224, 1962.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes, Fisiologia dos animais domésticos. 11<sup>a</sup> ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.** 856p. 1996.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; TERRON, M.P.; FLORES, L.J.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; SUGINO, N.; REITER, R.J. Melatonin and pregnancy in the human. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p. 291-303, 2008a.

TAMURA, H.; TAKAYAMA, H.; NAKAMURA, Y.; REITER, R.J.; SUGINO, N. Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 44, p. 335-340, 2008b.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Minireview: functions of the *cumulus* oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 414-424, 2002.

THATCHER, W.W.; COLLIER, R.J. Effects of climate on bovine reproduction. **Current Therapy in Theriogenology**, v. 2, p. 301-309, 1986.

THATCHER, W.W.; FLAMENBAUM, I.; BLOCK, J.; BILBY, T.R. Interrelationships of Heat Stress and Reproduction in Lactating Dairy Cows. **XIV Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**. Anais, p. 2-25, 2010.

THOUAS, G.A.; TROUNSON, A.O.; JONES, G.M. Developmental effects of sublethal mitochondrial injury in mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 969-977, 2006.

TIBARY, A.; ANOUASSI, A.; KHATIR, H. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. **Theriogenology**, v. 64, p. 618-638, 2005.

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

TROUT, J.P.; McDOWELL, L.R.; HANSEN, P.J. Characteristics of the estrous cycle and antioxidant status of lactating holstein cows exposed to heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1244-1250, 1998.

TSENG, J.K.; CHEN, C.H.; CHOU, P.C.; YEH, S.P.; JU, J.C. Influences of follicular size on parthenogenetic activation and *in vitro* heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 146–153, 2004.

VALLÉE, M.; DUFORT, I.; DESROSIERS, S.; LABBE, A.; GRAVEL, C.; GILBERT, I.; ROBERT, C.; SIRARD, M. Revealing the bovine embryo transcript profiles during early *in vivo* embryonic development. **Reproduction**, v. 138, p. 95-105, 2009.

VEERASAMY, S.; NAQVI, S.M.K.; EZEJI, T.; LAKRITZ, J.; LAL, R. Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production. **Springer: Heildeberg, New York, Dordrecht, London**, 2012.

WANG, Q.; SUN, Y.Q. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 1-12, 2007.

WANG, W.; HOSOE, M.; LI, R.; SHIOYA, Y. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. **Development, Growth and Differentiation**, v. 39, p. 607–15, 1997.

WANG, L.; WANG, D.; ZOU, X.; XU, C. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10, p. 483–492, 2009a.

WANG, J.; SUI, H.; MIAO, D.; LIU, N.; ZHOU, P.; GE, L.; TAN, J. Effects of heat stress during *in vitro* maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. **Reproduction**, v. 137, p. 181–189, 2009b.

WATHES, D.C.; FENWICK, M.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; LLEWELLYN, S.; MORRIS, D.G.; KENNY, D.; MURPHY, J.; FITZPATRICK, R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, p. 232–241, 2007.

WEBB, M.; HOWLETT, S.; MARO, B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 95, p.131-145, 1986.

WESSEL, G.M.; CONNER, S.D.; BERG, L. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. **Development**, v. 129, p. 4315–4325, 2002.

WEST, J.W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 21-35, 1997.

WEST, J.W. Effects of heat stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2131–2144, 2003.

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATTEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO M.L.; LOMBARDI, L.; DE PLACIDO, G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 16, p. 909-917, 2001.

WILSON, S.J.; MARION, R.S.; SPAIN, J.N.; SPIERS, D.E.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle: 1. Lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2124–2131, 1998.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, p. 17–29, 2006.

WISE, M.E.; ARMSTRONG, D.V.; HUBER, J.T.; HUNTER, R.; WIERSMA, F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2480-2485, 1988.

WOLFENSON, D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; SAVIO, J.D.; MEIDAN, R.; LEW, B.J.; BRAW-TAL, R.; BERMAN, A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1106–1113, 1995.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 535-547, 2000.

WOLFENSON, D.; INBARA, G.; ROTH, Z.; KAIMB, M.; BLOCHA, A.; BRAW-TAL R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, p. 1042-1055, 2004.

WU, B.; IGNOTZ, G.G.; CURRIE, B.; YANG, X. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 560-565, 1996.

YOSHIMIZU, T.; OBINATA, M.; MATSUI, Y. Stage-specific tissue and cell interactions play key roles in mouse germ cell specification. **Development**, v. 128, p. 481-490, 2001.

YUAN, Y.; HAO, Z.D.; LIU, J.; WU, Y.; YANG, L.; LIU, G.S.; TIAN, J.H.; ZHU, S.E.; ZENG, S.M. Heat shock at the germinal vesicle breakdown stage induces apoptosis in surrounding cumulus cells and reduces maturation rates of porcine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 70, p. 168–178, 2008.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P.J.; YANG, X.; GODKE, R.A. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, p. 338–344, 1995.

# Capítulo 2

*Title*

*Abstract*

*Introduction and Aim*

*Materials and Methods*

*Results*

*Discussion and Conclusion*

*References*



**Gene expression profile in heat-shocked Holstein and Nelore oocytes  
and cumulus cells**

Este artigo científico foi submetido ao periódico *Reproduction*.

**Gene expression profile in heat-shocked Holstein and Nelore oocytes and cumulus cells**

Short title: Nelore and Holstein oocyte and cumulus mRNA

1 **ABSTRACT**

2

3       The deleterious effects of heat stress on oocyte developmental potential is  
4 greater for *Bos taurus taurus* than to *Bos taurus indicus* oocytes. The present study  
5 determined the transcriptome profile in Nelore and Holstein oocytes subjected heat  
6 shock during *in vitro* maturation (IVM) as well as mRNA abundance of selected  
7 candidate genes in Nelore and Holstein heat-shocked oocytes and cumulus cells.  
8 Holstein and Nelore cows were subjected to ultrasound-guided follicle aspiration during  
9 the cool season. Cumulus-oocyte complexes were assigned to control (38.5°C for 22  
10 hours) and heat shock (41°C for 12 hours followed by 38.5°C for 10 hours) during IVM.  
11 Denuded oocytes were subjected to Affymetrix bovine microarray analysis.  
12 Transcriptome analysis demonstrated 127, 9 and 6 genes differentially expressed  
13 between Breed, Temperature and Breed x Temperature interaction, respectively.  
14 Selected differentially expressed genes were evaluated by RT-PCR in oocytes and  
15 respective cumulus cells. There was a positive correlation between oocyte microarray  
16 and RT-PCR fold change for the genes *KIF3A*, *CLDN11*, *BIRC3*, *DAP*, *MTIE*, *CCT4*,  
17 *DICER1* and *DENND3*. In particular, the molecular motor *KIF3A* was up-regulated in  
18 Holstein oocytes while the pro-apoptotic gene *DAP* and the membrane trafficking gene  
19 *DENND3* were down-regulated in Holstein oocytes as compared to Nelore. Nelore  
20 cumulus cells showed increased transcript abundance for tight junction *CLDN11* while  
21 Holstein cumulus cells showed increased antioxidant *MTIE* transcript. Moreover, heat  
22 shock down-regulated antioxidant *MTIE* mRNA expression in cumulus cells. In  
23 conclusion, oocyte transcriptome analyses indicated a strong difference between breeds.  
24 In contrast, both breed and temperature affected cumulus cells mRNA abundance.

25

26

## 27 INTRODUCTION

28

29 Genetic divergences have been observed in animal breeds that had their  
30 evolution on different environmental conditions. *Bos taurus indicus* animals are less  
31 sensitive to deleterious effects of heat stress than *Bos taurus taurus* (Rocha *et al.* 1998;  
32 Pereira *et al.* 2008). High environmental temperatures during the hot months of the year  
33 reduce reproductive performance in cattle. Furthermore, the magnitude of the  
34 deleterious effects of heat stress on fertility is more pronounced in high-producing dairy  
35 cows because the high metabolic heat production associated with lactation can lead to  
36 hyperthermia (Al-Katanani *et al.* 1999). *Bos taurus indicus* resistance to heat stress is  
37 related to their thermoregulatory efficiency (Hammond *et al.* 1996; Gaughan *et al.*  
38 1999; Hansen 2004) and cellular thermotolerance (Paula-Lopes *et al.* 2003; Hernández-  
39 Cerón *et al.* 2004; Eberhardt *et al.* 2009; Paula-Lopes *et al.* 2013).

40 Heat stress promotes a series of physiological and cellular alterations in different  
41 tissues, compromising follicular growth (Wolfenson *et al.* 1995), hormonal secretion  
42 (Roth *et al.* 2000), endometrial function (Malayer *et al.* 1988), uterine blood flow  
43 (Roman-Ponce *et al.* 1978), preimplantation embryonic development (Putney *et al.*  
44 1988; Rivera & Hansen 2001) as well as oocyte (Al-Katanani *et al.* 2002) and cumulus  
45 cells (CCs) function (Rispoli *et al.* 2013). It has already been demonstrated that  
46 exposure of bovine oocytes to high temperatures reduces fertilization (Roth & Hansen  
47 2005) and oocyte developmental competence (Ju *et al.* 2005; Roth & Hansen 2005;  
48 Paula-Lopes *et al.* 2008; Torres Jr. *et al.* 2008; Ferreira *et al.* 2011).

49 Heat-induced damage in bovine oocytes causes cytoplasmic changes such as  
50 reduction in oocyte protein synthesis (Edwards & Hansen 1996), microfilaments and  
51 microtubules disorganization (Roth & Hansen 2005; Rodrigues *et al.* 2012), changes in

52 cortical granule redistribution (Maya-Soriano *et al.* 2013) and reduction on  
53 mitochondrial activity (Paula-Lopes *et al.* 2013). Heat shock also affects nuclear events  
54 reducing oocyte meiotic maturation (Roth & Hansen 2005) and inducing DNA  
55 fragmentation (TUNEL-positive) (Roth & Hansen 2004). Moreover, high temperatures  
56 affect oocyte quality at the molecular level. Exposure of germinal vesicle-stage (GV)  
57 oocytes to seasonal heat stress increased heat shock protein 70 (*HSP70*) transcript  
58 abundance. This heat-induced increase in *HSP70* mRNA was greater for Holstein than  
59 Gyr oocytes (Camargo *et al.* 2007). Seasonal heat stress also reduced oocyte relative  
60 abundance of transcripts involved in oocyte maturation and preimplantation embryonic  
61 development (Gendelman & Roth 2012). However, very little is known regarding the  
62 effects of heat stress during oocyte maturation on gene expression. In one study,  
63 exposure of bovine oocytes to heat shock during IVM did not affect oocyte mRNA  
64 abundance of transcripts associated with oocyte maturation and heat shock response  
65 (Payton *et al.* 2011).

66         The bovine oocyte is surrounded by layers of cumulus cells. The bi-directional  
67 communication between the oocyte and its CCs plays an important role on oocyte  
68 growth, metabolism (Haghighat & Van Winkle 1990) and maturation (Tanghe *et al.*  
69 2002). Removal of CCs before IVM is detrimental to oocyte maturation in cattle (Fukui  
70 & Sakuma 1980; Chian & Sirard 1995). Similarly, a reduction in CCs function may  
71 affect both cell types. Exposure of cumulus-oocyte complexes (COCs) to heat shock  
72 during IVM induced CCs DNA fragmentation (Nabenishi *et al.* 2012) and altered CCs  
73 transcriptome profile (Rispoli *et al.* 2013).

74         Bovine early embryonic development is dependent on mRNA stored during  
75 oocyte growth (Trousou *et al.* 2001); hence the importance of meticulous understanding  
76 of the mechanisms by which heat stress compromises oocyte development. However,

77 molecular mechanisms triggered by elevated temperature in bovine oocytes during  
78 maturation are still unknown, as well as the determinant factors related to  
79 thermotolerance between *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus*.

80 Thus, the present study evaluated the hypothesis that differences in cellular  
81 thermotolerance between *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* are due to differential  
82 gene expression. Therefore, global gene expression profile was determined in Nelore  
83 and Holstein oocytes subjected to heat shock during IVM. In addition, selected  
84 candidate genes were also evaluated by RT-PCR in heat-shocked Nelore and Holstein  
85 oocytes and its surrounding cumulus cells.

86

## 87 **MATERIALS AND METHODS**

88 Unless otherwise stated all reagents and medium were purchased from Sigma-  
89 Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Animals were managed according to the School of  
90 Veterinary Medicine and Animal Sciences Bioethical Committee from University of  
91 São Paulo (São Paulo, Brazil).

92

### 93 *Experimental design*

94 The experiment was designed as a 2 x 2 factorial to evaluate the effects of Breed  
95 (Holstein and Nelore) and Temperature (38.5 and 41°C) on differential gene expression  
96 of bovine oocytes and cumulus cells. Therefore, Holstein and Nelore cumulus-oocyte  
97 complexes (COCs) were randomly assigned to control (38.5°C for 22 hours) and heat  
98 shock (41°C for 12 hours followed by 38.5°C for 10 hours) treatments during IVM.

99

### 100 *Animals*

101 Non-lactating Holstein (n=13) and Nelore (n=14) cows located at the central-  
102 east region of Sao Paulo State, Brazil, at 22 42' 30" S latitude, 47 38' 30" W longitude  
103 and 546 meters of height were maintained under the same management conditions,  
104 including maintenance diet. One week before follicular aspiration, a data logger was  
105 installed in the free stall to monitor environmental temperature (ET) and relative air  
106 humidity (RH) each hour of the day during the whole experiment. Average ET and RH  
107 were calculated to determine the Temperature and Humidity Index (THI) in order to  
108 characterize environmental conditions (McDowell *et al.* 1976). According to Armstrong  
109 (1994), a THI < 72 indicates absence of heat stress; THI=72-78 indicates mild or bland  
110 stress; THI=79-88 indicates moderate heat stress and THI= 89-98 indicates severe heat  
111 stress. Rectal temperature (RT) and respiratory rate (RR) of each animal were also  
112 measured during follicular aspiration.

