



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**EFEITO DA ADIÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES
INTRAFOLICULARES DE VACAS HOLANDESAS SUBMETIDAS AO
ESTRESSE TÉRMICO EM MEIO DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO***

Felipe Morales Dalanezi

Botucatu – SP
Fevereiro/2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**EFEITO DA ADIÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES
INTRAFOLICULARES DE VACAS HOLANDESAS SUBMETIDAS AO
ESTRESSE TÉRMICO EM MEIO DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO***

Felipe Morales Dalanezi

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Botucatu – SP

Fevereiro/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP –
Botucatu /SP

Dr^a. Bruna De Vita

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP –
Botucatu /SP

Prof^o. Dr^o. Anthony Cesar de Souza Castilho

Membro

Departamento de Pós graduação em ciência animal Universidade do Oeste Paulista
(UNOESTE), Presidente Prudente – SP

Data da Defesa: 26 de fevereiro de 2016.

SUMÁRIO

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Microvesículas e Exossomos.....	11
2.2. Estresse Térmico	16
2.3 Vesículas extracelulares e proteínas de choque térmico	20
3. HIPÓTESE	23
4. OBJETIVOS	34
5. REFERÊNCIAS	34

CAPITULO II – ARTIGOS

ARTIGO 1	36
1. RESUMO.....	36
2. INTRODUÇÃO	37
3. DESENVOLVIMENTO DO ASSUNTO	38
4. CONCLUSÃO	41
5. REFERÊNCIAS	42
ARTIGO 2	52
1. RESUMO.....	52
2. INTRODUÇÃO	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS	54
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5. RESULTADOS	61
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO	70
8. REFERÊNCIAS	71

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a minha família, meu pai Jose, minha mãe Maria Valeria e minha irmã Luciana, pois sem eles não poderia ter alcançado esse objetivo, principalmente pelo carinho e pela paciência.

Agradeço a minha namorada Jessica, que muito além de minha companheira foi minha amiga durante os últimos anos da minha jornada.

Agradeço ao professor João por me orientar durante esta etapa, pela horas discutindo os resultados e artigos, pela paciência e pelos ensinamentos.

Agradeço a meu amigo e idealizador deste projeto Anthony, que desde a iniciação científica me ajudou nos projeto e sempre foi um exemplo de pesquisador.

Agradeço aos colegas que tornaram esse projeto possível, Rodrigo, Carol, Julian, Henry, Carla, Fernanda e Patrícia,

Agradeço ao professor Papa que durante todo o mestrado manteve as portas do seu laboratório aberta e sempre me considerou um de seus orientados.

Agradeço aos colegas desde a residência Luis, Sidnei e Endrigo, e outros que ganhei durante o mestrado, Júnior, Rafaella, Bertiny e todos os outros colegas.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma ajudaram a tornar essa conquista possível.

DALANEZI, F.M. EFEITO DA ADIÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES INTRAFOLICULARES DE VACAS HOLANDESAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO EM MEIO DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO*. Botucatu – SP. 2016, p.89. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Vários são os componentes que tem a capacidade de interferir no metabolismo e desenvolvimento do oócito no interior do folículos, dentre esses fatores estão As EVs. Sendo assim o objetivo deste estudo foi avaliar a modulação da maturação oocitária *in vitro* pelas EVs extraídos de vacas submetidas ao estresse térmico (ET) ou não. Para tanto 12 vacas da raça holandesa foram submetidas ao ET e 12 vacas foram mantidas em condições de termo-neutralidade, em seguida tiveram seus folículos aspirados em dois momentos do ciclo estral (pré-ovulação e desvio). Após a separação das EVs do fluido folicular, e visualizados pela microscopia eletrônica. Então As EVs foram colocados em meio de maturação para avaliação da ação destas vesículas durante a maturação oocitária. Após 22 horas de maturação, os oócitos e as células do *cumulus* foram recuperados para posterior análise de progressão da maturação e também para expressão de genes de interesse. Não foi observada diferença estatística entre os grupos na análise de progressão meiótica nem na integridade do DNA. Indicando que As EVs não interferiram na morfologia oocitária. A expressão gênica no entanto demonstrou que genes relacionados a expansão do *cumulus* (BMP15, HAS2, GDF9, PTX3), metabolismo energético (BMP15, CPT1B, PFKF), IGF (IGFBP2 e 4) e apoptose (BCL2 e STAT3), apresentaram expressão diminuída no grupo termo-neutro. Os dados do nosso estudo indicam que o ambiente termo-neutro levou a uma sinalização intrafolicular das EVs com a finalidade de indicar uma situação favorável para o oócito.

Palavras-chave: oócito, fluido folicular, células do *cumulus*, expressão gênica

DALANEZI, F.M. EFFECT OF ADDITION OF EXTRACELLULAR VESICLES FROM FOLLICULAR FLUID OBTAINED OF HOLSTEINS COWS UNDER HEAT STRESS IN OOCYTE MATURATION *IN VITRO*. Botucatu – SP. 2016, p.89. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

There are several components that have the ability to interfere with the metabolism and development of the oocyte in side of follicles, among these factors are the EVs. Thus the aim of this study was to evaluate the modulation of oocyte maturation *in vitro* by EVs extracted from cows under heat stress or not. For that, 12 Holstein cows were subjected to heat stress and 12 cows were kept in a thermo-neutral conditions, then had their follicles aspirated in two stages of the estrous cycle (pre-ovulation and deviation). After separation of the EVs from follicular fluid, and visualized by electron microscopy. The EVs were placed in maturation medium for evaluation of the action of these vesicles during oocyte maturation. After 22 hours of maturation, oocytes and *cummulus* cells were recovered for further analysis of meiotic progression and for expression of genes of interest. There was no statistical difference between the groups in meiotic progression analysis or the DNA integrity. Indicating that the EVs not interfere in oocyte morphology. Gene expression however demonstrated that genes related to the expansion of the cumulus (BMP15, HAS2, GDF9, PTX3), energy metabolism (BMP15, CPT1B, PFKP), IGF (IGFBP2 and 4) and apoptosis (BCL2 and STAT3) showed decreased expression the thermo-neutral group. The data from our study indicate that the thermo-neutral environment led to a intrafollicular signaling EVs in order to indicate a favorable situation for the oocyte.

Keywords: oocyte, follicular fluid, cumulus cells, gene expression

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO

Regiões de clima tropical, apresentam verão com elevadas temperaturas médias, são bem conhecidos os decréscimos de fertilidade observados nos taurinos principalmente nos animais da raça Holandesa durante os meses mais quentes do ano. As perdas produtivas e reprodutivas associadas com o estresse térmico (ET) têm um significativo impacto econômico (IGONO; BJOTVEDT; SANFORD-CRANE, 1992). Estimou-se que em regiões tropicais essa perda chega a € 69.379,00 por ano na bovinocultura leiteira devido aos efeitos do ET (BONI; PERRONE; CECCHINI, 2014). Vacas sob ET podem diminuir sua produção de leite diária em até 40% (RHOADS et al., 2009). Já no âmbito da reprodução o ET ocasiona a diminuição do crescimento folicular, redução das concentrações séricas de estradiol, comprometimento da dominância folicular e, ainda, atraso no dia esperado da luteólise (WILSON et al., 1998); levando assim falhas na fecundação, falhas no desenvolvimento embrionário, e no reconhecimento materno da gestação (SARTORI et al., 2002; DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). Entretanto, os mecanismos fisiológicos que levam a infertilidade no verão são apenas parcialmente compreendidos.

A maturação oocitária é uma das etapas determinantes para o desenvolvimento adequado do oócito e, resultados insatisfatórios nesta fase alteram drasticamente o desenvolvimento, sobrevivência e implantação embrionárias (EPPIG, 2001; RIZOS et al., 2002; GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004; MCNATTY et al., 2004; GILCHRIST, 2011). O microambiente folicular fornece ao oócito as condições propícias para o desenvolvimento de competência oocitária, que é definida como o potencial de um oócito em maturar, ser fecundado, desenvolver-se até o estágio de blastocisto e consequentemente manter a gestação (SIRARD et al., 2006).

Dentre os vários fatores presentes neste microambiente encontram-se as vesículas extracelulares (EVs) as quais exibem funções biológicas pleiotrópicas (MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010). Por vários anos as EVs foram consideradas debris celulares e quando observadas pela microscopia eletrônica no sangue ou no espaço intersticial dos tecidos eram consideradas consequências de possíveis injúrias teciduais ou resultados da revitalização da membrana celular (SIEKEVITZ, 1972). Atualmente são reconhecidas como estruturas específicas (CAMUSSI et al., 2010). Os fatores que influenciam na

classificação dessas vesículas são o tamanho, o formato, as proteínas de membranas, alguns lipídios estruturais e a origem. A produção de EXOs ou MVs têm sido observadas em uma variedade de tipos celulares tais como: reticulócitos, plaquetas, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B, células dendríticas, células epiteliais de glândulas salivares, células acinares do pâncreas e células tumorais (BEAUDOIN; GRONDIN, 1991; ESCOLA et al., 1998; KAPSOGEORGOU et al., 2005; BHATNAGAR et al., 2007; IERO et al., 2008). Estudos mostram também a presença de EXOs e MVs em diversos fluidos biológicos como saliva, plasma, urina (PISITKUN; SHEN; KNEPPER, 2004; CABY et al., 2005; GONZALEZ-BEGNE et al., 2009; BERCKMANS et al., 2011) e também no líquido folicular de éguas (DA SILVEIRA et al., 2012). Essas EVs transportam principalmente, proteínas, microRNAs (miRNAs) e RNAs mensageiros (mRNAs) e sua bicamada lipídica protege esse biomaterial (TAYLOR; GERCEL-TAYLOR, 2013).

As EVs apresentam sua liberação estimulada por eventos que levam a injúria celular como estresse físico ou químico (RATAJCZAK et al., 2006). O ET leva a alterações metabólicas que geram este tipo estresse (BERNABUCCI et al., 2010). As EVs são liberadas por células foliculares e desempenham função importante na transferência de moléculas para a células da granulosa e oócito (SANG et al., 2013; DA SILVEIRA et al., 2015b). Com base no exposto o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do meio de maturação enriquecido com EVs do fluido folicular de vacas leiteiras submetidas ao ET, em oócitos oriundos de abatedouro maturados *in vitro*. Visando uma possível utilização dessas EVs na rotina de laboratórios de fertilização *in vitro*, pela criação de um banco de vesículas que pode auxiliar no desenvolvimento de oócitos de fêmeas criadas em condições de ET.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microvesículas e Exossomos

A comunicação intercelular é muito importante para garantir uma resposta uniforme dos diferentes componentes do tecido (CAMUSSI et al., 2010). As células podem se comunicar pelo fluído extracelular (MAJKA et al., 2001), por ligações mediadas por moléculas e por nanotubos que estabilizam a passagem de substâncias da superfície e de componentes do citoplasma (RUSTOM et al., 2004; SHERER; MOTHES, 2009).

A descoberta de estruturas circulares secretadas pelas células não é recente. Quando foram descobertas acreditava-se que eram resultado de um processo celular específico e, demonstrou-se que tinham função de transportar enzimas funcionais na mesma proporção encontrada no citoplasma das células de origem (DE BROE et al., 1977). Entretanto apenas estudos mais recentes demonstraram funções para as EVs secretadas por diversos tipos de células (CAMUSSI et al., 2010). Vesículas extracelulares são classificadas de acordo com o tamanho, morfologia, tipos de proteínas e lipídeos da membrana e a sua origem. As MVs e os EXOs apresentam, respectivamente, diâmetros entre 100 e 1000 nm e 40 a 150 nm (PAN et al., 1985; THÉRY et al., 2006).

As MVs são produzidas pela membrana plasmática enquanto que os EXOs são produzidos dentro de corpos multivesiculares e são secretados pela fusão entre a membrana plasmática e a membrana dos corpos multivesiculares (RAPOSO, 1996). As MVs se originam pela fusão entre a membrana endossomal e a membrana plasmática e após essa fusão, estes componentes celulares são liberados pela superfície celular (HEIJNEN et al., 1999; ROZMYSLOWICZ et al., 2003). Conforme a Vesiclepedia cita (KALRA et al., 2012), já foram descritas 43 mil proteínas, 342 lipídeos, 20 mil RNAs mensageiros e 2400 microRNAs no interior das EVs de diferentes tipos celulares e organismos.

Os EXOs foram primeiramente descritos como provenientes da diferenciação de reticulócitos, fazendo parte de um mecanismo de expulsão de moléculas sem utilidade para as células (HARDING; HEUSER; STAHL, 1983; PAN et al., 1985). Atualmente, já se sabe que os EXOs são produzidos pela internalização da membrana formando endossomos, que por sua vez são recobertos por outra membrana levando a formação dos corpos multivesiculares (MVBs) (Figura 1) (JOHNSTONE, 2006; THÉRY;

OSTROWSKI; SEGURA, 2009). Após essa formação ocorre a fusão entre os MVBs e a membrana plasmática e liberam os EXOs do seu interior (DE MAIO, 2011). Os EXOs podem ser liberados por vários tipos celulares como linfócitos B (RAPOSO, 1996) e T (BLANCHARD et al., 2002), macrófagos (BHATNAGAR et al., 2007) e mastócitos (RAPOSO et al., 1997).

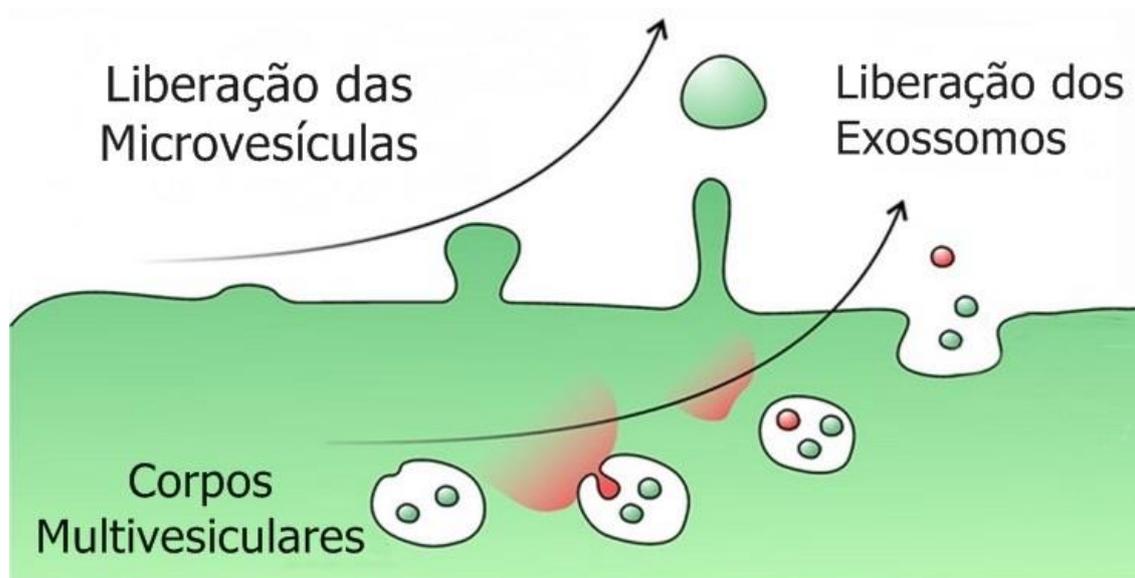


Figura 1. Demonstração da formação e liberação das microvesículas e exossomos.

(Adaptado de YELLON; DAVIDSON, 2014)

Os EXOs são liberados por exocitose e depende da ação do citoesqueleto e da ativação da proteína p53 (YU; HARRIS; LEVINE, 2006). As MVs são pouco maior que os EXOs (CAMUSSI et al., 2010), sendo assim a liberação das MVs se dá por protrusões do citoplasma celular seguido descolamento da vesícula pela membrana celular (CAMUSSI et al., 2010). Os níveis intracitoplasmáticos de íons cálcio alteram a distribuição dos fosfolípeos transmembrana por enzimas específicas levando a liberação das MVs (HUGEL et al., 2005).

O tamanho e o conteúdo das EVs dependem principalmente da célula de origem (CAMUSSI et al., 2010). Para a produção dos EXOs um complexo de proteínas chamado “endosomal sorting complex responsible for transport” (ESCRT), composto por quatro subunidades (0, I, II, III), apresenta um papel fundamental, as subunidades 0, I e II são responsáveis por capturar as proteínas de membrana que farão parte da membrana dos EXOs, já a subunidade III é responsável pela montagem da membrana dos EXOs (RAIBORG; STENMARK, 2009; HURLEY, 2010).

Após a chegada das EVs ao meio extracelular, elas podem manter-se na região onde originaram ou podem entrar em fluídos biológicos e exercer sua função em lugares distantes de sua origem, alguns exemplos de fluídos que podem transportar as EVs são urina, plasma, leite e fluído cérebro-espinhal (CAMUSSI et al., 2010). Também foram descritas no plasma seminal, fluído folicular e fluído uterino (TANNETTA et al., 2014). A grande parte das vesículas encontradas no sangue são derivadas de plaquetas (GEORGE et al., 1982) e em menor número das células endoteliais e outras células sanguíneas (MARTÍNEZ et al., 2005). Além de células saudáveis, células neoplásicas também podem liberar EVs, que são encontradas em vários fluídos biológicos (KIM et al., 2003; IERO et al., 2008). A liberação das EVs pode ser uma consequência da ação de solutos agonistas, ou estresse físico ou químico como estresse oxidativo, hipóxia ou por descontinuidade do tecido (RATAJCZAK et al., 2006).

As EVs apresentam importante função no espaço intercelular e desempenha um papel de regulação da comunicação entre as células (CAMUSSI et al., 2010). Esta hipótese é fundamentada em observações que demonstraram que EVs liberadas pela célula doadora podem interagir com receptores específicos em outras células promovendo na célula alvo uma estimulação direta ou transferindo receptores de ligação (JANOWSKA-WIECZOREK et al., 2001; MOREL et al., 2004). Esta interação pode ser limitada por uma ligação a um receptor na membrana da célula alvo, concretizando uma plataforma de recebimento dos complexos multimoleculares ou conduzindo um sinal para a célula, ambos processos necessitam da internalização das EVs (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009). Quando internalizadas as EVs podem fundir suas membranas com os endossomos e liberar seu conteúdo no citoplasma das células alvo; outro caminho que as vesículas podem seguir é pela não ligação com os endossomos e ocorrer a transferência destas para os lisossomos ou serem descartadas pela fusão com a membrana plasmática (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009).