113

#### 114 *Oocyte collection and classification of cumulus-oocyte complexes*

115 Ovum pick up (OPU; n=12) were performed during winter and spring (July to  
116 November) seasons. The device used was an Aloka SSD-500 (Aloka, Tokyo, Japan)  
117 ultrasound with a sector transducer of 5 MHZ adapted to an 18-G needle connected to a  
118 sterile test tube and to a vacuum line (85 mmHg). Recovered COCs were transferred to  
119 50 mL conical tubes containing 10 ml of phosphate buffered saline (PBS) supplemented  
120 with 5 IU/mL heparin. Cumulus-oocyte complexes were transferred to 80 µl washing  
121 media [TCM 199-HEPES supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS;  
122 Gibco, Langley, OK, USA), 2 µg/mL pyruvate and 78 µg/mL amikacin sulfate] and  
123 stored in cryotubes containing 400 µl transport media [TCM 199-HEPES supplemented  
124 with 10 % (v/v) FBS, 22 µg/mL pyruvate, 78 µg/mL amikacin sulfate, 1 µg/mL follicle-  
125 stimulating hormone (FSH; Foltropin; Bioniche CO., Belleville, ON, Canada) and 10

126 IU/mL luteinizing hormone (LH; Lutropin-V; Bioniche CO., Belleville, ON, Canada)]  
127 under mineral oil. The cryotubes were transported to the laboratory at 38.5°C in a  
128 portable incubator.

129

130 *In vitro maturation (IVM)*

131 Oocytes classified as grade I, II and III containing one or more layers of compact  
132 cumulus cells and homogeneous cytoplasm were used in the experiment (Bilodeau-  
133 Goessels & Panich 2002). Groups of 1-10 COCs were transferred to 50 µl microdrops  
134 of IVM medium [TCM 199 containing 10% (v/v) of FBS, 22 µg/mL pyruvate, 75  
135 µg/mL gentamycin, 1 µg/mL FSH and 10 IU/mL LH] under mineral oil. At each OPU  
136 (n=12) Holstein and Nelore COCs were randomly distributed into control (38.5°C for  
137 22 hours) and heat shock (41°C for 12 hours followed by 38.5°C for 10 hours)  
138 treatments during IVM in an atmosphere of 5% of CO<sub>2</sub> in humidified air. The total  
139 number of COCs collected for each treatment was: 302 Nelore control, 316 Nelore heat  
140 shock, 102 Holstein control and 106 Holstein heat shock COCs.

141

142 *Removal and storage of cumulus cells*

143 After maturation, COCs were initially denuded by repeated pipetting in 100 µl  
144 drops of calcium-magnesium free PBS. Oocytes were removed from the drop and  
145 cumulus cells (n= 5 pools of cumulus cells in 100 µl per experimental group) were  
146 stored at -80 °C until RT-PCR analysis. Partially denuded oocytes were transferred to 50  
147 µl microdrops containing 10.000 IU/ml hyaluronidase at 38°C for 3 to 7 minutes  
148 followed by incubation in 50 µl microdrops containing 5 mg/ml protease for 5 to 10  
149 seconds. Oocytes were washed in 50 µl microdrops calcium-magnesium free PBS  
150 containing 5% (v/v) FBS for protease inactivation and washed 3 times in 50 µl



151 microdrops of calcium-magnesium free PBS. Oocytes (n= 3 pools of 25 oocytes per  
152 experimental group) were stored at -80°C until microarray and RT-PCR analysis.

153

#### 154 *RNA Extraction, amplification and concentration*

155 Oocytes and cumulus cells total RNA was extracted with RNeasy Mini Kit and  
156 RNeasy Micro Kit, respectively, (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) as recommended  
157 by the manufacturer (Caixeta *et al.* 2009). Oocyte total RNA quality and yield was  
158 determined by Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA)  
159 with RNA 6000 Pico LabChip Kit and NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop ND-  
160 2000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies). In order to obtain 100 ng  
161 RNA (33, 33 ng/μl RNA) from oocyte pools, samples were amplified using  
162 MessageAmp II aRNA Amplification Kit (Ambion, Carlsbad, CA, USA) as  
163 recommended by the manufacturer. Briefly, samples were submitted to reverse  
164 transcription process, synthesis of double-strand complementary DNA (cDNA) and *in*  
165 *vitro* transcription for amplified RNA (aRNA) synthesis. Samples that did not reach the  
166 desired concentration were further concentrated (Concentrator 5301, Eppendorf) for  
167 short intervals of 5 and 10 minutes, during 40 minutes, at room temperature. For  
168 cumulus cells, extracted RNA was quantified in NanoDrop spectrophotometer and  
169 stored at -80 °C.

170

#### 171 *Oocyte microarray analysis*

172 Aliquots of 100 ng RNA were submitted to reverse transcription reaction for  
173 cDNA double-strand formation. cDNA was used as template for *in vitro* transcription  
174 reaction resulting in biotin-labeled amplified RNA (aRNA). Then, aRNA was  
175 fragmented using 3'IVT Express Kit (Affymetrix, Inc.; Santa Clara, CA, USA) and

176 submitted to hybridization using GeneChip Bovine Array (Affymetrix) as recommended  
177 by the manufacturer. GeneChips were scanned using a GeneChip Scanner 3000 7G  
178 (Affymetrix). A total of 75 oocytes/treatment (n= 3 pools of 25 oocytes per  
179 experimental group) were submitted to microarray analysis.

180

### 181 *Oocyte real-time PCR*

182       Following microarray, 8 genes were selected for validation by RT-PCR (Table  
183 1). Primers for kinesin family member 3A (*KIF3A*), claudin 11 (*CLDN11*), baculoviral  
184 IAP repeat-containing 3 (*BIRC3*), death-associated protein (*DAP*), metallothionein 1E  
185 (*MTIE*), chaperonin containing TCP1, subunit 4 (*CCT4*), dicer 1, ribonuclease type III  
186 (*DICER1*) and DENN/MADD domain containing 3 (*DENND3*) were designed from  
187 sequences available in the GenBank database. Selected primers were synthesized by  
188 Integrated DNA Technologies (IDT, Inc., Coralville, IA, USA). Nucleotide sequences  
189 and annealing temperature of selected forward and reverse primers are presented in  
190 Table 2. Amplified RNA from the samples submitted to microarray was reverse  
191 transcribed using OligodT primer and SuperScript III (Applied Biosystems). Expression  
192 of target genes was investigated using Power SybrGreen detection system (Applied  
193 Biosystems) for Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Initial  
194 RT-PCR analysis investigated genes affected by Temperature, Breed and Breed x  
195 Temperature interaction using 75 oocytes/treatment (n= 3 pools of 25 oocytes per  
196 experimental group). The RefFinder program (<http://www.leonxie.com>) was used to  
197 determine the best oocyte reference gene. For these samples beta-actin (*ACTB*) was  
198 chosen as the more appropriate reference gene among ribosomal protein L15 (*RPL15*),  
199 ribosomal protein L30 (*RPL30*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
200 (*GAPDH*) genes.

201 *Cumulus cell real-time PCR*

202 Cumulus cells RT-PCR was conducted for the same genes and primers  
203 previously described for oocyte RT-PCR (Table 2). Total RNA (100 ng/sample) was  
204 reverse transcribed using OligodT primer and SuperScript III (Applied Biosystems).  
205 Expression of target genes was investigated using Power SybrGreen detection system  
206 (Applied Biosystems) for Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).  
207 The RefFinder program was used to determine the best cumulus cells reference gene.  
208 For these samples *RPL30* was chosen as the more appropriate one among *RPL15*, *ACTB*  
209 and peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*).

210

211 *Statistical analysis*

212 Environmental temperature, relative humidity, respiration rate, rectal  
213 temperature and THI data were analyzed by least-squares analysis of variance  
214 (ANOVA) using the General Linear Models procedure of SAS (SAS for Windows,  
215 version 9.0; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Differences between individual means  
216 were further analyzed by completing pair-wise comparisons (probability of difference  
217 analysis; SAS Institute, Inc.).

218 Microarray data analysis was performed using FlexArray 1.6.1.1 (Michal  
219 Blazejczyk, MathieuMiron, Robert Nadon (2007). FlexArray: A statistical data analysis  
220 software for gene expression microarrays. Genome Quebec, Montreal, Canada, URL  
221 <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>). Data were subjected to a simple background  
222 correction, normalized within and between each array, and statistically analyzed through  
223 the use of linear models for microarray data analysis (LIMMA) (Smyth 2005). Further  
224 analyses were performed using *affy* program package developed with R language  
225 (Gautier *et al.* 2004). For that probeset intensity row data for each probe was

226 determined, followed by background subtraction, normalization between arrays and  
227 mean probeset intensity from each transcript represents its final intensity. Genes with  
228 fold change of at least 1.5 and a probability of  $P < 0.05$  were considered differentially  
229 expressed in both analyzes.

230 Pearson's correlation was calculated between oocyte microarray and RT-PCR  
231 fold changes using GraphPan Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).  
232 For further oocyte and cumulus cells RT-PCR analysis, the relative expression of each  
233 target gene was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Amplification efficiency correction  
234 was determined using the equation described by Pfaffl (Pfaffl 2001). Average efficiency  
235 values for each gene were calculated by the LinRegPCR software (Ramakers *et al.*  
236 2003). Oocyte data was submitted to ANOVA using the JMP software version 7.0 (SAS  
237 Institute, Inc., Cary, NC, USA). Cumulus cell data were submitted to ANOVA using the  
238 General Linear Models procedure of SAS (SAS for Windows, version 9.0; SAS  
239 Institute, Inc., Cary, NC, USA). Logarithmic or square root transformation was applied  
240 to obtain a normal distribution whenever necessary. The model included the main  
241 effects Breed, Temperature and Breed x Temperature interaction.

242

## 243 **RESULTS**

244

### 245 *Environmental parameters*

246 Environmental temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and RH (%) were measured each hour during  
247 the entire OPU period to determine animal comfort (supplementary Figure 1).  
248 Environmental temperature varied from  $28.0 \pm 0.28^{\circ}\text{C}$  (maximum) to  $16.9 \pm 0.29^{\circ}\text{C}$   
249 (minimum). It was lower ( $P < 0.0001$ ) in the morning ( $19.21 \pm 0.73^{\circ}\text{C}$ ) than the evening  
250 ( $25 \pm 0.73^{\circ}\text{C}$ ). Relative humidity varied from  $77.4 \pm 1.30\%$  (maximum) to  $44.8 \pm 1.29\%$

251 (minimum). It was lower ( $P < 0.0001$ ) in the evening ( $52.77 \pm 2.10\%$  RH) than the  
252 morning ( $71.09 \pm 2.10\%$  RH). The THI ranged from  $58 \pm 0.72$  to  $76 \pm 0.72$  with a mean  
253 of  $68 \pm 0.40$  between days of study (OPU). According to Armstrong (1994) THI  
254 indicated that animals remained in the absence of heat stress during the majority of the  
255 study. A mild environmental stress was observed in thirteen random days in September  
256 (supplementary Figure 2).

257

### 258 *Physiological parameters*

259 Rectal temperature and respiration rate differed between breeds. Rectal  
260 temperature was higher ( $P < 0.05$ ) for Nelore ( $38.4 \pm 0.04^\circ\text{C}$ ) than Holstein cows ( $38.2 \pm$   
261  $0.05^\circ\text{C}$ ; supplementary Figure 3A). However, respiration rate was higher ( $P < 0.05$ ) for  
262 Holstein ( $30.0 \pm 0.49$  mpm) than Nelore cows ( $28.0 \pm 0.44$  mpm; supplementary Figure  
263 3B). Eventhough, rectal temperature and respiration rate differed between breeds these  
264 parameters were within the physiological range for these species (Carvalho *et al.* 1995;  
265 Du Preez 2000).

266

### 267 *Transcriptome analysis*

268 The Venn diagram illustrates global gene expression profile in Holstein and  
269 Nelore oocytes subjected to heat shock (Figure 1). Oocyte microarray revealed 127  
270 genes affected by Breed (Table 3), 9 genes affected by Temperature (Table 4) and 6  
271 genes affected by Breed x Temperature interaction (Table 5; Fold change  $\geq 1.5$ ;  $P <$   
272  $0.05$ ). Among these genes 82 were up-regulated and 45 were down-regulated in  
273 Holstein as compared to Nelore oocytes (Table 3). Moreover, 3 genes were up-regulated  
274 and 6 were down-regulated in heat-shocked oocytes as compared to control (Table 4).  
275 Further analysis indicated that *CCT4* gene was up-regulated in Holstein heat-shocked

276 oocytes as compared to Holstein control oocytes, *DICER1* gene was up-regulated in  
277 Holstein heat-shocked oocytes as compared to Nelore heat-shocked oocytes and *ACOX1*  
278 gene was up-regulated in Holstein heat-shocked oocytes as compared to both Holstein  
279 control oocytes and Nelore heat-shocked oocytes (Table 6). *OSMR* gene was up-  
280 regulated in Nelore heat-shocked oocytes in relation to Holstein heat-shocked oocytes  
281 while *DENND3* was up-regulated in Nelore control oocytes as compared to Holstein  
282 control (Table 6).

283

#### 284 *Functional classification*

285       Functional analysis was performed by Ingenuity Pathways Analysis (IPA –  
286 Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) and DAVID Bioinformatics Database software  
287 ([www.david.abcc.ncifcrf.gov](http://www.david.abcc.ncifcrf.gov)). Genes differently expressed ( $P < 0.05$ ) between the  
288 Holstein and Nelore oocytes were involved in important biological functions such as  
289 tissue morphology (*CLDN11*, *CLDN23* and *ATP2C1*), embryonic development (*KIF3A*  
290 and *AKAP12*), organismal development (*ENPP2* and *ERCC6*), tissue development  
291 (*SIRT1* and *IIPA*), cellular development (*DICER1* and *PPIA*) and cell death and  
292 survival (*BIRC3* and *DAP*) (Figure 2). Gene expression profile differently expressed  
293 ( $P < 0.05$ ) between control and heat-shocked oocytes involved cellular compromise  
294 (*ACOX1* and *MTIE*), cell cycle (*MTIE*), developmental disorder (*SF3B4* and *ACOX1*),  
295 lipid metabolism (*ACOX1*), molecular transport (*ACOX1* and *MTIE*), energy production  
296 (*ACOX1*), free radical scavenging (*MTIE*) e cellular assembly and organization  
297 (*ACOX1* and *CORO1C*) (Figure 2). Breed and temperature interaction also indicated  
298 significant main biological processes ( $P < 0.05$ ) such as cell cycle (*DICER1*), cell  
299 morphology (*OSMR*), cellular assembly, organization and compromise (*ACOX1* and  
300 *DICER1*), cellular development (*OSMR* and *DICER1*), lipid metabolism (*ACOX1*), post-

301 translational modification and protein fold (*CCT4*) and protein catabolism (*DENND3*)  
302 (Figure 2). Gene terminology is described on Tables 3, 4 and 5.