As principais funções descritas para as EVs são atividade pró-coagulante, aumento da capacidade invasiva dos tumores, indução de transformação de uma célula normal a uma célula cancerígena e comunicação materno fetal (GYÖRGY et al., 2011; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

As EVs possuem quatro formas básicas de ação descritas: estimulação direta das células alvo, transferência de receptores entre células distintas, movimentação de

proteínas de uma célula a outra e passagem de informação genética entre células (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009).

Estimulação direta entre células pelas EVs ocorre nas plaquetas, quando ativadas liberam vesículas contendo fatores teciduais que interagem com neutrófilos, macrófagos e outras plaquetas pela ligação com moléculas da parede celular (POLGAR; MATUSKOVA; WAGNER, 2005). Por outro lado, EVs liberadas por leucócitos ativam a aglutinação de plaquetas (ANDREWS; BERNDT, 2004).

Outra maneira de atuação das EVs ocorre pela transferência de receptores como nos linfócitos B que rapidamente adquirem receptores para os antígenos provenientes de outros linfócitos B ativados (QUAH et al., 2008). Este processo auxilia na rápida difusão da resposta a antígenos específicos (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009). Pode ainda ocorrer a migração de vírus pelas EVs, essa hipótese é denominada “Trojan exosome hypothesis” (GOULD; BOOTH; HILDRETH, 2003).

A transferência de proteínas de uma célula para outra é uma função que as EVs também podem desempenhar; como ocorre no mecanismo de envio de caspase-1 por uma célula morta para outra célula viva. Ainda os monócitos ativados por endotoxinas podem liberar EVs contendo caspase-1 que será responsável pela morte de células da musculatura estriada (SARKAR et al., 2009).

A passagem de informação genética entre células pelas EVs foi demonstrada pela marcação do mRNA das EVs e após a interação entre as vesículas e as células alvos foi observada a produção de uma proteína específica que apresentava em sua formação o marcador introduzido nas EVs (DEREGIBUS et al., 2007).

A sinalização entre células pelas EVs é importante e, foi observado que a estimulação celular por uma vesícula é 250 vezes maior que a estimulação direta via soluto extracelular. Essa maior eficácia está relacionada a uma vesícula conter vários sinalizadores de várias vias diferentes, catalisando assim o processo de sinalização (VEGA et al., 2008).

Uma outra característica importante das EVs é poder atuar em células distantes de sua origem, protegendo seu conteúdo de possíveis alterações moleculares devido as alterações de meios pelo qual a mesma atravessa. Além disso as EVs possuem moléculas

em sua parede que agem como um endereço, sendo reconhecido apenas pelas células alvos (DE MAIO, 2011).

A primeira observação de EVs em fluido folicular de mamíferos foi descrita em éguas, pela microscopia eletrônica e citometria de fluxo. Após a constatação da existência das mesmas foi estudado a capacidade das vesículas em penetrar nas células da granulosa. Com o uso de EVs marcadas por fluorescência demonstrou-se a capacidade das vesículas em adentrar às células da granulosa tanto *in vivo* como *in vitro* (DA SILVEIRA et al., 2012). Outro grupo de pesquisadores observou que miRNAs presentes em EXOs isolados de fluido folicular de bovinos estão associados com a maturação oocitária, sugerindo que estes miRNAs podem ser utilizados como marcadores de qualidade oocitária (SOHEL et al., 2013).

Ainda não está claro se as células do *cumulus*, as células da granulosa e ou os oócitos secretam as EVs. O primeiro passo foi a realização da microscopia eletrônica do fluido folicular de folículos entre 3 e 6 mm de diâmetro, normalmente usados em procedimentos de aspiração para coleta de oócitos, assim pode-se observar a presença de MVBs contendo EXOs no interior das células da granulosa e células do *cumulus*, sugerindo então que estes tipos celulares produzem e liberam as EVs para o fluido folicular (DA SILVEIRA et al., 2015a).

Estudos levantaram a hipótese de que os EXOs desempenham função importante de transferir moléculas para a células da granulosa, na metade e no fim do ciclo estral de bovinos, os EXOs atuam aumentando a proliferação celular e estimulando a expressão de receptores de LH. As EVs são produzidas no interior dos folículos e agem sobre as células da granulosa (SANG et al., 2013).

EXOs do fluido folicular de mulheres, apresentando em seu conteúdo miRNAs (fragmentos de RNA responsáveis pela regulação da expressão de genes específicos), foram descritos como fundamentais na maturação oocitária (SANTONOCITO et al., 2014). Além dos miRNAs as EVs utilizam outras vias para a comunicação intercelular, algumas possíveis vias utilizadas são “mitogen-activated protein kinase” (MAPK), “epidermal growth fator receptor” (ErbB), “transforming growth fator beta” (TGF β) e “wingless signaling pathway” (WNT) (DA SILVEIRA et al., 2012; SOHEL et al., 2013; SANTONOCITO et al., 2014).

A adição de EVs extraídas do fluido folicular de bovinos em meio de maturação de oócitos de ratas e vacas, acarretou uma melhor expansão das células do *cummulus* bem como aumentou a expressão de genes relacionados a estas células ambas as espécies (HUNG; CHRISTENSON; MCGINNIS, 2015).

2.2. Estresse Térmico

Em condições de estresse térmico (ET) uma vaca holandesa de alta produção pode atingir temperatura retal de 41,0°C, enquanto que sua temperatura média em condições de termoneutralidade é de 38,5 a 39,0°C. Porém, quando levamos em consideração os órgãos do sistema reprodutivo, esse aumento na temperatura é ainda mais relevante, pois a temperatura uterina pode atingir valores 0,2 a 0,5°C maiores que a retal (GWAZDAUSKAS; THATCHER; WILCOX, 1973).

Para a determinação da gravidade do ET sofrido pelos animais podemos utilizar o índice de temperatura e umidade (THI). Para determinarmos o THI utilizamos a maior temperatura registrada e a menor umidade relativa do ar com auxílio da fórmula que segue onde a temperatura é representada pela letra “T” e a umidade pela letra “H”:

$$THI = \frac{((9/5)T) + 32 - ((11/2) - (11/2)H)((9/5)T - 26)}{100}$$

Foi realizada uma classificação do ET sofrido por vacas leiteiras pelo THI. Quando o THI está abaixo de 72 não há ET. Quando entre 73 e 79 estresse suave, de 80 a 90 estresse moderado e acima de 91 estresse severo (ARMSTRONG, 1994).

Sob ET o organismo possui alguns mecanismos para tentar restabelecer a temperatura ideal, sendo assim uma forma de perder calor é pela pele. Para tanto, ocorre um direcionamento de maior aporte sanguíneo para a periferia em detrimento dos órgãos internos. Esse direcionamento diminui a quantidade de sangue que atinge os órgãos internos e por conseguinte o útero e os ovários, causando assim a queda da concentração de nutrientes e hormônios para esses órgãos (GWAZDAUSKAS; THATCHER; WILCOX, 1973). Recentemente foi demonstrado que o aporte sanguíneo para o sistema reprodutivo interno, útero e ovários diminui de 20 a 30% em animais sob ET, enquanto que o fluxo sanguíneo para a vulva aumenta cerca de 40%, devido a vasodilatação periférica (ROCHA et al., 2012).

Em temperaturas acima da faixa de conforto, a respiração e a pele são as principais formas de perda de calor por vacas leiteiras (GEBREMEDHIN; WU, 2001). Alguns fatores afetam principalmente a perda de calor cutâneo, o vento, a umidade relativa do ar e a temperatura ambiente. Já os fatores relacionados ao animal são: espessura e densidade do pelo, concentração e funcionalidade de glândulas sudoríparas, tamanho e cor do pelo, cor da pele e controle da vascularização epidermal (COLLIER et al., 2008). Estudos mostraram que vacas de leite conseguem manter suas temperaturas internas estáveis quando a temperatura cutânea está abaixo de 35°C. Acima de 35°C o animal começa a acumular o calor proveniente do ambiente (POLLARD et al., 2005).

Nas células, o estresse térmico (ET) leva a expressão de vários genes protetores que são regulados pelo fator de transcrição do estresse térmico (HSF) (PIRKKALA; NYKÄNEN; SISTONEN, 2001; PAGE et al., 2006). O HSF rege a produção de proteínas do choque térmico (HSP), que possuem funções protetoras contra a hipertermia, hipóxia e isquemia cerebral durante o ET (LEE et al., 2006). Acredita-se que a resposta ao ET seja um mecanismo integrado de células e tecidos com o propósito de diminuir o dano das temperaturas elevadas à célula (COLLIER et al., 2008).

Quando as células são expostas a temperatura acima da faixa de conforto, algumas alterações ocorrem como: inibição da produção de proteínas, alterações no citoesqueleto, disfunções metabólicas, mudanças na dinâmica da membrana plasmática e diminuição da proliferação celular (SONNA et al., 2002). Essas alterações levam a mudanças na expressão de alguns genes e consequentemente na produção proteica (LANKS, 1986; LINDQUIST, 1986). O tempo e a eficiência da adaptação a essas condições é o que vai determinar a viabilidade ou a morte celular (COLLIER et al., 2008).

Outro fato importante observado durante o ET é a queda do número de receptores hepáticos de hormônio do crescimento (GH), que juntamente com o fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), os quais são importantes na produção de leite e também na reprodução, além de controlarem a gliconeogênese (COLLIER et al., 2008).