303

#### 304 *Oocyte real-time PCR*

305 Real-time PCR was conducted to validate genes affected by Breed (*KIF3A*,  
306 *CLDN11*, *BIRC3* and *DAP*), Temperature (*MTIE*) and Breed x Temperature interaction  
307 (*CCT4*, *DICER1* and *DENND3*) in bovine oocytes. Initial analysis showed that  
308 microarray and RT-PCR fold change had a Pearson's correlation coefficient of  $r= 0.78$   
309 ( $P= 0.02$ ; Figure 3). This indicated that the differential level of expression for the  
310 transcripts *KIF3A*, *CLDN11*, *BIRC3*, *DAP*, *MTIE*, *CCT4* and *DENND3* detected in both  
311 microarray and RT-PCR experiment were highly correlated (Figure 3). However,  
312 further analysis confirmed expression of 25% of selected genes in oocytes (2/8; Figures  
313 4 and 5). The relative mRNA abundance for the molecular motor *KIF3A* was higher ( $P<$   
314  $0.05$ ; Figure 4A) for Holstein than Nelore oocytes. On contrast, *DAP* ( $P< 0.05$ ; Figure  
315 4A) and *DENND3* ( $P< 0.001$ ; Figure 5) relative mRNA abundance was higher for  
316 Nelore than Holstein oocytes. For the other genes evaluated there was no effect of  
317 Breed (*CLDN11* and *BIRC3*), Temperature (*MTIE*) or Breed x Temperature interaction  
318 (*CCT4*, *DICER1* and *DENND3*).

319

#### 320 *Cumulus cell Real-time PCR*

321 Cumulus cells *CLDN11* expression was affected by Breed. The relative *CLDN11*  
322 mRNA abundance was higher ( $P= 0.06$ ; Figures 6A) for Nelore than Holstein CCs.  
323 *MTIE* expression was affected by Breed ( $P< 0.05$ ) and Temperature ( $P< 0.05$ ). The  
324 relative *MTIE* mRNA abundance was higher ( $P< 0.05$ ; Figure 6A) for Holstein than  
325 Nelore CCs. Moreover, exposure of COCs to heat shock decreased ( $P< 0.05$ ; Figure 6B)

326 CCs *MTIE* mRNA expression. There was no effect of Breed, Temperature and Breed x  
327 Temperature interaction for *KIF3A*, *BIRC3*, *DAP*, *CCT4* and *DICER1* relative mRNA  
328 abundance in CCs (Figures 6). *DENND3* mRNA was not expressed in these cells.

329

## 330 **DISCUSSION**

331

332 High environmental temperature cause great economic impact on cattle production  
333 worldwide. The present study analyzed global changes in gene expression in *Bos taurus*  
334 *taurus* and *Bos taurus indicus* oocytes subjected to heat shock and the relative  
335 abundance of candidate genes in their cumulus cells. This was the first study evaluating  
336 the molecular mechanisms by which temperature and genotype affects oocyte and  
337 cumulus cells function leading to significant reproductive losses.

338 Environmental and physiological parameters were monitored to determine  
339 animal thermal comfort throughout the experiment. Environmental temperature and RH  
340 varied from 16.9 to 28.0°C and 44.8 to 77.4%, respectively. *Bos taurus taurus* and *Bos*  
341 *taurus indicus* critical temperatures are 27 and 35°C, respectively (Curtis, 1981). Thus,  
342 hyperthermia in *Bos taurus taurus* cows can occur at temperatures above 27°C (Berman  
343 *et al.* 1985; Hansen *et al.* 2001). Despite the fact that in the present study maximum air  
344 temperature was borderline, there was an inverse relationship between ET and RH  
345 promoting evaporative heat loss, thermoregulation and maintenance of normothermia.  
346 Moreover, the THI indicated that animals remained in the absence of heat stress during  
347 the majority of the study (Armstrong, 1994). The THI ranged from 58 to 76. It has been  
348 reported that THI > 72 is indicative of mild stress for lactating *Bos taurus taurus* cows  
349 (Armstrong, 1994). However, females used in the present study were not lactating,  
350 which reduces endogenous heat production leading to thermal comfort (Sartori *et al.*



351 2004; Wiltbank *et al.* 2006). This fact was confirmed by animals respiration rate and  
352 rectal temperature that were typical of thermoneutrality (Dunlap & Vicent 1971; Rhoads  
353 *et al.* 2009).

354 Expression of the microtubule-dependent molecular motor *KIF3A* was up-  
355 regulated in Holstein oocytes as compared to Nelore. *KIF3A* protein has been localized  
356 to the spindle microtubules and around the cellular cortex of Hela cells (Haraguchi *et al.*  
357 2006). This member of the kinesins superfamily uses energy derived from ATP  
358 hydrolysis to promote unidirectional transport of organelles along the microtubules  
359 (Yamazaki *et al.* 1996; Marszalek & Goldstein 2000) and completion of cytokinesis.  
360 Kinesins allow vesicle and organelle transport (Takeda *et al.* 2000), positioning of  
361 nuclei, and proper segregation of genetic material (Shimizu *et al.* 1998). Therefore, the  
362 role of *KIF3A* on spindle formation and maintenance of accurate chromosomal  
363 segregation implies an important function for this gene on progression of meiosis in  
364 Holstein oocytes. However, there is also evidence that increased *KIF3A* expression may  
365 not be associated to greater cellular function. Indeed, regeneration of rat ganglionic cells  
366 only occurred at low levels of *Kif3a* mRNA expression (Takemura *et al.* 1996).

367 There is accumulating evidence that the mammalian cytoskeleton is susceptible  
368 to extremes of temperature. It has been shown that exposure of oocytes to heat shock (Ju  
369 & Tseng 2004; Paula-Lopes *et al.* 2012) as well as cryopreservation (Chen *et al.* 2003;  
370 Wu *et al.* 2006) compromises cytoskeleton architecture leading to spindle microtubule  
371 and actin filament disorganization. In the current study exposure of Nelore and Holstein  
372 oocytes to a physiologically relevant heat shock of 41°C for the first 12h IVM did not  
373 affect the microtubule-dependent molecular motor *KIF3A* mRNA expression. Such  
374 stress was not severe enough to induce *KIF3A* change in transcript abundance during  
375 oocyte maturation. Indeed, more severe stress such as cryopreservation caused *KIF3A*

376 down-regulation in human MII oocytes (Monzo *et al.* 2012). Even though the effects of  
377 temperature on cytoskeleton organization have been well characterized in bovine  
378 oocytes (Roth & Hansen 2004; Rodrigues *et al.* 2012) little has been shown regarding  
379 its effect on cytoskeleton-associated transcript expression.

380         Death-associated protein transcript has not been previously described in bovine  
381 oocytes. This cytoplasmic protein plays a role as a positive mediator of apoptosis  
382 (activated by interferon-gamma; Deiss *et al.* 1995). In the current study *DAP* transcript  
383 was up-regulated in Nelore as compared to Holstein oocytes. While high *DAP*  
384 expression in MII Nelore oocytes may be indicative of reduced oocyte viability this  
385 scenario can be modified following fertilization. As the fertilized embryo progresses  
386 through development the ability to activate the apoptotic cascade in response to stress is  
387 an adaptative response that facilitates survival after heat shock (Paula-Lopes & Hansen  
388 2002). Thus, increased *DAP* expression may allow better embryonic response to cellular  
389 stress. Indeed, there is evidence that Brahman embryos are more resistant to elevated  
390 temperature than Angus and Holstein embryos (Paula-Lopes *et al.* 2003). Moreover, as  
391 the embryo reaches the blastocyst stage *DAP* transcript expression did not differ  
392 between in Simmental (*Bos taurus taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) embryos  
393 (Sudano *et al.* 2013).

394         Nelore and Holstein oocyte transcriptome analysis demonstrated that the  
395 molecular motor *KIF3A* and the pro-apoptotic *DAP* genes were differentially expressed  
396 between breeds. Even though such breed difference occurred independent of  
397 temperature, these genes encode important proteins associated with cellular events  
398 highly susceptible to heat shock (Roth & Hansen 2004; Ju *et al.* 2005; Roth & Hansen  
399 2005) such as oocyte nuclear maturation (Lenz *et al.* 1983; Roth & Hansen 2005; Paula-  
400 Lopes *et al.* 2008), cytoskeleton organization (Roth & Hansen 2005) and apoptosis

401 (Roth & Hansen 2004; Ispada *et al.* 2010; Lima *et al.* 2010). Interestingly, while  
402 Holstein oocytes are known to be susceptible to heat stress (Rocha *et al.* 1998), *KIF3A*  
403 transcript, that favors cellular survival and homeostasis, was more abundant in Holstein  
404 than Nelore oocytes. It is possible that Holstein oocytes have a lower stress baseline so  
405 that exposure to the IVM system triggered earlier changes in oocyte mRNA expression  
406 as compared to Nelore. Another possibility is that Holstein oocyte deficiency on cellular  
407 protection against heat stress occurs at post-transcriptional or protein level rather than  
408 transcript regulation

409 Another gene differentially expressed between Holstein and Nelore oocytes was  
410 *DENND3*. The DENN domain is an evolutionarily conserved protein but little has been  
411 shown regarding its functional roles. DENN domains interact directly with members of  
412 the Rab family of small GTPases and function enzymatically as Rab-specific guanine  
413 nucleotide exchange factors (Yoshimura *et al.* 2010). RabGTPases plays a role on  
414 membrane trafficking, cell growth and differentiation (Schwartz *et al.* 2008). *Dennd3*  
415 act as regulator of Rab12 function (Matsui & Fukuda 2011), which controls transferrin  
416 receptor degradation and recycling (Dautry-Varsat *et al.* 1983; Matsui *et al.* 2011).  
417 Transferrin receptor, a regulator of intracellular iron homeostasis, has been shown in  
418 baboon oocytes (Burch *et al.* 2009). While iron supplementation during IVM of bovine  
419 oocytes increased blastocyst development and survival (Gao *et al.* 2007), it can also  
420 catalyze hydroxyl radical formation amplifying oxidative damage (Asano 2012). Excess  
421 iron also induced transferrin receptor degradation at lysosomes, a mechanism that is  
422 required for iron homeostasis in mammalian cells (Tachiyama *et al.* 2011). Therefore,  
423 high *DENND3* mRNA abundance suggests that Nelore oocytes are better able to control  
424 iron balance, avoiding oxidative stress and defects on nuclear events during IVM.

425           The positive correlation between fold change values for microarray and RT-PCR  
426 validation indicated high similarity on transcriptional gene expression profile between  
427 these two techniques. Among the eight genes evaluated, seven had their expression  
428 directly proportional between microarray and RT-PCR results. Despite this high  
429 correlation, a more conservative analysis indicated that only two of the eight genes had  
430 statistical significance for RT-PCR validation. This possible discrepancy may be due to  
431 the number of replicas used. Even though it has been demonstrated that an experiment  
432 should ideally encompass at least three independent biological replicates for each  
433 treatment (Udvardi *et al.* 2008), it is possible that this was not the case for the current  
434 RT-PCR study. A larger number of replicas may promote greater homogeneity between  
435 samples potentially increasing the proportion of validated genes. However, considering  
436 the implications of an OPU and microarray experiment, three biological replicates has  
437 been used as a standard number for other microarray studies reported in the literature  
438 (Tesfaye *et al.* 2009; Grado-Ahuir *et al.* 2011; Dias *et al.* 2013)

439           Considering the importance of CCs on oocyte competence (Buccione *et al.*  
440 1990) the current study broad the investigation of oocyte differentially expressed genes  
441 to its surrounding CCs. Tight junction claudin (*CLDN11*) expression was higher in  
442 Nelore than Holstein CCs. In the bovine, several genes from the claudin family have  
443 been identified in granulosa cells of atresic follicles (*CLDN1*, *CLDN5*, *CLDN11*)  
444 suggesting that this protein family exerts a modulatory role on atresic follicle apoptotic  
445 cascade (Hatzirodos *et al.* 2014). Even though the modulatory action of claudins on the  
446 apoptotic cascade has not been shown there is evidence that *CLDN1* had an anti-  
447 apoptotic action in tumor cells (Akasaka *et al.* 2010).

448           Differences in antral follicle population between *Bos taurus taurus* and *Bos*  
449 *taurus indicus* animals have been well demonstrated. At each follicular wave, the

450 number of small antral follicles detected has been shown to be greater for *Bos taurus*  
451 *indicus* than *Bos taurus taurus* cattle (Alvarez *et al.* 2000; Sartori *et al.* 2010).  
452 Therefore, increased tight junction *CDLN11* mRNA expression in Nelore follicular cells  
453 may be involved antral follicle formation. There is evidence that *CLDN11* plays a role  
454 on cellular migration (Bronstein *et al.* 2000; Aravindakshan *et al.* 2006) and  
455 proliferation (Bronstein *et al.* 2000). Moreover, antrum formation requires granulosa  
456 cell migration relative to each other to allow fluid accumulation as well as cell-cell  
457 junction remodeling (Rodgers & Irving-Rodgers 2010).

458 Heat stress increases reactive oxygen species (ROS) production in bovine  
459 oocytes and the percentage of CCs TUNEL-positive (Nabenish *et al.* 2012). Cumulus  
460 cells have a critical role protecting oocytes against oxidative stress-induced apoptosis  
461 during IVM (Tatemoto *et al.* 2000) and fertilization (Fatehi *et al.* 2005). Cumulus cells  
462 endogenous antioxidant networks acts through gap junction communication reducing  
463 ROS toxicity (Yoshida 1993; Cetica *et al.* 2001). Exposure of bovine COCs to heat  
464 shock during IVM down-regulated *MTIE* mRNA in CCs. Similarly, this transcript was  
465 also reduced in Nelore CCs as compared to Holstein. Metallothionein-1E protein shows  
466 antioxidant activity (Zhou & Kang 2000; Chung *et al.* 2006) acting as a free radical  
467 scavenger for hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radical (Sato & Bremer  
468 1993; Babula *et al.* 2012). Reduced *MTIE* mRNA abundance in CCs may occur due to  
469 increased protein synthesis leading to both CCs and oocyte cellular protection. For  
470 example, reduced *MTIE* expression in heat-shocked oocytes suggests greater mRNA  
471 usage during heat shock. However, one should be cautious because *MTIE* mRNA  
472 undergo post transcriptional regulation (Gurel *et al.* 2005) so that mRNA abundance  
473 does not always correlate with protein synthesis (Vasconcelos *et al.* 2002).

474 Exposure of Holstein and Nelore COCs to 41°C during IVM did not affect CCs  
475 *KIF3A*, *BIRC3*, *DAP*, *CCT4*, and *DICER1* mRNAs expression. This result is in  
476 agreement with the microarray study conducted by Rispoli *et al.* (2013). In this study  
477 expression of these genes in CCs derived from Holstein COCs subjected to 41°C during  
478 IVM were also not affected by temperature (Rispoli *et al.* 2013). There is evidence that  
479 human *BIRC3* and *DAP* mRNAs had their expression down-regulated in CCs from  
480 polycystic ovary patients (Haouzi *et al.* 2012).

481 In conclusion, global changes in gene expression in Nelore and Holstein  
482 oocytes subjected to heat shock indicated a strong difference between breeds. Such  
483 differences were not regulated by temperature. The molecules regulated by oocyte breed  
484 were mostly involved in cellular organization and cell death. In contrast, breed and  
485 temperature acted to alter CCs expression of molecules involved in cellular organization  
486 and oxidative stress. It is suggested that *Bos taurus indicus* deficiency in cellular  
487 protection against heat stress is also regulated at post-transcriptional and protein level.

488

489

#### 490 **Declaration of interest**

491 The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as  
492 prejudicing the impartiality of the research reported.

493

#### 494 **Funding**

495 This research was funded by São Paulo Research Foundation - FAPESP (#2007/53323-  
496 0 and 2010/04718-5) and by Coordination for the Improvement of Higher Level -or  
497 Education- Personnel (CAPES).

498

**499 Acknowledgements**

500 We acknowledge Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Maria  
501 Eugênia R. de Camargo and Dr. J rge Kobarg at Brazilian Biosciences National  
502 Laboratory (LNBio), CNPEM, Campinas, Brazil for their support with the use of  
503 equipments GeneChip<sup>®</sup> Hibridization Oven 640, GeneChip<sup>®</sup> Fluidics Station 450 and  
504 GeneChip<sup>®</sup> Scanner 30007G (Affymetrix). We also appreciated the technical suporte  
505 provided by Patrícia Kubo Fontes, Rafaela Fl via Pomini Pinto, Ant nio Guilherme  
506 Roncada Pupulim, Eduardo Montanari Razza and Daniela Franco Silva.

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524 **REFERENCES**

525

526 **Akasaka H, Sato F, Morohashi S, Wu Y, Liu Y, Kondo J, Odagiri H, Hakamada**  
527 **K, Kijima H** 2010 Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated human breast cancer  
528 MCF-7 cells. *BMC Cancer* **10** doi: 10.1186/1471-2407-10-548.

529 **Al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PL** 1999 Factors affecting seasonal variation in 90 day  
530 non-return rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *Journal of Dairy*  
531 *Science* **82** 2611-2615.

532 **Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ** 2002 Effect of season and exposure to heat  
533 stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* **85** 390-396.

534 **Alvarez P, Spicer LJ, Chase CC Jr, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, Hammond**  
535 **AC, Olson TA, Wettemann RP** 2000 Ovarian and endocrine characteristics during an estrous  
536 cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal*  
537 *Science* **78** 1291-1302.

538 **Aravindakshan J, Chen X, Sairam MR** 2006 Differential expression of claudin family  
539 proteins in mouse ovarian serous papillary epithelial adenoma in aging FSH receptor-deficient  
540 mutants. *Neoplasia* **8** 984-994.

541 **Armstrong DV** 1994 Symposium: Nutrition and heat stress. Heat Stress Interaction with shade  
542 and cooling. *Journal of Dairy Science* **77** 2044-2050.

543 **Asano Y** 2012 Age-related accumulation of non-heme ferric and ferrous iron in mouse ovarian  
544 stroma visualized by sensitive non-heme iron histochemistry. *Journal of Histochemistry &*  
545 *Cytochemistry* **60** 229-242.

546 **Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, Skutkova H,**  
547 **Provaznik I, Hubalek J, Kizek R** 2012 Mammalian metallothioneins: properties and functions.  
548 *Metallomics* **4** 739-750.

549 **Berman A, Folman Y, Kaim M, Mamen M, Herz Z, Wolfenson D, Arieli A, Graber Y** 1985  
550 Uppercritical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a  
551 subtropical environment. *Journal of Dairy Science* **68** 1488-1495.



- 552 **Bilodeau-Goeseels S, Panich P** 2002 Effects of oocyte quality on development and  
553 transcriptional activity in early bovine embryos. *Animal Reproduction Science* **71** 143-155.
- 554 **Bronstein JM, Tiwari-Woodruff S, Buznikov AG, and Stevens DB** 2000 Involvement of  
555 OSP/Claudin-11 in oligodendrocyte membrane interactions: role in biology and disease.  
556 *Journal of Neuroscience Research* **59** 706-711.
- 557 **Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ** 1990 Interactions between somatic cells and germ cells  
558 throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction* **43** 543-547.
- 559 **Burch MG, Li C, Albrecht ED, Pepe GJ** 2009 Developmental regulation of the expression of  
560 the transferrin receptor and Ki67 in oocytes of the Babbon fetal ovary by estrogen. *Endocrine*  
561 **35** 177-183.
- 562 **Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Buratini J, Man D** 2009 Effect of follicle size on  
563 mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker  
564 genes for developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development* **21** 655-664.
- 565 **Camargo LSA, Viana JHM, Ramos AA, Serapião RV, de Sa WF, Ferreira AM,**  
566 **Guimarães MFM, do Vale Filho VR** 2007 Developmental competence and expression of the  
567 Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical  
568 environment. *Theriogenology* **68** 626–632.
- 569 **Carvalho FA, Lammoglia MA, Simões MJ, Randel RD** 1995 Breed affects thermoregulation  
570 and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. *Journal of*  
571 *Animal Science* **73** 3570- 3573.
- 572 **Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT** 2001 Antioxidant enzyme activity and  
573 oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *International Union of Biochemistry and*  
574 *Molecular Biology* **51** 57-64.
- 575 **Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY** 2003. Effects of cryopreservation  
576 on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte  
577 freezing: a review article. *Molecular and Cellular Endocrinology* **202** 101-107.

- 578 **Chian RC, Sirard MA** 1995 Effects of cumulus cells and follicle-stimulating hormone  
579 during in vitro maturation on parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Molecular*  
580 *Reproduction and Development* **42** 425–431.
- 581 **Chung MJ, Hogstrand C, Lee SJ** 2006 Cytotoxicity of nitric oxide is alleviated by zinc-  
582 mediated expression of antioxidant genes. *Experimental Biology and Medicine* **231** 1555-1563.
- 583 **Curtis SE** 1981 Environmental management in animal agriculture. *Illinois: Animal*  
584 *Environment Services*, p. 97-122.
- 585 **Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF** 1983 pH and the recycling of transferrin during  
586 receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80** 2258-  
587 2262.
- 588 **Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, Cohen O, Kimchi A** 1995 Identification of a novel  
589 serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma  
590 interferon-induced cell death. *Genes & Development* **9** 15-30.
- 591 **Dias FCF, Khan MIR, Sirard MA, Adams GP, Singh J** 2013 Differential gene expression of  
592 granulosa cells after ovarian superstimulation in beef cattle. *Reproduction* **143** 181-191.
- 593 **Du Preez JH** 2000 Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle  
594 in South Africa. *Onderstepoort Journal Veterinary Research* **67** 263-271.
- 595 **Dunlap SE, Vicent CK** 1971 Influence of postbreeding thermal stress on conception rate in  
596 beef cattle. *Journal of Animal Science* **32** 1216-1218.
- 597 **Eberhardt BG, Satrapa RA, Capinzaiki CR, Trinca LA, Barros CM** 2009 Influence of the  
598 breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus*  
599 *indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Animal*  
600 *Reproduction Science* **114** 54-61.
- 601 **Edwards JL, Hansen PJ** 1996 Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis  
602 in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biology of*  
603 *Reproduction* **55** 340-346.

- 604 **Fatehi AN, Roelen BAJ, Colenbrander B, Schoevers EJ, Gadella BM, Bevers MM, van**  
605 **den Hurk R** 2005 Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine  
606 oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further  
607 development. *Zygote* **13** 177-185.
- 608 **Ferreira RM, Ayres H, Chiaratti MR, Ferraz ML, Araújo AB, Rodrigues CA, Watanabe**  
609 **YF, Vireque AA, Joaquim DC, Smith LC et al.** 2011 The low fertility of repeat-breeder cows  
610 during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts.  
611 *Journal of Dairy Science* **94** 2383-2392.
- 612 **Fukui Y, Sakuma Y** 1980 Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to  
613 ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biology of*  
614 *Reproduction* **22** 669–673.
- 615 **Gao G, Yi J, Zhang M, Xiong J, Geng L, Mu C, Yang L** 2007 Effects of iron and cooper in  
616 culture medium on bovine oocyte maturation, perimplantation embryo development, and  
617 apoptosis of blatocysts in vitro. *Journal of Reproduction and Development* **53** 777-784.
- 618 **Gaughan JB, Mader TL, Holt SM, Josey MJ, Rowan KJ** 1999 Heat tolerance of Boran and  
619 Tuli Crossbred Steers. *Journal of Animal Science* **77** 2398-2405.
- 620 **Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA** 2004 Affy – analysis of Affymetrix GeneChip  
621 data at the probe level. *Bioinformatics* **20** 307-315.
- 622 **Gendelman M, Roth Z** 2012 *In vivo* vs. *in vitro* models for studying the effects of elevated  
623 temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene  
624 expression. *Animal Reproduction Science* **134** 125-134.
- 625 **Grado-Ahuir JA, Aad PY, Spicer LJ** 2011 New insights into  
626 the pathogenesis of cystic follicles in cattle: microarray analysis of gene expression in granulosa  
627 cells. *Journal of Animal Science* **89** 1769-1786.
- 628 **Gurel V, Sens DA, Somji S, Garrett SH, Weiland T, Sens MA** 2005 Post-  
629 transcriptional regulation of metallothionein isoform 1 and 2 expression in the human breast and  
630 the MCF-10A cell line. *Toxicological Sciences* **85**, 906–915

- 631 **Haghighat N, Van Winkle LJ** 1990 Developmental change in follicular cell enhanced amino  
632 acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly.  
633 *Journal of Experimental Zoology* **253** 71–82.
- 634 **Hammond AC, Olson TA, Chase CC, Bowers Jr EJ, Randel RD, Murphy CN, Vogt DW,**  
635 **Tewolde A** 1996 Heat tolerance in two tropically adapted Bos Taurus breeds, Senepol and  
636 Romosinuano, compared with Brahman, Angus and Hereford cattle in Florida. *Journal of*  
637 *Animal Science* **74** 295-303.
- 638 **Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Krininger CE, Chase**  
639 **Jr CC** 2001 Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for  
640 mitigation. *Theriogenology* **55** 91–103.
- 641 **Hansen PJ** 2004 Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal*  
642 *Reproduction Science* **82** 349-360.
- 643 **Haouzi D, Assou S, Monzo C, Vincens C, Dechaud H, Hamamah S** 2012 Altered gene  
644 expression profile in cumulus cells of mature MII oocytes from patients with polycystic ovary  
645 syndrome. *Human Reproduction* **27** 3523–3530.
- 646 **Haraguchi K, Hayashi T, Jimbo T, Yamamoto T, Akiyama T** 2006 Role of the kinesin-2  
647 family protein, KIF3, during mitosis. *Journal of Biological Chemistry* **281** 4094-4099.
- 648 **Hatzirodos N, Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Harland ML, Morris SE, Rodgers RJ**  
649 2014 Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia.  
650 *BMC Genomics* **15** 1-26.
- 651 **Hernández-Cerón J, Chase CC Jr, Hansen PJ** 2004 Differences in heat tolerance between  
652 preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. *Journal of Dairy*  
653 *Science* **87** 53-58.
- 654 **Ispada J, Lima RS, Risolia PHB, Andrade ES, Assumpção MEOA, Visintin JA, Paula-**  
655 **Lopes FF** 2010 The role of insulin-like growth factor-I on inhibition of heat-induced apoptosis  
656 in bovine oocytes *Animal Reproduction* **7** 333 (abstract).
- 657 **Ju JC, Tseng JK** 2004 Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine oocytes  
658 under hyperthermia. *Molecular Reproduction and Development* **68** 125-133.