Foi observado em regiões tropicais que durante o verão ocorre uma queda acentuada da observação deaios e, por outro lado, maior número de doses de sêmen por prenhez e maior período de serviço (tempo em que a vaca está lactante, porém sem estar gestante) (BONI; PERRONE; CECCHINI, 2014). Outro fator importante durante o ET é a queda do apetite e da ingestão de matéria seca, fatos que levam a um prolongamento do

período de balanço energético negativo e assim aumento no intervalo entre partos (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003).

No ciclo estral, o estresse calórico pode interferir de algumas formas, promovendo a redução do tamanho dos folículos, que está associado com a redução da concentração de estradiol plasmático. Acredita-se que essa redução esteja intimamente relacionada com problemas durante a esteroidogênese (WILSON et al., 1998). Estudos *in vitro* mostraram que em condições de temperatura elevada há uma diminuição da produção de androstenediona e estradiol por folículos dominantes (WOLFENSON et al., 1997); com uma menor produção de estradiol. Ainda, ocorre retardo da ovulação (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010) e da capacidade luteolítica, que está relacionada com a produção estrogênica (BRIDGES; BRUSIE; FORTUNE, 2005).

Todavia o ET pode alterar todas as fases do desenvolvimento folicular, como pode ser observado pela diminuição da diferença de tamanho entre folículos subordinados e dominantes, tanto animais que sofreram longo período de ET como animais submetidos a períodos curtos de estresse, ambos apresentaram uma continuação do crescimento dos folículos subordinados por mais tempo (WOLFENSON et al., 1995; WILSON et al., 1998; GUZELOGLU et al., 2001).

Em vista da ausência da dominância total de um dos folículos, há uma antecipação da segunda onda. Esse fenômeno provavelmente está relacionado a baixa concentração de inibina, que por sua vez não inibe a secreção de FSH, permitindo o crescimento do folículo subordinado (ROTH et al., 2000). Essa falha na dominância além de atrapalhar o desenvolvimento correto da segunda onda (ROTH et al., 2000), ainda altera a conformação uterina e a liberação de PGF 2α (SHAHAM-ALBALANCY et al., 2001), diminuindo a capacidade de implantação do embrião (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003).

Recentemente, observou-se que o ET levou a um aumento da taxa de perda fetal, diminuiu a porcentagem de prenhez, aumentou o número de fetos mortos ao nascimento, aumentou a taxa de abortamento, e por fim aumentou o período de espera (período entre o nascimento e a primeira inseminação) e o intervalo entre os partos (EL-TARABANY; EL-TARABANY, 2015)

O efeito do ET sobre a liberação de LH é muito controverso. Alguns autores relatam aumento da liberação de LH (ROMAN-PONCE; THATCHER; WILCOX, 1981),

enquanto outros relatam que não há alteração (GWAZDAUSKAS; THATCHER; WILCOX, 1973; GAUTHIER, 1986) e ainda existem autores que defendem a diminuição da liberação de LH devido ao ET (MADAN; JOHNSON, 1973; WISE et al., 1988; GILAD et al., 1993; LEE, 1993). A teoria mais aceita ainda é que o ET leve a diminuição da liberação de LH pela diminuição da amplitude (GILAD et al., 1993) e da frequência (WISE et al., 1988) dos pulsos deste hormônio, sendo assim o folículo dominante desenvolve-se em baixas concentrações de LH, resultando em uma menor liberação de estradiol e uma diminuição na expressão do estro e conseqüentemente redução na fertilidade (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003).

O efeito do ET sobre a concentração plasmática de progesterona é muito discutível, porém acredita-se que esta condição leva a queda da progesterona, principalmente devido a diminuição da ingestão de matéria seca (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). Sendo assim a diminuição da concentração deste hormônio implica em baixa fertilidade devido ao comprometimento do desenvolvimento folicular levando a formação de um oócito de baixa qualidade (AHMAD et al., 1995).

Não se sabe ao certo qual é o fator principal da diminuição dos níveis plasmáticos dos hormônios reprodutivos. Uma teoria para esse fenômeno é que o estresse estimula a liberação de corticoides endógenos (ROMAN-PONCE et al., 1977) que por sua vez inibem a liberação do GnRH fazendo com que a secreção de LH e FSH fique prejudicada (GILAD et al., 1993).

É importante lembrar que animais sob ET diminuem a ingestão diária de alimentos cerca de 30% (WEST, 1999). Portanto, uma vaca leiteira de alta produção, normalmente em balanço energético negativo no período pós-parto, sob ET apresenta redução da insulina, levando a lipólise e, conseqüente, aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados na corrente sanguínea (BERNABUCCI et al., 2010), resultando na diminuição da qualidade oocitária (AARDEMA et al., 2011).

Em se tratando mais especificamente do oócito na espécie bovina, foi relatado que o ET leva a redução na capacidade do oócito se desenvolver em blastocisto (TORRES-JÚNIOR et al., 2008), aumenta a chance de ocorrer anomalias durante a maturação oocitária (ANDREU-VÁZQUEZ et al., 2010), diminui a porcentagem de embriões saudáveis (PUTNEY; DROST; THATCHER, 1988) e redução da esteroidogênese (ROTH; MEIDAN; WOLFENSON, 2001). A queda na capacidade oocitária pode estar

associada ao fato dos oócitos sofrerem alterações morfológicas (ZERON et al., 2001). Alterações no perfil de ácidos graxos de membrana e da homogeneidade do citoplasma estão presentes durante o, assim como foram observadas falhas no armazenamento do mRNA e da transcrição reversa desse oócitos (GENDELMAN; ROTH, 2012).

Em oócitos não fertilizados, notou-se a presença de espermatozoides acessórios, fato que indica falha reprodutiva de origem oocitária (SARTORI et al., 2002). Uma vez que o animal sofra a injúria do ET, o ovário leva pelo menos três ciclos estrais para retornar à produção de oócitos com a mesma qualidade observada antes do ET (ROTH et al., 2001).

2.3. Vesículas extracelulares e proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico (heat-shock proteins - HSP), foram descobertas por acaso devido a uma falha na regulação da temperatura de uma estufa utilizada para cultivar células de *Drosophila spp* (RITOSSA, 1996). As HSPs foram também associadas ao estresse não-térmico (DE MAIO, 2011). As HSPs estão presentes mesmo em células não estressadas e possuem fundamental importância na recuperação pós-estresse e proteção contra novos episódios (GIFFARD et al., 2008). As HSPs são produzidas no citoplasma celular e são liberadas pelo transporte ativo dos complexos de golgi e não podem ser inibidas pelas vias comum de inibição dessa organela (NICKEL; SEEDORF, 2008).

O fator de choque térmico 1 (HSF1) é o principal fator responsável pela expressão dos genes relacionados com as HSPs durante episódios de hipertermia (PIRKKALA; NYKÄNEN; SISTONEN, 2001). Igualmente o HSF1 está relacionado com o metabolismo de carboidratos, transporte celular e ao citoesqueleto (PAGE et al., 2006).

A HSP70 se faz presente também no fluído extracelular de ratos, humanos e bovinos (KRISTENSEN et al., 2004; FLESHNER; JOHNSON, 2005). O aumento na concentração plasmática de HSP70 ocorre em ocasiões relacionadas a vários tipos de estresse (JOHNSON, 2005; ANEJA et al., 2006). A ativação de receptores adrenérgicos, associados com a resposta fisiológica ao estresse, gerou um aumento na concentração plasmática de HSP; enquanto que o bloqueio desses receptores preveniu a elevação da concentração sanguínea de HSP (JOHNSON, 2005). A HSP70 extracelular é originária de células mortas (MAMBULA; CALDERWOOD, 2006), e a sua presença fora da célula

auxilia na estimulação da resposta imune inata (CAMPISI; LEEM; FLESHNER, 2003; FLESHNER; JOHNSON, 2005; ANEJA et al., 2006).

Em células epiteliais da glândula mamária de vacas leiteiras submetidas ao ET (42°C), observou-se aumento na expressão de HSP70. Esse aumento durou 8 horas, até que os genes relacionados com a apoptose foram ativados (COLLIER; STIENING, 2006).

Alguns hormônios estão relacionados com o aumento das HSP durante períodos de ET. A melatonina e a prolactina aumentam a expressão de HSP70 em células mamárias bovinas durante ET, enquanto que a leptina leva a um decréscimo da expressão (COLLIER et al., 2008). Outros hormônios envolvidos nesse fenômeno são os glicocorticoides, que penetram no citoplasma celular e induzem a liberação de HSP70 e 90 que estão ligadas ao receptor de glicocorticoide. Esta é a primeira linha de defesa celular contra o ET devido ao fato das HSPs já estarem no citoplasma, não precisando serem sintetizadas (VIJAYAN; RAPTIS; SATHIYAA, 2003).

A HSP90 possui funções reprodutivas como regulação da esteroidogênese e desenvolvimento folicular (FANG et al., 1996; POWELL et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2013; DEB et al., 2014). Apresenta expressão aumentada em animais sob ET, além de auxiliar na termorregulação e na sobrevivência celular sob altas temperaturas (JOHNSON; TOFT, 1994).

O primeiro relato de transporte de HSP via vesículas data de 2008, quando foi observado HSP no interior de vesículas secretas por células do sistema imune (VEGA et al., 2008).