- 659 **Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X** 2005 Heat shock reduces developmental  
660 competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology* **64** 1677-1689.
- 661 **Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL** 1983 In vitro maturation and fertilization  
662 of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biology of Reproduction* **29** 173-179.
- 663 **Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpção MEOA, Visintin JA, Paula-Lopes FF** 2010  
664 Indução de apoptose em oócitos bovinos submetidos ao estresse térmico durante os períodos de  
665 vesícula germinativa e *maturação in vitro*. In: XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de  
666 Tecnologia de Embriões (SBTE). *Acta Scientiae Veterinariae* **38** 380 (abstract).
- 667 **Malayer JR, Hansen PJ, Buhi WC** 1988 Effect of day of the oestrous cycle, side of the  
668 reproductive tract and heat shock on *in vitro* protein secretion by bovine endometrium. *Journal*  
669 *of Reproduction and Fertility* **84** 567-578.
- 670 **Marszalek JR, Goldstein LSB** 2000 Understanding the functions of kinesin-II. *Biochimica et*  
671 *Biophysica Acta* **1496** 142-150.
- 672 **Matsui T, Fukuda M** 2011 Small GTPase Rab12 regulates transferrin receptor degradation.  
673 *Cellular Logistics* **1** 155-158.
- 674 **Matsui T, Itoh T, Fukuda M** 2011 Small GTPase Rab12 regulates constitutive degradation of  
675 transferrin receptor. *Traffic* **12** 1432-1443.
- 676 **Maya-Soriano MJ, López-Gatius F, Andreu-Vázquez C, López-Béjar M** 2013 Bovine  
677 oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the  
678 year. *Theriogenology* **79** 299-305.
- 679 **McDowell RE, Hooven NW, Camoens JK** 1976 Effects of climate on performance of  
680 Holsteins in first lactation. *Journal of Dairy Science* **59** 965-973.
- 681 **Monzo C, Haouzi D, Roman K, Assou S, Dechaud H, Hamamah S** 2012 Slow freezing and  
682 vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes.  
683 *Human Reproduction* **27** 2160-2168.
- 684 **Nabenishi H, Takagi S, Kamata H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y** 2012  
685 The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as  
686 determined by effects of cyclosporine A. *Molecular Reproduction and Development* **79** 31-41.

- 687 **Paula-Lopes FF, Hansen PJ** 2002 Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation  
688 embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and Biophysical*  
689 *Research Communications* **295** 37-42.
- 690 **Paula-Lopes FF, Chase CC Jr, Al-Katanani YM, Krininger CE, Rivera RM, Tekin**  
691 **S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ** 2003 Genetic divergence in cellular  
692 resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot  
693 climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to  
694 increased culture temperatures. *Reproduction* **125** 285-294.
- 695 **Paula-Lopes FF, Milazzotto M, Assumpção MEOA, Visintin JA** 2008 Heat shock-induced  
696 damage in bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* **43** 208 (abstract).
- 697 **Paula-Lopes FF, Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpção MEOA, Visintin JA** 2012  
698 Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Animal*  
699 *Reproduction* **9** 395-403.
- 700 **Paula-Lopes FF, Lima RS, Satrapa RA, Barros, CM** 2013 Physiology and endocrinology  
701 symposium: Influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and  
702 preimplantation embryo resistance to increased temperature. *Journal of Animal Science* **9** 1143-  
703 1153.
- 704 **Payton RR, Rispoli LA, Saxton AM, Edwards L** 2011 Impact of heat stress exposure during  
705 meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. *Journal*  
706 *of Reproduction and Development* **57** 481-491.
- 707 **Pereira AM, Baccari Jr F, Titto EA, Almeida JA** 2008 Effect of thermal stress on  
708 physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana,  
709 Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. *International Journal Biometeorology* **52** 199-  
710 208.
- 711 **Pfaffl MW** 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.  
712 *Nucleic Acids Research* **29** e45.

- 713 **Putney DJ, Malayer JR, Gross TS, Thatcher WW, Hansen PJ, Drost M** 1988 Heat stress-  
714 induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured  
715 bovine conceptuses and uterine endometrium. *Biology of Reproduction* **39** 717-28.
- 716 **Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF** 2003 Assumption-free analysis of  
717 quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* **339** 62–66.
- 718 **Rhoads ML, Rhoads RP, VanBaale MJ, Collier RJ, Sanders SR, Weber WJ, Crooker BA,**  
719 **Baumgard LH** 2009 Effects of heat stress and plane of nutrition on lacting Holstein cows: I.  
720 production, metabolism, and aspects of circulating somatropin. *Journal of Dairy Science* **92**  
721 1986-1997.
- 722 **Rispoli LA, Payton RR, Gondro C, Saxton AM, Nagle KA, Jenkins BW, Schrick FN,**  
723 **Edwards JL** 2013 Heat stress effects on the cumulus cell surrounding the bovine oocyte during  
724 maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. *Reproduction* **146**  
725 193-207.
- 726 **Rivera RM, Hansen PJ** 2001 Development of cultured bovine embryos after exposure to high  
727 temperatures in the physiological range. *Reproduction* **121** 107-115.
- 728 **Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel**  
729 **W** 1998 High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus*  
730 but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* **49** 657-665.
- 731 **Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF** 2010 Formation of the ovarian follicular antrum and  
732 follicular fluid. *Biology of Reproduction* **82** 1021-1029.
- 733 **Rodrigues TA, Ispada J, Ticianelli JS, Risolia PHB, Lima RS, Assumpção MEOA,**  
734 **Visintin JA, Paula-Lopes FF** 2012 The role of insulin-like growth factor-I on heat-induced  
735 cytoskeletal changes in bovine oocytes. *Animal Reproduction* **9** 478 (abstract).
- 736 **Roman-Ponce H, Thatcher WW, Canton D, Barron DH, Wolcox CJ** 1978 Thermal stress  
737 effects on uterine blood flow in dairy cows. *Journal of Animal Science* **46** 175-180.
- 738 **Roth Z, Meidan R, Braw-tal R, Wolfenson D** 2000 Immediate and delayed effects of heat  
739 stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration  
740 in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* **120** 83-90.

- 741 **Roth Z, Hansen PJ** 2004 Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence  
742 of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction* **71** 1898-1906.
- 743 **Roth Z, Hansen PJ** 2005 Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal  
744 elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* **129** 235-  
745 244.
- 746 **Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJ, Wiltbank MC** 2004 Comparison of ovarian  
747 function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows.  
748 *Journal of Dairy Science* **87** 905-920.
- 749 **Sartori R, Bastos MR, Baruselli PS, Gimenes LU, Ereno RL, Barros CM** 2010  
750 Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos*  
751 *indicus* cattle in a tropical environment. *Society of Reproduction and Fertility* **67** 357-375.
- 752 **Sato M, Bremner I** 1993 Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biology and*  
753 *Medicine* **14** 325-337.
- 754 **Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A** 2008 Rab GTPases at a  
755 glance. *Journal of Cell Science* **120** 3905-3910.
- 756 **Shimizu K, Shirataki H, Honda T, Minami S, Takai Y** 1998 Complex formation of  
757 SMAP/KAP3, a KIF3A/B ATPase motor-associated protein, with a human chromosome-  
758 associated polypeptide. *Communication* **273** 6591-6594.
- 759 **Smyth G** 2005 Limma: Linear models for microarray data. In 'Bioinformatics and  
760 computational biology solutions using r and bioconductor. Ed. VC R Gentleman, S Dudoit, R  
761 Irizarry, W Huber Springer: New York.
- 762 **Sudano MJ, Caixeta ES, Paschoal DM, Martins A, Machado R, Buratini J, Landim-  
763 Alvarenga FD** 2013 Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus*  
764 and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Reproduction, Fertility and*  
765 *Development*. <http://dx.doi.org/10.1071/RD13099>.
- 766
- 767



- 768 **Tachiyama R, Ishikawa D, Matsumoto M, Nakayama KI, Yoshimori T, Yokota S,**  
769 **Himeno M, Tanaka Y, Fujita H** 2011 Proteome of ubiquitin /MVB pathway: possible  
770 involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation.  
771 *Genes to Cells* **16** 448–466.
- 772 **Takeda S, Yamazaki H, Seog DH, Kanai Y, Terada S, Hirokawa N** 2000 Kinesin  
773 superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associating vesicles important for neurite  
774 building. *Journal of Cell Biology* **148** 1255-1265.
- 775 **Takemura R, Nakata T, Okada Y, Yamazaki H, Zhang Z, Hirokawa N** 1996  
776 mRNA expression of KIF1A, KIF1B, KIF2, KIF3A, KIF3B, KIF4, KIF5, and cytoplasmic  
777 dynein during axonal regeneration. *Journal of Neuroscience* **16** 31-35.
- 778 **Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A** 2002 Minireview: functions of  
779 the *cumulus* oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Molecular*  
780 *Reproduction and Development* **61** 414–424.
- 781 **Tatemoto H, Sakurai N, Muto N** 2000 Protection of porcine oocytes against apoptotic cell  
782 death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of*  
783 *Reproduction* **63** 805-810.
- 784 **Tesfaye D, Ghanem N, Carter F, Fair T, Sirard MA, Hoelker M, Schellander K, Lonergan**  
785 **P** 2009 Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes  
786 matured either in vivo or in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* **21** 451-461.
- 787 **Torres-Júnior JR, Pires MFA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA, Ramos**  
788 **AA, Folhadella IM, Polisseni J, Freitas C et al.** 2008 Effect of maternal heat-stress on  
789 follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* **69** 155-166.
- 790 **Trouson A, Anderiesz C, Jones G** 2001 Maturation of human oocytes *in vitro* and their  
791 developmental competence. *Reproduction* **121** 51-75.
- 792 **Udvardi M, Czechowski T, Scheible WR** 2008 Eleven golden rules of quantitative RT-PCR.  
793 *Plant Cell* **20** 1736–1737.

- 794 **Vasconcelos MH, Tam SC, Hesketh JE, Reid M, Beattie JH** 2002 Metal- and tissue-  
795 dependent relationship between metallothionein mRNA and protein. *Toxicology and*  
796 *Applied Pharmacology* **182** 91-97.
- 797 **Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gümen A** 2006 Changes in reproductive  
798 physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* **65** 17-  
799 29.
- 800 **Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, Braw-Tal R,**  
801 **Berman A** 1995 Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in  
802 lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction* **52** 1106-1113.
- 803 **Wu C, Rui R, Dai J, Zhang C, Ju S, Xie B, Lu X, Zheng X** 2006 Effects of cryopreservation  
804 on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes.  
805 *Molecular Reproduction and Development* **73** 1454-1462.
- 806 **Yamazaki H, Nakata T, Okada Y, Hirokawa N** 1996 Cloning and characterization of KAP3:  
807 A novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B. *Proceedings of the National*  
808 *Academy of Sciences* **93** 8443-8448.
- 809 **Yoshida M** 1993 Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro.  
810 *Molecular Reproduction and Development* **35** 76-81.
- 811 **Yoshimura S, Gerondopoulos A, Linford A, Rigden DJ, Barr FA** 2010 Family-wide  
812 characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors. *Journal of Cell Biology*  
813 **191** 367-381.
- 814 **Zhou Z, Kang YJ** 2000 Immunocytochemical localization of metallothionein and its relation  
815 to doxorubicin toxicity in transgenic mouse heart. *American Journal of Pathology* **156** 1653-  
816 1662.
- 817
- 818
- 819
- 820
- 821

822 **FIGURE LEGENDS**

823

824 **Figure 1.** Venn Diagram illustrating genes differentially expressed between Breed (red -  
825 127 genes), Temperature (blue - 9 genes) and Breed x Temperature interaction (green -  
826 6 genes). Intersections indicate common genes.

827

828 **Figure 2.** Biological processes from oocyte differentially expressed genes involved in  
829 each of the following effects: Breed (A), Temperature (B) and Breed x Temperature  
830 interaction (C). Data were obtained through *Ingenuity Pathways Analysis* software.

831

832 **Figure 3.** Quantification (fold change  $\log_2$ ) of the mRNA profile in oocyte selected  
833 genes. *KIF3A*, *CLDN11*, *BIRC3* and *DAP* genes were differentially expressed between  
834 Breed; *MTIE* gene was differentially expressed between Temperature; *CCT4*, *DICER1*  
835 and *DENND3* were differentially affected by Breed x Temperature interaction. Gray  
836 bars represent the differential level of expression of transcripts detected in the  
837 microarray study, while white bars represent the differential level of expression of the  
838 same transcripts obtained by real-time PCR. Pearson's correlation coefficient between  
839 PCR and microarray fold change values is  $r = 0.7853$  ( $P = 0.02$ ).

840

841 **Figure 4.** Breed (Holstein and Nelore - A) and Temperature (control and heat shock -  
842 B) effects on oocyte mRNA abundance of differentially expressed genes. Results are  
843 least-squares means  $\pm$  SEM of 3 replicates using 75 oocytes per group. (\* $P < 0.05$ ).  
844 Gene names are described in Table 1.

845

846

847 **Figure 5.** Breed x Temperature interaction effect on oocyte mRNA abundance of  
848 differentially expressed genes. Results are least-squares means  $\pm$  SEM of 3 replicates  
849 using 75 oocytes per group. Different superscripts above each bar indicate  $P < 0.001$ .  
850 Gene names are described in Table 1. (HS: heat shock).

851

852 **Figure 6.** Breed (Holstein and Nelore - A) and Temperature (control and heat shock -  
853 B) effects on cumulus cells mRNA abundance. Results are least-squares means  $\pm$  SEM  
854 of 5 replicates. Significant differences are indicated by \* $P < 0.05$  and \*\* $P = 0.06$ . Gene  
855 names are described in Table 1.

856

857 **Supplementary Figure 1.** Environmental temperature (ET;  $^{\circ}\text{C}$ ; black triangle) and  
858 relative humidity (RH; %; black circle) by hour during OPU period. Results are least  
859 squares means  $\pm$  SEM.

860

861 **Supplementary Figure 2.** Characterization of animal comfort and heat stress according  
862 to the Temperature and Humidity Index (THI) during the experimental period (99 days).  
863 Results are least squares means  $\pm$  SEM.

864

865 **Supplementary Figure 3.** Rectal temperature (Panel A) and respiration rate (Panel B)  
866 of Holstein and Nelore animals measured during OPU. Results are least squares means  
867  $\pm$  SEM. (\* $P < 0.05$ ).