Atualmente a HSP70 está relacionada com a ativação de macrófagos, neutrófilos e monócitos (ASEA et al., 2000; BASU et al., 2001; VABULAS et al., 2002; GASTPAR et al., 2004; ANEJA et al., 2006; KOVALCHIN, PHD et al., 2006; WANG et al., 2006; GALLOWAY et al., 2008; VEGA et al., 2008). Além disso as HSPs possuem funções imunossupressoras ou imunoestimulatórias, dependendo da circunstância (POCKLEY; MUTHANA; CALDERWOOD, 2008).

A HSP 70 em EVs em fluido uterino de ovelhas foi descrita com 14 dias de prenhez, período que ocorre o reconhecimento materno da gestação, levando a ideia de que as EVs juntamente com HSP estão envolvidas neste fenômeno. Reforçando essa ideia

foi observado que os EXOs produzidos no endométrio carregam mRNAs de genes importantes para a diferenciação das células do trofoectoderma (BURNS et al., 2014).

As informações contidas nessa revisão nos levam a concluir, que o ET age de forma geral nos bovinos leiteiros causando muitos prejuízos. O ET pode modificar a comunicação celular pelas EVs. Essa é uma outra via que necessita ser estudada com o objetivo de entender mais profundamente como o ET interfere na reprodução de fêmeas bovinas.

3. HIPÓTESE

EVs extraídas do fluído folicular de vacas leiteiras submetidas ou não a condições de ET, possuem a capacidade de modular a morfologia e a expressão gênica de complexos cummulus-oócitos bovinos maturados *in vitro*.

4. OBJETIVO GERAL

Efeito da adição de EVs extraídos do fluído folicular de vacas leiteiras submetidas ou não a condições de ET durante a maturação oocitária *in vitro*.

Objetivos específicos

Quantificar a abundância de mRNA de genes relacionados com a qualidade e capacidade oocitária e genes relacionados ao ET tanto no oócitos como nas células do cummulus.

Avaliar a taxa de maturação nuclear oocitária através da progressão meiótica.

Avaliar a taxa de apoptose dos oócitos pela marcação do DNA celular.

5. REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H.; VOS, P. L. M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. J.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, B.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 62–69, 2011. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.110.088815>>.
- AHMAD, N.; SCHRICK, F. N.; BUTCHER, R. L.; INSKEEP, E. K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 5, p. 1129–1135, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7626713>.
- ANDREU-VÁZQUEZ, C.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; MAYA-SORIANO, M. J.; HUNTER, R. H. F.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Does heat stress provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation? **Zygote**, v. 18, n. 04, p. 293–299, 2010. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0967199410000043>.
- ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 114, n. 5-6 SPEC. ISS., p. 447–453, 2004.
- ANEJA, R.; ODOMS, K.; DUNSMORE, K.; SHANLEY, T. P.; WONG, H. R. Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 7184–7192, 2006. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.177.10.7184>>.
- ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2044–2050, 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030294771496>>.
- ASEA, A.; KRAEFT, S. K.; KURT-JONES, E. A.; STEVENSON, M. A.; CHEN, L. B.; FINBERG, R. W.; KOO, G. C.; CALDERWOOD, S. K. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nature medicine**, v. 6, n. 4, p. 435–442, 2000.
- BASU, S.; BINDER, R. J.; RAMALINGAM, T.; SRIVASTAVA, P. K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. **Immunity**, v. 14, n. 3, p. 303–313, 2001.
- BEAUDOIN, A. R.; GRONDIN, G. Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: Different cellular phenomena. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes**, v. 1071, n. 3, p. 203–219, 1991.
- BERCKMANS, R. J.; STURK, A.; VAN TIENEN, L. M.; SCHAAP, M. C. L.; NIEUWLAND, R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. **Blood**, v. 117, n. 11, p. 3172–3180, 2011.
- 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, n. 07, p. 1167–1183, 2010. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S175173111000090X>.
- BHATNAGAR, S.; SHINAGAWA, K.; CASTELLINO, F. J.; SCHOREY, J. S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3234–3244, 2007.
- BLANCHARD, N.; LANKAR, D.; FAURE, F.; REGNAULT, A.; DUMONT, C.; RAPOSO,

G.; HIVROZ, C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/ complex. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 7, p. 3235–3241, 2002. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.168.7.3235>>.

BONI, R.; PERRONE, L. L.; CECCHINI, S. Heat stress affects reproductive performance of high producing dairy cows bred in an area of southern Apennines. **Livestock Science**, v. 160, p. 172–177, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.016>>.

BRIDGES, P. J.; BRUSIE, M. A.; FORTUNE, J. E. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 3, p. 508–522, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0739724005000603>>.

BURNS, G.; BROOKS, K.; WILDUNG, M.; NAVAKANITWORAKUL, R.; CHRISTENSON, L. K.; SPENCER, T. E. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90913, 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0090913>>.

CABY, M.; LANKAR, D.; VINCEDEAU-SCHERRER, C.; BONNEROT, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **International Immunology**, v. 17, n. 7, p. 879–887, 2005.

CAMPISI, J.; LEEM, T. H.; FLESHNER, M. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. **Cell stress & chaperones**, v. 8, n. 3, p. 272–286, 2003.

CAMUSSI, G.; DEREGIBUS, M. C.; BRUNO, S.; CANTALUPPI, V.; BIANCONE, L. Exosomes / microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. **Kidney International**, v. 78, n. 9, p. 838–848, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.278>>.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 2, p. 43–51, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144520>>.

COLLIER, R. J.; COLLIER, J. L.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H. Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 445–454, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030208713869>>.

COLLIER, R.; STIENING, C. Use of gene expression microarrays for evaluating environmental stress tolerance at the cellular level in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. Sup., p. 1–13, 2006. Disponível em: <http://www.journalofanimalscience.org/content/84/13_suppl/E1.short>.

DA SILVEIRA, J. C.; DE ANDRADE, G. M.; NOGUEIRA, M. F. G.; MEIRELLES, F. V.; PERECIN, F. Involvement of miRNAs and cell-secreted vesicles in mammalian ovarian antral follicle development. **Reproductive sciences**, p. 1933719115574344–, 2015a. Disponível em: <<http://rsx.sagepub.com/content/early/2015/02/27/1933719115574344>>.

DA SILVEIRA, J. C.; VEERAMACHANENI, D. N. R.; WINGER, Q. A.; CARNEVALE, E. M.; BOUMA, G. J. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, p. 71–71, 2012. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.111.093252>>.

DA SILVEIRA, J. C.; WINGER, Q. A.; BOUMA, G. J.; CARNEVALE, E. M. Effects of age on follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth factor- β signalling during follicle development in the mare. **Reproduction, fertility, and development**, 2015b.

DE BROE, M. E.; WIEME, R. J.; LOGGHE, G. N.; ROELS, F. Spontaneous Shedding of Plasma Membrane Fragments by Human Cells in Vivo and in Vitro. **Clinica Chimica Acta**, v. 81, n. 3, p. 237–245, dez. 1977.

DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage: It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. **Cell Stress and Chaperones**, v. 16, n. 3, p. 235–249, 2011.

DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - A review. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1139–1151, 2003.

DEB, R.; SAJJANAR, B.; SINGH, U.; KUMAR, S.; SINGH, R.; SENGAR, G.; SHARMA, A. Effect of heat stress on the expression profile of Hsp90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus*×*Bos taurus*) breed of cattle: A comparative study. **Gene**, v. 536, n. 2, p. 435–440, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111913016120>>.

DEREGIBUS, M. C.; CANTALUPPI, V.; CALOGERO, R.; LO IACONO, M.; TETTA, C.; BIANCONE, L.; BRUNO, S.; BUSSOLATI, B.; CAMUSSI, G. Endothelial progenitor cell - Derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2440–2448, 2007.

EL-TARABANY, M. S.; EL-TARABANY, A. A. Impact of maternal heat stress at insemination on the subsequent reproductive performance of Holstein, Brown Swiss, and their crosses. **Theriogenology**, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15003994>>.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829–838, 2001.

ESCOLA, J. M.; KLEIJMEER, M. J.; STOORVOGEL, W.; GRIFFITH, J. M.; YOSHIE, O.; GEUZE, H. J. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 32, p. 20121–20127, 1998.

FANG, Y.; FLISS, A. E.; ROBINS, D. M.; CAPLAN, A. J. Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 45, p. 28697–28702, 1996.

FLESHNER, M.; JOHNSON, J. D. Endogenous Extra-Cellular Heat Shock Protein 72: Releasing Signal(s) and Function. **International journal of hyperthermia**, v. 21, n. 5, p. 457–471, ago. 2005.

GALLOWAY, E.; SHIN, T.; HUBER, N.; EISMANN, T.; KUBOKI, S.; SCHUSTER, R.; BLANCHARD, J.; WONG, H. R.; LENTSCH, a. B. Activation of hepatocytes by extracellular heat shock protein 72. **AJP: Cell Physiology**, v. 295, n. 2, p. C514–C520, 2008. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00032.2008>>.

GASTPAR, R.; GROSS, C.; ROSSBACHER, L.; ELLWART, J.; RIEGGER, J.; MULTHOFF, G. The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 2, p. 972–980, 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.172.2.972>>.

GAUTHIER, D. The Influence of Season and Shade on Oestrous Behaviour, Timing of Preovulatory LH Surge and the Pattern of Progesterone Secretion in FFPN and Creole Heifers in a Tropical Climate. **Reproduction, nutrition, development**, v. 26, n. 3, p. 767–775, 1986.

GEBREMEDHIN, K. G.; WU, B. Sensible and latent heat losses from wet-skin surface and fur

layer. In: ASAE Annual International Meeting, Sacramento, CA. **Anais...** Sacramento, CA: 2001.

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, n. 1, p. 1–9, 2012. Disponível em: <<http://www.bioreprod.org/cgi/doi/10.1095/bioreprod.111.092882>>.

GEORGE, N.; MCMANUS, M.; THOI, L. L.; REIMANN, T. A. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. **Blood**, v. 60, n. 4, p. 834–840, 1982.

GIFFARD, R. G.; HAN, R.-Q.; EMERY, J. F.; DUAN, M.; PITTET, J. F. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70. **Anesthesiology**, v. 109, n. 2, p. 339–48, 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2561962&tool=pmcentrez&render_type=abstract>.

GILAD, E.; MEIDAN, R.; BERMAN, A.; GRABER, Y.; WOLFENSON, D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. **Journal of reproduction and fertility**, v. 99, n. 2, p. 315–321, 1993.

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte - follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 23, 2011.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal reproduction science**, v. 82-83, p. 431–46, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271471>>. Acesso em: 9 maio. 2014.

GONZALEZ-BEGNE, M.; LU, B.; HAN, X.; HAGEN, F. K.; HAND, A. R.; MELVIN, J. E.; YATES, J. R. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 3, p. 1304–1314, 2009.

GOULD, S. J.; BOOTH, A. M.; HILDRETH, J. E. K. The Trojan exosome hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 10592–10597, 2003.

GUZELOGLU, A.; AMBROSE, J. D.; KASSA, T.; DIAZ, T.; THATCHER, M. J.; THATCHER, W. W. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 1-2, p. 15–34, 2001.

GWAZDAUSKAS, F. C.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Physiological, Environmental, and Hormonal Factors at Insemination Which May Affect Conception. **Journal of dairy science**, v. 56, n. 7, p. 873–877, jul. 1973.

GYÖRGY, B.; SZABÓ, T. G.; PÁSZTÓI, M.; PÁL, Z.; MISJÁK, P.; ARADI, B.; LÁSZLÓ, V.; PÁLLINGER, É.; PAP, E.; KITTEL, Á.; NAGY, G.; FALUS, A.; BUZÁS, E. I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 16, p. 2667–2688, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-011-0689-3>>.

HARDING, C.; HEUSER, J.; STAHL, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 2, p. 329–339, 1983.

HEIJNEN, B. H. F. G.; SCHIEL, A. E.; FIJNHEER, R.; GEUZE, H. J.; SIXMA, J. J. Activated

- platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. **Hemostasis, thrombosis and biology**, v. 94, n. 11, p. 3791–3799, 1999.
- HUGEL, B.; MARTÍNEZ, M. C.; KUNZELMANN, C.; FREYSSINET, J.-M. Membrane microparticles: two sides of the coin. **Physiology**, v. 20, p. 22–27, 2005.
- HUNG, W.-T.; CHRISTENSON, L. K.; MCGINNIS, L. K. Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. **Biology of Reproduction**, 2015. Disponível em: <<http://www.bioreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.115.132977>>.
- HURLEY, J. H. The ESCRT Complexes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, n. 6, p. 463–487, 2010.
- IERO, M.; VALENTI, R.; HUBER, V.; FILIPAZZI, P.; PARMIANI, G.; FAIS, S.; RIVOLTINI, L. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p. 80–88, 2008.
- IGONO, M. O.; BJOTVEDT, G.; SANFORD-CRANE, H. T. Environmental Profile and Critical Temperature Effects on Milk Production of Holstein Cows in Desert Climate. **International journal of biometeorology**, v. 36, n. 2, p. 77–87, maio 1992.
- JANOWSKA-WIECZOREK, A.; MAJKA, M.; KIJOWSKI, J.; BAJ-KRZYWORZEKA, M.; RECA, R.; ROBERT TURNER, A.; RATAJCZAK, J.; EMERSON, S. G.; ANNA KOWALSKA, M.; RATAJCZAK, M. Z. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. **Blood**, v. 98, n. 10, p. 3143–3149, 2001.
- JOHNSON, J. D. Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular Hsp72. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 5, p. 1789–1795, 2005. Disponível em: <<http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jappphysiol.00390.2005>>.
- JOHNSON, J. L.; TOFT, D. O. A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 40, p. 24989–24993, 1994.
- JOHNSTONE, R. M. Exosomes biological significance: A concise review. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 36, n. 2, p. 315–321, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979605001932>>.
- KALRA, H.; SIMPSON, R. J.; JI, H.; AIKAWA, E.; ALTEVOGT, P.; ASKENASE, P.; BOND, V. C.; BORRÀS, F. E.; BREAKFIELD, X.; BUDNIK, V.; BUZAS, E.; CAMUSSI, G.; CLAYTON, A.; COCUCCI, E.; FALCON-PEREZ, J. M.; GABRIELSSON, S.; GHO, Y. S.; GUPTA, D.; HARSHA, H. C.; HENDRIX, A.; HILL, A. F.; INAL, J. M.; JENSTER, G.; KRÄMER-ALBERS, E. M.; LIM, S. K.; LLORENTE, A.; LÖTVALL, J.; MARCILLA, A.; MINCHEVA-NILSSON, L.; NAZARENKO, I.; NIEUWLAND, R.; NOLTE-T HOEN, E. N. M.; PANDEY, A.; PATEL, T.; PIPER, M. G.; PLUCHINO, S.; PRASAD, T. S. K.; RAJENDRAN, L.; RAPOSO, G.; RECORD, M.; REID, G. E.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; SCHIFFELERS, R. M.; SILJANDER, P.; STENSBALLE, A.; STOORVOGEL, W.; TAYLOR, D.; THERY, C.; VALADI, H.; VAN BALKOM, B. W. M.; VÁZQUEZ, J.; VIDAL, M.; WAUBEN, M. H. M.; YÁÑEZ-MÓ, M.; ZOELLER, M.; MATHIVANAN, S. Vesiclepedia: A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. **PLoS Biology**, v. 10, n. 12, p. 8–12, 2012.
- KAPSOGEORGOU, E. K.; ABU-HELU, R. F.; MOUTSOPOULOS, H. M.; MANOUSSAKIS, M. N. Salivary gland epithelial cell exosomes a source of autoantigenic ribonucleoproteins. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 5, p. 1517–1521, 2005.
- KIM, H. K.; SONG, K. S.; PARK, Y. S.; KANG, Y. H.; LEE, Y. J.; LEE, K. R.; KIM, H. K.; RYU, K. W.; BAE, J. M.; KIM, S. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF

, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer : possible role of a metastasis predictor. **European Journal of Cancer**, v. 39, p. 184–191, 2003.

KOBAYASHI, Y.; WAKAMIYA, K.; KOHKA, M.; YAMAMOTO, Y.; OKUDA, K. Summer heat stress affects prostaglandin synthesis in the bovine oviduct. **Reproduction**, v. 146, n. 2, p. 103–110, 2013. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/REP-12-0479>>.

KOVALCHIN, PHD, J. T.; WANG, MD, PHD, R.; WAGH, MD, M. S.; AZOULAY, BS, J.; SANDERS, MD, M.; CHANDAWARKAR, R. Y. In vivo delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, n. 2, p. 129–137, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1743-6109.2006.00102.x>>.

KRISTENSEN, T. N.; LØVENDAHL, P.; BERG, P.; LOESCHCKE, V. Hsp72 is present in plasma from Holstein-Friesian dairy cattle, and the concentration level is repeatable across days and age classes. **Cell stress & chaperones**, v. 9, n. 2, p. 143–9, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1065294&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.

LANKS, W. Modulators of the eukaryotic. **Experimental Cell Research**, v. 165, 1986.

LEE, C. N. Environmental Stress Effects on Bovine Reproduction. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 9, n. 2, p. 263–273, jul. 1993.

LEE, W. C.; WEN, H. C.; CHANG, C. P.; CHEN, M. Y.; LIN, M. T. Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 100, n. 6, p. 2073–2082, 2006.

LINDQUIST, S. The Heat-Shock Response. **Annual review of biochemistry**, v. 55, p. 1151–1191, 1986.

MADAN, M. L.; JOHNSON, H. D. Environmental heat effects on bovine luteinizing hormone. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 11, p. 1420–1423, 1973. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030273853767>>.

MAJKA, M.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, J.; EHRENMAN, K.; PIETRZKOWSKI, Z.; ANNA KOWALSKA, M.; GEWIRTZ, A. M.; EMERSON, S. G.; RATAJCZAK, M. Z. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3075–3085, 2001.

MAMBULA, S. S.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 11, p. 7849–7857, 2006. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.177.11.7849>>.

MARTÍNEZ, M. C.; TESSE, A.; ZOB AIRI, F.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 288, p. 1004–1009, 2005.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes : Extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907–1920, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>>.

MCNATTY, K. P.; MOORE, L. G.; HUDSON, N. L.; QUIRKE, L. D.; LAWRENCE, S. B.; READER, K.; HANRAHAN, J. P.; SMITH, P.; GROOME, N. P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J. L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v. 128, n. 4, p. 379–386, 2004. Disponível em:

<<http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/rep.1.00280>>.

MOREL, O.; TOTI, F.; HUGEL, B.; FREYSSINET, J. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. **Current opinion in hematology**, v. 11, n. 3, p. 156–64, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15257014>>.

NICKEL, W.; SEEDORF, M. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 24, n. 1, p. 287–308, 2008. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175320>>.