**Table 1.** Selected genes for validation by RT-PCR.

<b>Representative Public ID</b>	<b>Gene Title</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Fold change</b>	<b>P-value</b>
<b>BREED</b>				
<i>Up-regulated in Holstein oocytes</i>				
CB167318	kinesin family member 3	<i>KIF3A</i>	10.83	0.0032
CB442788	claudin 11	<i>CLDN11</i>	4.01	0.0286
CB448293	baculoviral IAP repeat-containing 3	<i>BIRC3</i>	3.65	0.0037
<i>Down-regulated in Holstein oocytes</i>				
CK975976	death-associated protein	<i>DAP</i>	1.53	0.0382
<b>TEMPERATURE</b>				
<i>Down-regulated in heat-shocked oocytes</i>				
BE685559	metallothionein 1E	<i>MT1E</i>	-1.52	0.0436
<b>BREED vs. TEMPERATURE</b>				
CB451598	chaperonin containing TCP1, subunit 4	<i>CCT4</i>	-1.61	0.0259
CB446568	DENN/MADD domain containing 3	<i>DENND3</i>	-1.68	0.0318
NM_203359.1	dicer 1, ribonuclease type III	<i>DICER1</i>	-1.77	0.0400

**Table 2.** Primers sequences and amplicon size (base pairs – bp) used for RT-PCR.

<b>Gene</b>	<b>Strand</b>	<b>Primer Sequence</b>	<b>Size (bp)</b>
<i>KIF3A</i>	Foward	5'-GCAGACTCCAGTTCCAGATAAA-3'	90
	Reverse	5'-CGAAGGCTTTCCTCAGTATAGG-3'	
<i>CLDN11</i>	Foward	5'-TCTCAGCTCCAAGGTCACCTA-3'	126
	Reverse	5'-CCTCACCTTACAAGAGGGAAA-3'	
<i>BIRC3</i>	Foward	5'-GACTGAGGTGTTGGGAATCTG-3'	119
	Reverse	5'-ACTGGCTTGAACCTCGACTAATG-3'	
<i>DAP</i>	Foward	5'-CACCAGAGAAGAGAAGGACAAG-3'	86
	Reverse	5'-CGATGACTCCGGAGATAAACAC-3'	
<i>MTIE</i>	Foward	5'-CTCTACTTTGCCACTTGCTTTG-3'	137
	Reverse	5'-CTTCTTGACAGGAGGGACATC-3'	
<i>CCT4</i>	Foward	5'-GCTGAGGAGGTCAGCTTAAAT-3'	148
	Reverse	5'-CACAGAGAGCATCATGGATAGAG-3'	
<i>DENND3</i>	Foward	5'-GTGGGAACATCACCTACTCTAAC-3'	91
	Reverse	5'-CTC TGG ACC CTC TGA ATG AAC-3'	
<i>DICER1</i>	Foward	5'-CGTTTACTCATCTGGCTCCTAAA-3'	108
	Reverse	5'-CAACAATGGAGGCTCGAAGA-3'	
<i>ACTB</i>	Foward	5'-GCGTGGCTACAGCTTCACC-3'	55
	Reverse	5'-TTGATGTCACGGACGATTTC-3'	
<i>RPL15</i>	Foward	5'-CTCATCGTTGGTGCCAATGCAAGT-3'	192
	Reverse	5'-TCACATCCACCCTGGGAAACAGAA-3'	
<i>RPL30</i>	Foward	5'-TGGTGTCCATCACTACAGTGGCAA-3'	133
	Reverse	5'-ACCAGTCTGTTCTGGCATGCTTCT-3'	
<i>GAPDH</i>	Foward	5'-GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA-3'	119
	Reverse	5'- CCCTCCACGATGCCAAAG-3'	
<i>PPIA</i>	Foward	5'- GCCATGGAGCGTTTTGG-3'	65
	Reverse	5'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-3'	



**Figure 1.** Venn Diagram illustrating genes differentially expressed between Breed (red - 127 genes), Temperature (blue - 9 genes) and Breed x Temperature interaction (green - 6 genes). Intersections indicate common genes.

**Table 3.** Differentially expressed genes in Holstein and Nelore oocytes (Breed effect).

Representative Public ID	Gene Title	Gene Symbol	Fold change	P-value
<i>Up-regulated in Holstein oocytes</i>				
CB167318	kinesin family member 3 <sup>a</sup>	<i>KIF3A</i>	10.83	0.0032
AV606331	synaptotagmin IV	<i>SYT4</i>	5.47	0.0404
CK972321	4102775 BARC 9BOV Bos taurus cDNA clone 9BOV24_C22 3', mRNA sequence	----	5.43	0.0334
CK776415	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	<i>AHSA1</i>	5.29	0.0185
AW325978	----	----	5.28	0.0018
BE749242	C0009505I05.Q1KM13R KN510 Bos taurus cDNA clone C0009505I05 3', mRNA sequence	----	4.75	0.0105
CB455872	713054 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence	----	4.21	0.0344
CB442788	claudin 11	<i>CLDN11</i>	4.01	0.0286
CK772462	mitochondrial ribosomal protein L39	<i>MRPL39</i>	3.81	0.0278
BE750213	claudin 23	<i>CLDN23</i>	3.67	0.0086
CB448293	baculoviral IAP repeat-containing 3	<i>BIRC3</i>	3.65	0.0037
BP106440	roundabout, axon guidance receptor homolog 1 (Drosophila)	<i>ROBO1</i>	3.41	0.0215
BF775460	Arginyltransferase 1	<i>ATE1</i>	3.27	0.0247
CB453664	zinc finger protein 398	<i>ZNF398</i>	3.27	0.0426
CK846085	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)	<i>SIRT1</i>	3.26	0.0271
CK972862	Bos taurus HAUS augmin-like complex, subunit 8	<i>HAUS8</i>	3.12	0.0443
BI848481	male-specific lethal 3 homolog (Drosophila)	<i>MSL3</i>	3.09	0.0378
CK847223	Vpr (HIV-1) binding protein	<i>VPRBP</i>	3.05	0.0331
CK968849	RAD17 homolog (S. pombe)	<i>RAD17</i>	3.02	0.0294
BM251601	F-box and leucine-rich repeat protein 3	<i>FBXL3</i>	2.99	0.0319
CK848518	ankyrin repeat and SOCS box-containing 3	<i>ASB3</i>	2.96	0.0092
BI774268	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 2	<i>PLEKHA2</i>	2.95	0.0101
CB428813	activating transcription factor 1	<i>ATF1</i>	2.82	0.0360
CK777897	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1	<i>YES1</i>	2.78	0.0331
CB537961	ADP-ribosylation factor-like 1	<i>ARL1</i>	2.78	0.0102
CB460407	coiled-coil domain containing 112	<i>CCDC112</i>	2.77	0.0226
BM107454	similar to RAB18, member RAS oncogene family /// RAB18, member RAS oncogene family	LOC616304 /// RAB18	2.56	0.0224
CB440290	----	----	2.56	0.0299
CK777386	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1	<i>NEDD1</i>	2.55	0.0163
CK970460	kelch-like 2, Mayven (Drosophila)	<i>KLHL2</i>	2.50	0.0332
BI849511	uncharacterized LOC100852378	LOC100852378	2.48	0.0363
CK727557	bend_0A01-008-d12 Day 8 Uterus bend Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence	----	2.45	0.0466
CB445505	----	----	2.39	0.0450
CB421648	594684 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence	----	2.37	0.0458
CK964049	4078547 BARC 9BOV Bos taurus cDNA clone	----	2.27	0.0256



	9BOV13_B12 5', mRNA sequence			
CB464732	Bos taurus GTP binding protein 4	<i>GTPBP4</i>	2.25	0.0235
CB451120	DNA topoisomerase II, beta isozyme /// topoisomerase (DNA) II beta 180kDa	LOC787143 /// TOP2B	2.21	0.375
CB165419	transmembrane protein 181	<i>TMEM181</i>	2.18	0.0497
CK770689	958892 MARC 1BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence.	----	2.18	0.0101
CK979673	uncharacterized LOC100847840	LOC100847 840	2.16	0.0171
CK967025	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency. complementation group 6	<i>ERCC6</i>	2.15	0.0327
CK846762	similar to Chromosome X open reading frame 57	LOC511907	2.15	0.0075
CK946910	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	<i>F2RL1</i>	2.11	0.0430
AW654046	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	<i>ATPAF1</i>	2.10	0.0061
AW668954	small nuclear ribonucleoprotein 48kDa (U11/U12)	<i>SNRNP48</i>	2.05	0.0125
CK946184	retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive)	<i>RP2</i>	2.04	0.0429
CK846775	969322 MARC 4BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence.	----	1.98	0.0129
CK776519	967837 MARC 4BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence	----	1.96	0.0138
BE668935	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast)	<i>UPF3A</i>	1.95	0.0037
NM_178320.2	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	<i>PPIA</i>	1.95	0.0433
CK959025	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1. 37kDa)	<i>HNRNPD</i>	1.93	0.0474
AW336381	RAB27A. member RAS oncogene family	<i>RAB27A</i>	1.89	0.0360
CB451166	705913 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence	----	1.87	0.0454
CK950528	LSM1 homolog. U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	<i>LSMI</i>	1.87	0.0130
NM_203359.1	dicer 1. ribonuclease type III	<i>DICER1</i>	1.87	0.0284
BP101546	hypothetical protein LOC613274	LOC613274	1.86	0.0223
CB428865	F-box protein 22	<i>FBXO22</i>	1.86	0.0306
BP100422	BP100422 ORCS bovine liver cDNA Bos taurus cDNA clone ORCS20428 3', mRNA sequence.	----	1.85	0.0295
CB169241	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1	<i>FAHD1</i>	1.83	0.0334
CB166510	splicing factor 3b. subunit 2. 145kDa	<i>SF3B2</i>	1.80	0.0449
BM363690	PHD finger protein 11	<i>PHF11</i>	1.74	0.0330
CK772848	similar to Chromosome 17 open reading frame 63	LOC506074	1.74	0.0227
CK775501	calmodulin-like 4	<i>CALML4</i>	1.74	0.0440
CK729309	Cortactin-binding protein 2 (CortBP2)	LOC530341	1.71	0.0284
BP103418	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1. 75kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	<i>NDUFS1</i>	1.71	0.0470
BI899164	transmembrane protein 64	<i>TMEM64</i>	1.69	0.0475
CK770586	nidogen 2 (osteonidogen)	<i>NID2</i>	1.69	0.0480
BP102089	family with sequence similarity 122B	<i>FAM122B</i>	1.68	0.0355
CK946415	acyl-CoA oxidase 1. Palmitoyl	<i>ACOX1</i>	1.67	0.0226
CK955814	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	<i>ENPP2</i>	1.64	0.0154
BE722703	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)	<i>TIMM13</i>	1.64	0.0384
CK846596	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 1	<i>PRRG1</i>	1.58	0.0467

CB437963	-----	-----	1.57	0.0284
AV613409	adrenergic. beta. receptor kinase 2	<i>ADRBK2</i>	1.54	0.0481
CK947524	-----	-----	1.54	0.0038
NM_174767.2	visual system homeobox 1	<i>VSX1</i>	1.54	0.0308
NM_175785.2	ATPase. Ca <sup>++</sup> transporting. type 2C. member 1	<i>ATP2C1</i>	1.53	0.0148
AW631892	hypothetical protein LOC100140164	LOC100140164	1.52	0.0130
AU275513	inosine triphosphatase (nucleoside triphosphate pyrophosphatase)	<i>ITPA</i>	1.52	0.0131
CK961806	4076044 BARC 9BOV Bos taurus cDNA clone 9BOV10_J05 3', mRNA sequence	-----	1.52	0.0439
CK964884	ZMYM6 protein	LOC618247	1.52	0.0312
CB461358	nucleoporin 62	LOC516074	1,50	0.0327

*Down-regulated in Holstein oocytes*

BE757556	-----	-----	-1.51	0.0346
CK848917	histidyl-tRNA synthetase	<i>HARS</i>	-1.51	0.0249
BE483227	169309 BARC 5BOV Bos taurus cDNA 5', mRNA sequence.	-----	-1.51	0.0138
CK845823	Homo sapiens polymerase (DNA directed). Gamma	<i>POLG</i>	-1.52	0.0153
CK775030	importin 9	<i>IPO9</i>	-1.53	0.0237
CK975976	death-associated protein	<i>DAP</i>	-1.53	0.0382
CB167910	pelota homolog (Drosophila)	<i>PELO</i>	-1.54	0.0409
CK976501	Signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae)	<i>SPCS3</i>	-1.54	0.0001
CK776838	phosphodiesterase 8B	<i>PDE8B</i>	-1.55	0.0172
BI535325	398771 MARC 4BOV Bos taurus cDNA 5', mRNA sequence.	-----	-1.56	0.0271
CK975798	-----	-----	-1.59	0.0103
CB421951	CD3g molecule. gamma (CD3-TCR complex)	<i>CD3G</i>	-1.60	0.0467
CK773978	962683 MARC 2BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence.	-----	-1.60	0.0082
CK968887	Family with sequence similarity 46. member B	<i>FAM46B</i>	-1.62	0.0460
CK951562	MAX dimerization protein 1	<i>MXD1</i>	-1.63	0.0130
CB468445	734266 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence	-----	-1.64	0.0044
CK777507	peroxisomal biogenesis factor 11 <sup>a</sup>	<i>PEX11A</i>	-1.66	0.0499
CK772584	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 1 (yeast)	<i>SCO1</i>	-1.68	0.0068
CK846593	969102 MARC 4BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence.	-----	-1.68	0.0196
CB437808	zinc finger protein 362	<i>ZNF362</i>	-1.69	0.0182
CB421497	594518 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence	-----	-1.69	0.0051
CK772342	G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like) /// similar to Probable G-protein coupled receptor 37 precursor (Endothelin B receptor-like protein 1) (ETBR-LP-1) (Parkin-associated endothelin receptor-like receptor) (PAELR)	<i>GPR37 // LOC790388</i>	-1.73	0.0024
CK950060	PREDICTED: Bos taurus transmembrane protein 87B	<i>TMEM87B</i>	-1.73	0.0183
CK957150	4097464 BARC 10BOV Bos taurus cDNA clone 10BOV3_F15 3', mRNA sequence	-----	-1.75	0.00006
CK953377	hypothetical LOC614796	<i>MGC157372</i>	-1.76	0.0215