PAGE, T. J.; SIKDER, D.; YANG, L.; PLUTA, L.; WOLFINGER, R. D.; KODADEK, T.; THOMAS, R. S. Genome-wide analysis of human HSF1 signaling reveals a transcriptional program linked to cellular adaptation and survival. **Molecular BioSystems**, v. 2, n. 12, p. 627, 2006. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b606129j>>.

PAN, B. T.; TENG, K.; WU, C.; ADAM, M.; JOHNSTONE, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 3, p. 942–948, 1985.

PIRKKALA, L.; NYKÄNEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 7, p. 1118–1131, 2001. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/content/15/7/1118.long>>.

PISITKUN, T.; SHEN, R.; KNEPPER, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 36, p. 13368–13373, 2004.

POCKLEY, A. G.; MUTHANA, M.; CALDERWOOD, S. K. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 2, p. 71–79, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000407002915>>.

POLGAR, J.; MATUSKOVA, J.; WAGNER, D. D. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1590–1596, 2005.

POLLARD, B. C.; ESTHEIMER, M. D.; DWYER, M. E.; GENTRY, P. C.; ANNEN, E. L.; HENDERSON, D. A.; STIENING, C. M.; COLLIER, R. J. Influence of parity, seasonal acclimatization, and recombinant bovine somatotropin (rbST), on diurnal patterns of physiological responses to thermal stress in cattle. **Journal of dairy science**, v. 88, n. Suppl.1, p. 120–121, 2005.

POWELL, E.; WANG, Y.; SHAPIRO, D. J.; XU, W. Differential requirements of Hsp90 and DNA for the formation of estrogen receptor homodimers and heterodimers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 21, p. 16125–16134, 2010. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.104356>>.

PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. **Theriogenology**, v. 30, n. 2, p. 195–209, 1988.

QUAH, B. J. C.; BARLOW, V. P.; MCPHUN, V.; MATTHAEI, K. I.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. Bystander B cells rapidly acquire antigen receptors from activated B cells by membrane transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 11, p. 4259–64, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2393802&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.

RAIBORG, C.; STENMARK, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 445–452, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07961>>.

RAPOSO, G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 3, p. 1161–1172, 1996. Disponível em: <<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.183.3.1161>>.

RAPOSO, G.; STOOBVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

RAPOSO, G.; TENZA, D.; MECHEI, S.; PERONET, R.; BONNEROT, C.; DESAYMARD, C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 8, n. 12, p. 2631–2645, 1997. Disponível em: <<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.8.12.2631>>.

RATAJCZAK, J.; WYSOCZYNSKI, M.; HAYEK, F.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, M. Z. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 20, n. 9, p. 1487–95, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791265>>.

RHOADS, M. L.; RHOADS, R. P.; VANBAALE, M. J.; COLLIER, R. J.; SANDERS, S. R.; WEBER, W. J.; CROOKER, B. A.; BAUMGARD, L. H. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1986–1997, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209705132>>.

RITOSSA, F. Discovery of the heat shock response. **Cell stress & chaperones**, v. 1, n. 2, p. 97–98, 1996.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234–248, 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.1153>>.

ROCHA, D. R.; SALLES, M. G. F.; MOURA, A. N.; ARAÚJO, A. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reproducao Animal**, v. 36, n. 1, p. 18–24, 2012.

ROMAN-PONCE, H.; THATCHER, W. W.; BUFFINGTON, D. E.; WILKAX, 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.; WILCOX, C. J. Hormonal interrelationships and physiological responses of lactating dairy cows to a shade management system in a subtropical environment. **Theriogenology**, v. 16, n. 2, p. 139–154, 1981.

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, n. 5, p. 737–744, 2001.

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.; MEIDAN, R.; WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 745–751, 2001.

ROZMYSLOWICZ, T.; MAJKA, M.; KIJOWSKI, J.; MURPHY, S. L.; CONOVER, D. O.; PONCZ, M.; RATAJCZAK, J.; GAULTON, G. N.; RATAJCZAK, M. Z. Platelet and

Megakaryocyte derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. **AIDS**, v. 17, n. April 2002, p. 33–42, 2003.

RUSTOM, A.; SAFFRICH, R.; MARKOVIC, I.; WALTHER, P.; GERDES, H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. **Science**, v. 303, p. 1007–10, 2004.

SANG, Q.; YAO, Z.; WANG, H.; FENG, R.; WANG, H.; ZHAO, X.; XING, Q.; JIN, L.; HE, L.; WU, L.; WANG, L. Identification of MicroRNAs in Human Follicular Fluid: Characterization of MicroRNAs That Govern Steroidogenesis in Vitro and Are Associated with Polycystic Ovary Syndrome in Vivo. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 7, p. 3068–3079, jul. 2013.

SANTONOCITO, M.; VENTO, M.; GUGLIELMINO, M. R.; BATTAGLIA, R.; WAHLGREN, J.; RAGUSA, M.; BARBAGALLO, D.; BORZÌ, P.; RIZZARI, S.; MAUGERI, M.; SCOLLO, P.; TATONE, C.; VALADI, H.; PURRELLO, M.; DI PIETRO, C. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 6, p. 1751–1761.e1, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028214020640>>.

SARKAR, A.; MITRA, S.; MEHTA, S.; RAICES, R.; WEWERS, M. D. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7140, 2009. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0007140>>.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. a; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 11, p. 2803–2812, nov. 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74367-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1)>.

SHAHAM-ALBALANCY, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; ROSENBERG, M.; WOLFENSON, D. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF2 α secretion in the subsequent oestrous cycle. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 643–648, 2001.

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, n. 3-4, p. 189–200, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481380>>. Acesso em: 9 maio. 2014.

SHERER, N. M.; MOTHESE, W. Cytosomes and Tunneling nanotubes in cell-cell communication and viral pathogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 9, p. 414–420, 2009.

SIEKEVITZ, P. Biological membranes: the dynamics of their organization. **Annual review of physiology**, v. 34, p. 117, 1972.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.

SOHEL, M. M. H.; HOELKER, M.; NOFERESTI, S. S.; SALILEW-WONDIM, D.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; RINGS, F.; UDDIN, M. J.; SPENCER, T. E.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: Implications for bovine oocyte developmental competence. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

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, n. 4, p. 1725–1742, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007556>>.

TANNETTA, D.; DRAGOVIC, R.; ALYAHYAEI, Z.; SOUTHCOMBE, J. Extracellular vesicles and reproduction—promotion of successful pregnancy. **Cellular and Molecular**

Immunology, v. 11, n. 6, p. 548–563, 2014. Disponível em:
<<http://www.nature.com/doi/10.1038/cmi.2014.42>>.

TAYLOR, D. D.; GERCEL-TAYLOR, C. The origin , function , and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. July, p. 1–12, 2013.

THÉRY, C.; AMIGORENA, S.; RAPOSO, G.; CLAYTON, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current protocols in cell biology**, v. Chapter 3, p. Unit 3.22, 2006.

THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 8, p. 581–93, 2009. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498381>>.

TORRES-JÚNIOR, J. R. de S.; PIRES, M. de F. A.; DE SÁ, W. F.; FERREIRA, A. de M.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FOLHADELLA, I. M.; POLISSENI, J.; DE FREITAS, C.; CLEMENTE, C. A. A.; DE 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, n. 2, p. 155–166, 2008. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X07005286>>.

VABULAS, R. M.; AHMAD-NEJAD, P.; GHOSE, S.; KIRSCHNING, C. J.; ISSELS, R. D.; WAGNER, H. HSP70 as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 15107–15112, 2002. Disponível em:
<<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111204200>>.

VEGA, V. L.; RODRÍGUEZ-SILVA, M.; FREY, T.; GEHRMANN, M.; DIAZ, J. C.; STEINEM, C.; MÜLTHOFF, G.; ARISPE, N.; DE MAIO, A. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. **Journal of immunology**, v. 180, n. 6, p. 4299–4307, 2008. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.180.6.4299>>.

VIJAYAN, M. M.; RAPTIS, S.; SATHIYAA, R. Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 256–263, 2003. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016648003000923>>.

WANG, R.; KOVALCHIN, J. T.; MUHLENKAMP, P.; CHANDAWARKAR, R. Y. Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens. **Blood**, v. 107, n. 4, p. 1636–1642, 2006.

WEST, J. W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Journal of animal science**, v. 77 Suppl 2, p. 21–35, 1999. Disponível em:
<http://www.journalofanimalscience.org/content/77/E-Suppl_2/21.short>.

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, n. 8, p. 2124–2131, ago. 1998.

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, n. 9, p. 2480–5, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3183143>>.

WOLFENSON, D.; LEW, B. J.; THATCHER, W. W.; GRABER, Y.; MEIDAN, R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p. 9–19, 1997.

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. **Biol Reprod**, v. 52, n. 5, p. 1106–1113, 1995.

YELLON, D. M.; DAVIDSON, S. M. Exosomes nanoparticles involved in cardioprotection? **Circulation Research**, v. 114, n. 2, p. 325–332, 2014. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.113.300636>>.

YU, X.; HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The regulation of exosome secretion: A novel function of the p53 protein. **Cancer Research**, v. 66, n. 9, p. 4795–4801, 2006. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-4579>>.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: Relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, n. 3, p. 447–454, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226071>\n<http://www.reproduction-online.org/content/121/3/447.full.pdf>>.