CB426313	paraneoplastic antigen MA2	<i>PNMA2</i>	-1.77	0.0451
CB430767	-----	-----	-1.78	0.0474
X61612.1	ATPase. H+ transporting. lysosomal 70kDa. V1 subunit A	<i>ATP6V1A</i>	-1.79	0.0498
BI848836	two pore segment channel 1	<i>TPCN1</i>	-1.80	0.0133
CB421732	G protein-coupled receptor 155	<i>GPR155</i>	-1.87	0.0195
BF073634	similar to stromal membrane-associated GTPase-activating protein 2 /// small ArfGAP2	LOC790140 /// <i>SMAP2</i>	-1.92	0.0317
CB459849	RNA binding motif protein 25	<i>RBM25</i>	-1.92	0.0280
CB443312	-----	-----	-1.95	0.0284
CB451835	706630 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence	-----	-1.99	0.0045
CK952663	-----	-----	-2.00	0.0028
CK951211	-----	-----	-2.12	0.0084
CK774760	nipsnap homolog 3A	<i>NIPSNAP3A</i>	-2.13	0.0013
AW656161	Transmembrane protein 167B	<i>TMEM167B</i>	-2.15	0.0133
CK775789	transmembrane protein 97	<i>TMEM97</i>	-2.22	0.0410
CK948712	PREDICTED: Bos taurus A kinase (PRKA) anchor protein 12	<i>AKAP12</i>	-2.41	0.0085
BM445534	uncharacterized LOC100849050	LOC100849 050	-3.03	0.0364
CB461876	721905 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence	-----	-3.14	0.0475
CK770657	958857 MARC 1BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence.	-----	-3.16	0.0268
CK730220	Homo sapiens polypyrimidine tract binding protein 3	<i>PTBP3</i>	-3.27	0.0116
AW484451	60795 MARC 4BOV Bos taurus cDNA 5', mRNA sequence.	-----	-3.74	0.0004

---

**Table 4.** Differentially expressed genes in control and heat-shocked oocytes (Temperature effect).

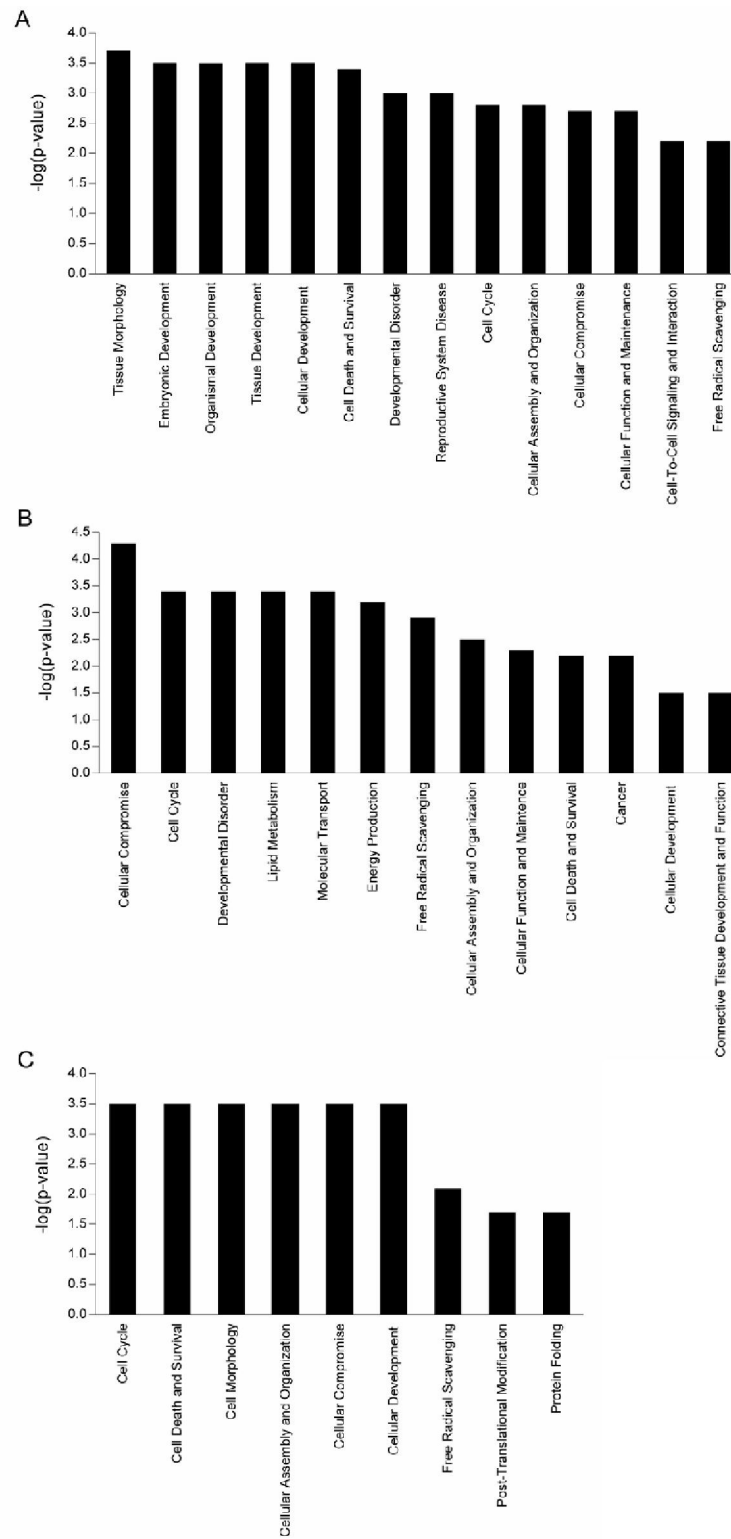
Representative Public ID	Gene Title	Gene Symbol	Fold change	P-value
<i>Up-regulated in heat-shocked oocytes</i>				
CK946415	acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl	<i>ACO1</i>	1.88	0.0084
CK950864	Gag-Pro-Pol-Env protein /// similar to envelope glycoprotein /// similar to envelope glycoprotein /// tetratricopeptide repeat domain 8	LOC782627 /// LOC786117 /// LOC787886 ///	1.62	0.0387
BE668935	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast)	<i>TTC8</i> <i>UPF3A</i>	1.52	0.0356
<i>Down-regulated in heat-shocked oocytes</i>				
BP100734	ribosomal protein, large, P1	<i>RPLP1</i>	-1.51	0.0421
BE685559	metallothionein 1E	<i>MT1E</i>	-1.52	0.0436
NM_174731.2	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed	<i>FAU</i>	-1.61	0.0403
CK978935	splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa	<i>SF3B4</i>	-1.62	0.0203
CB447642	coronin 1C	<i>CORO1C</i>	-1.67	0.0457
CK776273	chromosome 11 open reading frame 16	<i>C11ORF16</i>	-1.89	0.0360

**Table 5.** Differentially expressed genes affected by Breed x Temperature interaction in bovine oocytes.

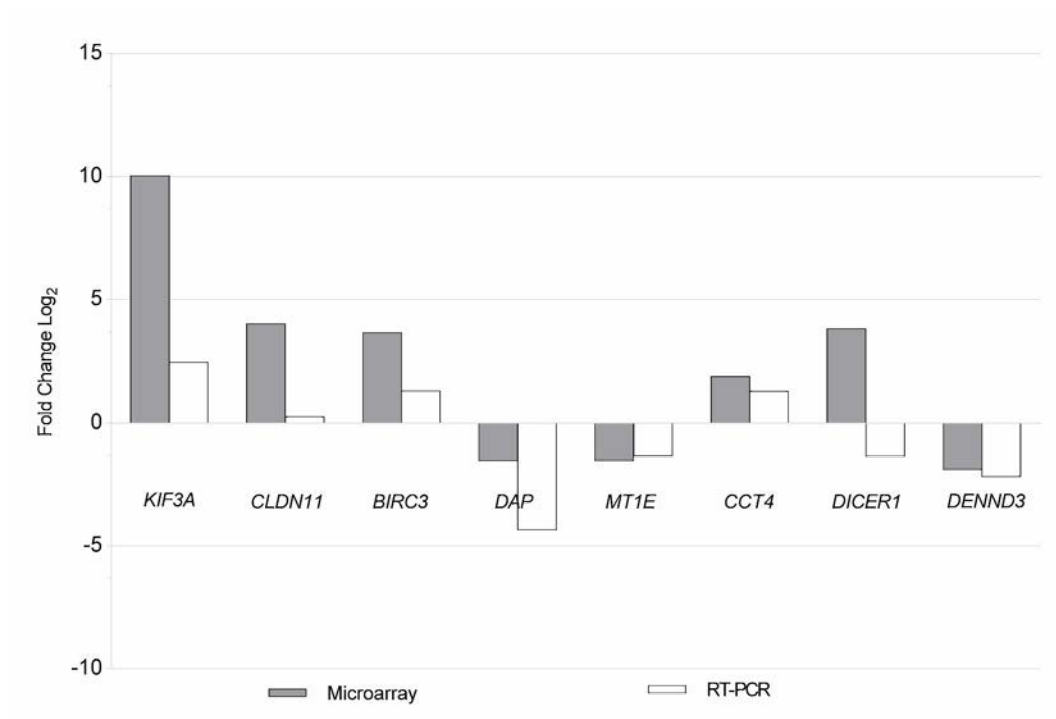
<b>Representative Public ID</b>	<b>Gene Title</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Fold change</b>	<b>P-value</b>
CK776338	oncostatin M receptor	<i>OSMR</i>	1.64	0.0303
CK728156	UMC-bend_0A02-007-a09 Day 8 Uterus bend Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence.	-----	1.51	0.0482
CK946415	acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl	<i>ACOX1</i>	-1.58	0.0359
CB451598	chaperonin containing TCP1, subunit 4	<i>CCT4</i>	-1.61	0.0259
CB446568	DENN/MADD domain containing 3	<i>DENND3</i>	-1.68	0.0318
NM_203359.1	dicer 1, ribonuclease type III	<i>DICER1</i>	-1.77	0.0400

**Table 6.** Further analysis of differentially expressed genes modulated by Breed x Temperature interaction in bovine oocytes.

<b>Gene Symbol</b>	<b>Contrast</b>	<b>Fold Change</b>	<b>P-value</b>	<b>Up-regulated</b>
<i>CCT4</i>	Hol Con X Hol HS	1,87	0,020	Hol HS
<i>ACOX1</i>	Hol Con X Hol HS	2,50	0,005	Hol HS
	Nel HS X Hol HS	2,48	0,007	Hol HS
<i>DICER1</i>	Nel HS X Hol HS	3,81	0,009	Hol HS
<i>OSMR</i>	Nel HS X Hol HS	-2,32	0,007	Nel HS
<i>DENND3</i>	Nel Con X Hol Con	-1,89	0,010	Nel Con

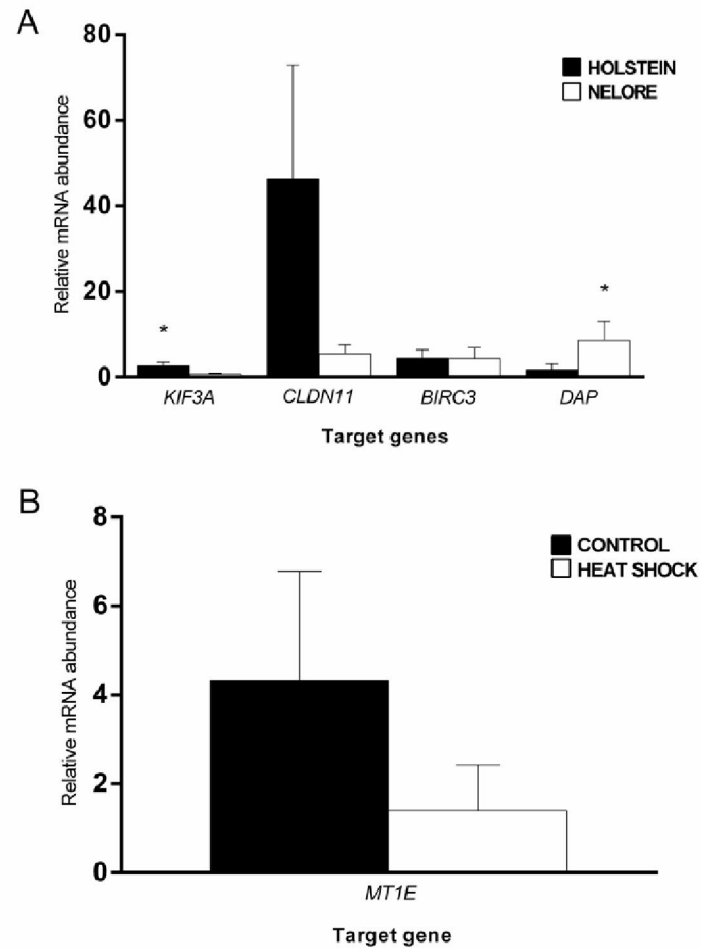


**Figure 2.** Biological processes from oocyte differentially expressed genes involved in each of the following effects: Breed (A), Temperature (B) and Breed x Temperature interaction (C). Data were obtained through *Ingenuity Pathways Analysis* software.

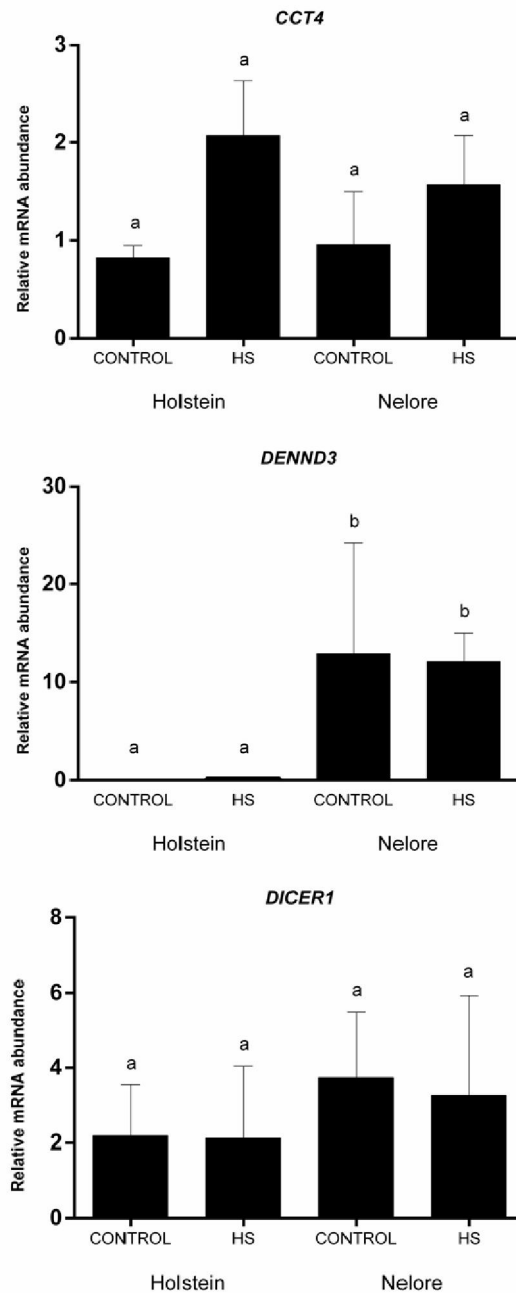


**Figure 3.** Quantification (fold change log<sub>2</sub>) of the mRNA profile in oocyte selected genes. *KIF3A*, *CLDN11*, *BIRC3* and *DAP* genes were differentially expressed between Breed; *MT1E* gene was differentially expressed between Temperature; *CCT4*, *DICER1* and *DENND3* were differentially affected by Breed x Temperature interaction. Gray bars represent the differential level of expression of transcripts detected in the microarray study, while white bars represent the differential level of expression of the same transcripts obtained by real-time PCR. Pearson's correlation coefficient between PCR and microarray fold change values is  $r = 0.7853$  ( $P = 0.02$ ).

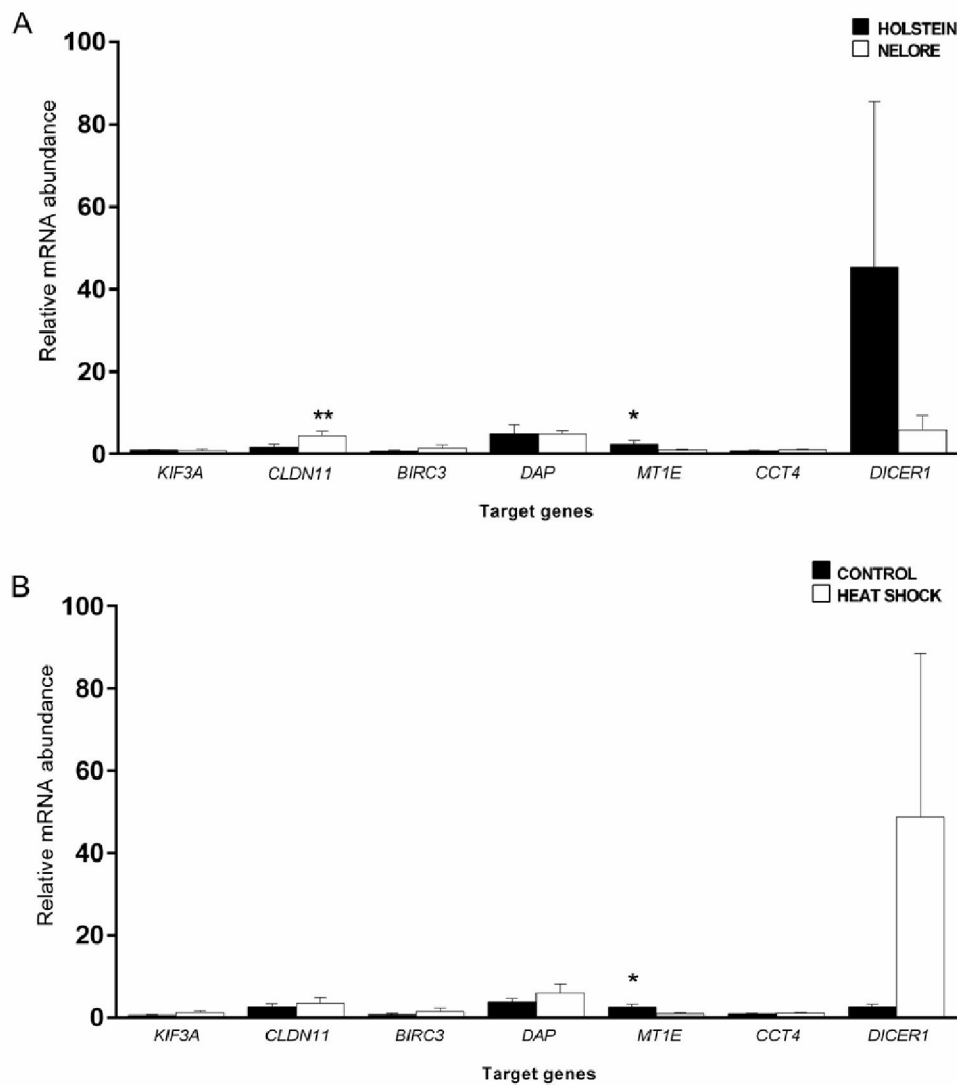




**Figure 4.** Breed (Holstein and Nelore - A) and Temperature (control and heat shock - B) effects on oocyte mRNA abundance of differentially expressed genes. Results are least-squares means  $\pm$  SEM of 3 replicates using 75 oocytes per group. (\* $P < 0.05$ ). Gene names are described in Table 1.

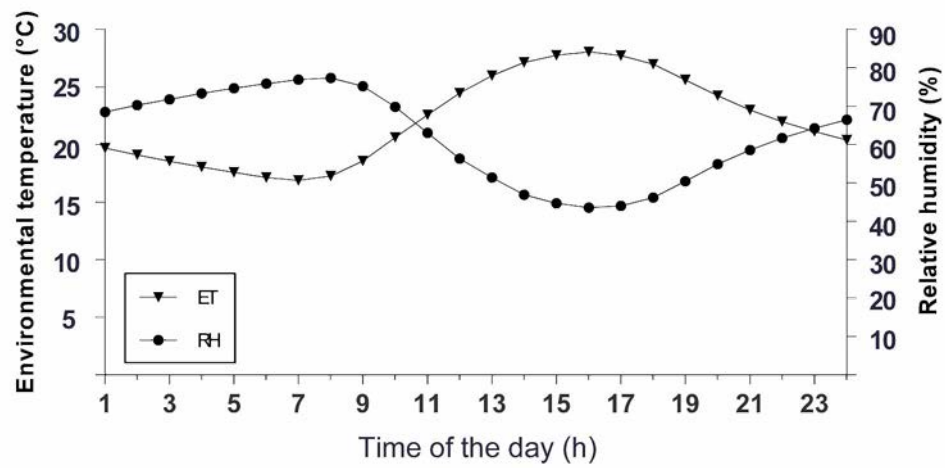


**Figure 5.** Breed x Temperature interaction effect on oocyte mRNA abundance of differentially expressed genes. Results are least-squares means  $\pm$  SEM of 3 replicates using 75 oocytes per group. Different superscripts above each bar indicate  $P < 0.001$ . Gene names are described in Table 1. (HS: heat shock).

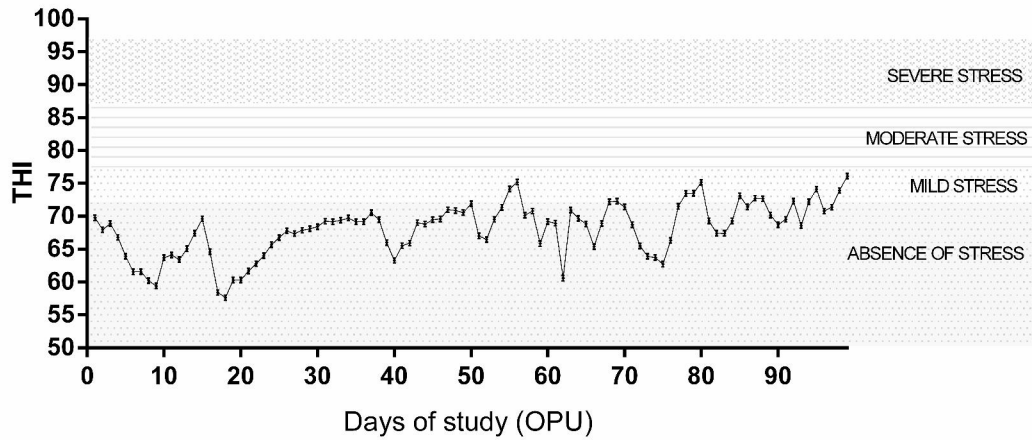


**Figure 6.** Breed (Holstein and Nelore - A) and Temperature (control and heat shock - B) effects on cumulus cells mRNA abundance. Results are least-squares means  $\pm$  SEM of 5 replicates. Significant differences are indicated by \* $P < 0.05$  and \*\* $P = 0.06$ . Gene names are described in Table 1.

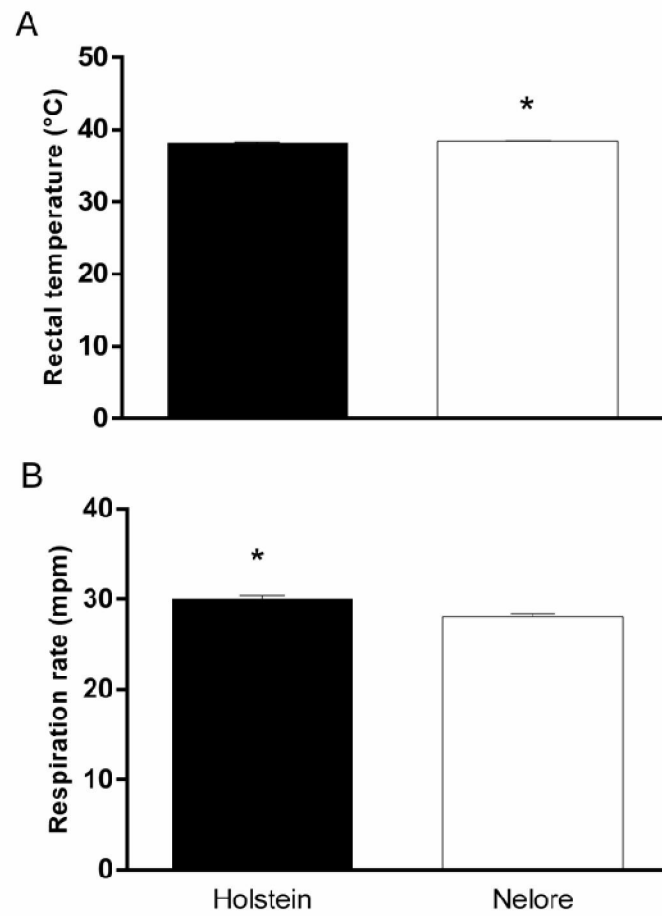
## SUPPLEMENTARY FIGURES



**Supplementary Figure 1.** Environmental temperature (ET; °C; black triangle) and relative humidity (RH; %; black circle) by hour during OPU period. Results are least squares means  $\pm$  SEM.



**Supplementary Figure 2.** Characterization of animal comfort and heat stress according to the Temperature and Humidity Index (THI) during the experimental period (99 days). Results are least squares means  $\pm$  SEM.



**Supplementary Figure 3.** Rectal temperature (Panel A) and respiration rate (Panel B) of Holstein and Nelore animals measured during OPU. Results are least squares means  $\pm$  SEM. (\* $P < 0.05$ ).

## 6 CONCLUSÕES

- 1- A exposição de CCOs de vacas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* ao estresse térmico durante as primeiras 12 horas de MIV alterou o padrão global de expressão gênica em oócitos e o perfil de genes específicos em células do cumulus.
- O perfil de expressão gênica global em oócitos das raças Nelore e Holandesa submetidos ao estresse térmico durante a MIV indicou uma forte diferença entre as raças e diferenças moderadas entre os fatores Temperatura ou Raça x Temperatura.
- A validação dos genes candidatos confirmou o forte efeito de raça em oócitos de Nelore e Holandesa. Entre os genes diferencialmente expressos destacaram-se aqueles relacionados à organização celular (*KIF3A*), morte celular (*DAP*) e tráfego intracelular de membrana (*DENND3*).
- O aumento da expressão do gene *DAP* em oócitos de Nelore indicou efeito bifásico, reduzindo o potencial de sobrevivência no oócito e aumentando o potencial de adaptação e sobrevivência embrionária inicial. O aumento da expressão do gene *DENND3* em oócitos de Nelore indicou maior potencial de sobrevivência ao estresse oxidativo. No entanto, o aumento da expressão de *KIF3A* em oócitos da raça Holandesa sugeriu maior organização do fuso meiótico nesta raça. Além disso, é possível que oócitos da raça Holandesa possuam baixo limiar ao estresse celular.
- A avaliação de genes candidatos nas CCs demonstrou efeito de raça (*MTIE* e *CLDN11*) e de temperatura (*MTIE*) na expressão de genes relacionados à organização celular e estresse oxidativo.
- A maior abundância relativa do RNAm *CLDN11* em CCs de Nelore indicou maior regulação no desenvolvimento folicular.
- A menor abundância do *MTIE* em CCs submetidas ao estresse térmico *in vitro* indicou que a temperatura elevada induziu ao uso desse RNAm resultando possivelmente na tradução da proteína em resposta ao estresse. Este transcrito também teve sua expressão diminuída em CCs de Nelore sugerindo que nestas células o mRNA do *MTIE* tenha sido traduzido e o antioxidante atuado nas próprias CCs e no oócito tornando estas células mais resistentes.

2- Oócitos e CCs de vacas *Bos taurus indicus* apresentaram expressão diferenciada de genes associados à sobrevivência celular em relação aos oócitos e células do cumulus *Bos taurus taurus*.

3- A exposição de oócitos bovinos ao estresse térmico durante a MIV não apresentou efeito marcante na expressão diferencial dos genes relacionados a termotolerância entre as diferentes subespécies. Sugere-se que a deficiência na proteção celular contra o estresse térmico na raça Holandesa possa acontecer a nível pós-transcricional e proteico. Já em CCs, a alta temperatura durante a MIV modulou os efeitos deletérios mediados pelo estresse oxidativo.