CAPITULO II

ARTIGO 1

Artigo a ser submetido a revista Veterinária e Zootecnia, ISSN 0102-5716, ranqueada como B4 pelo QUALIS – CAPES de 2015.

VESÍCULAS EXTRACELULARES: UMA FORMA DE COMUNICAÇÃO INTRAFOLICULAR

1. RESUMO

A produção de leite de bovinos taurinos apresenta uma série de entraves em regiões tropicais como o Brasil. Um desses entraves é o estresse térmico (ET), que acarreta uma perda econômica importante para os produtores. A perda de capital deve-se em grande parte a queda na produção de leite e nas falhas reprodutivas associadas ao ET. Já foram demonstradas várias alterações reprodutivas oriundas do ET. A nível celular foi notada a comunicação entre células foliculares, por meio de vesículas extracelulares (EVs). Foi observado a comunicação entre células do *cummulus* e células da granulosa através de EVs. Sendo assim esta revisão tem por finalidade correlacionar as EVs produzidas no interior dos folículos com os efeitos do ET sobre os oócitos bovinos.

Palavras-Chaves: oócito, células do *cummulus*, estresse térmico

EXTRACELLULAR VESICLES: A FORM OF COMMUNICATION INTRAFOLLICULAR

ABSTRACT

The production of taurine cattle milk presents a number of obstacles in tropical regions like Brazil. One of these barriers is the thermal stress (ET), which entails a major economic loss for producers. The loss of capital should largely fall in milk production and reproductive failures associated with ET. Already it has been demonstrated several reproductive changes arising from the ET. At the cellular level it was noted between the communication follicular cells through extracellular vesicles (EVs). communication was observed between cumulus cells and granulosa cells by EVs. So this review is intended to correlate the EVs produced inside the follicles with the effects of ET on bovine oocytes.

Key Words: oocyte, cumulus cells, heat stress

VESÍCULAS EXTRACELULAR: UNA FORMA DE COMUNICACIÓN INTRAFOLLICULAR

RESUMEN

La producción de leche en el ganado taurina presenta una serie de obstáculos en las regiones tropicales como Brasil. Una de estas barreras es la tensión térmica (ET), lo

que implica una pérdida económica importante para los productores. La pérdida de capital debe caer en gran medida en la producción de leche y fallas reproductivas asociadas con ET. Ya se ha demostrado varios cambios reproductivos derivados de la ET. A nivel celular se observó entre las células foliculares de comunicación a través de vesículas extracelulares (EVs). Se observó la comunicación entre las células del cúmulo y células de la granulosa de los vehículos eléctricos. Lo que esta revisión se pretende correlacionar los vehículos eléctricos producidos en el interior de los folículos con los efectos de ET en ovocitos bovinos.

Palabras clave: ovocitos, células del cumulus, el estrés por calor

2. INTRODUÇÃO

Regiões de clima tropical, apresentam verão com elevadas temperaturas médias, são bem conhecidos os decréscimos de fertilidade observados nos taurinos principalmente nos animais da raça Holandesa durante os meses mais quentes do ano. As perdas produtivas e reprodutivas associadas com o estresse térmico (ET) têm um significativo impacto econômico (1). Estimou-se que em regiões tropicais essa perda chega a € 69.379,00 por ano na bovinocultura leiteira devido aos efeitos do ET (2). Vacas sob ET podem diminuir sua produção de leite diária em até 40% (3). Já no âmbito da reprodução o ET ocasiona a diminuição do crescimento folicular, redução das concentrações séricas de estradiol, comprometimento da dominância folicular e, ainda, atraso no dia esperado da luteólise (4); levando assim falhas na fecundação, falhas no desenvolvimento embrionário, e no reconhecimento materno da gestação (5,6). Entretanto, os mecanismos fisiológicos que levam a infertilidade no verão são apenas parcialmente compreendidos.

Dentre os vários fatores presentes neste microambiente encontram-se as vesículas extracelulares (EVs) as quais exibem funções biológicas pleiotrópicas (7). Os fatores que influenciam na classificação dessas vesículas são o tamanho, o formato, as proteínas de membranas, alguns lipídios estruturais e a origem. Estudos mostram também a presença de EXOs e MVs em diversos fluidos biológicos como saliva, plasma, urina (8–11) e também no líquido folicular de éguas (12). Essas EVs transportam principalmente, proteínas, microRNAs (miRNAs) e RNAs mensageiros (mRNAs) e sua bicamada lipídica protege esse biomaterial (13).

AS EVs apresentam sua liberação estimulada por eventos que levam a injúria celular como estresse físico ou químico (14). O ET leva a alterações metabólicas que geram este tipo estresse (15). As EVs são liberadas por células foliculares e desempenham função importante na transferência de moléculas para a células da granulosa e oócito (16,17). Com base no exposto esta revisão tem como objetivo demonstrar a importância da comunicação celular pelas EVs e sua relação com a reprodução bovina durante episódios de estresse térmico.

3. DESENVOLVIMENTO DO ASSUNTO

3.1. Microvesículas e Exossomos

A comunicação intercelular é muito importante para garantir uma resposta uniforme dos diferentes componentes do tecido (18). As células podem se comunicar pelo fluido extracelular (19), por ligações mediadas por moléculas e por nanotubos que estabilizam a passagem de substâncias da superfície e de componentes do citoplasma (20,21).

A descoberta de estruturas circulares secretadas pelas células não é recente. Quando foram descobertas acreditava-se que eram resultado de um processo celular específico e, demonstrou-se que tinham função de transportar enzimas funcionais na mesma proporção encontrada no citoplasma das células de origem (22). Entretanto apenas estudos mais recentes demonstraram funções para as EVs secretadas por diversos tipos de células (18). Vesículas extracelulares são classificadas de acordo com o tamanho, morfologia, tipos de proteínas e lipídeos da membrana e a sua origem. As MVs e os EXOs apresentam, respectivamente, diâmetros entre 100 e 1000 nm e 40 a 150 nm (23,24).

As MVs são produzidas pela membrana plasmática enquanto que os EXOs são produzidos dentro de corpos multivesiculares e são secretados pela fusão entre a membrana plasmática e a membrana dos corpos multivesiculares (25). As MVs se originam pela fusão entre a membrana endossomal e a membrana plasmática e após essa fusão, estes componentes celulares são liberados pela superfície celular (26,27). Conforme a Vesiclepedia cita (28), já foram descritas 43 mil proteínas, 342 lipídeos, 20 mil RNAs mensageiros e 2400 microRNAs no interior das EVs de diferentes tipos celulares e organismos.

Atualmente, já se sabe que os EXOs são produzidos pela internalização da membrana formando endossomos, que por sua vez são recobertos por outra membrana levando a formação dos corpos multivesiculares (MVBs) (29,30). Após essa formação ocorre a fusão entre os MVBs e a membrana plasmática e liberam os EXOs do seu interior (31).

As EVs apresentam importante função no espaço intercelular e desempenha um papel de regulação da comunicação entre as células (18). Esta hipótese é fundamentada em observações que demonstraram que EVs liberadas pela célula doadora podem interagir com receptores específicos em outras células promovendo na célula alvo uma estimulação direta ou transferindo receptores de ligação (32,33). Esta interação pode ser limitada por uma ligação a um receptor na membrana da célula alvo, concretizando uma plataforma de recebimento dos complexos multimoleculares ou conduzindo um sinal para a célula, ambos processos necessitam da internalização das EVs (34). Quando internalizadas as EVs podem fundir suas membranas com os endossomos e liberar seu conteúdo no citoplasma das células alvo; outro caminho que as vesículas podem seguir é pela não ligação com os endossomos e ocorrer a transferência destas para os lisossomos ou serem descartadas pela fusão com a membrana plasmática (34).

A primeira observação de EVs em fluido folicular de mamíferos foi descrita em éguas, pela microscopia eletrônica e citometria de fluxo. Após a constatação da existência das mesmas foi estudado a capacidade das vesículas em penetrar nas células da granulosa. Com o uso de EVs marcadas por fluorescência demonstrou-se a capacidade das vesículas em adentrar às células da granulosa tanto *in vivo* como *in vitro* (12). Outro grupo de pesquisadores observou que miRNAs presentes em EXOs isolados de fluido folicular de bovinos estão associados com a maturação oocitária, sugerindo que estes miRNAs podem ser utilizados como marcadores de qualidade oocitária (35).

Ainda não está claro se as células do *cummulus*, as células da granulosa e ou os oócitos secretam as EVs. O primeiro passo foi a realização da microscopia eletrônica do fluido folicular de folículos entre 3 e 6 mm de diâmetro, normalmente usados em procedimentos de aspiração para coleta de oócitos, assim pode-se observar a presença de MVBs contendo EXOs no interior das células da granulosa e células do *cummulus*, sugerindo então que estes tipos celulares produzem e liberam as EVs para o fluido folicular (36).

Estudos levantaram a hipótese de que os EXOs desempenham função importante de transferir moléculas para a células da granulosa, na metade e no fim do ciclo estral de bovinos, os EXOs atuam aumentando a proliferação celular e estimulando a expressão de receptores de LH. As EVs são produzidas no interior dos folículos e agem sobre as células da granulosa (16).

A adição de EVs extraídas do fluido folicular de bovinos em meio de maturação de oócitos de ratas e vacas, acarretou uma melhor expansão das células do *cummulus* bem como aumentou a expressão de genes relacionados a estas células ambas as espécies (37).

3.2. Estresse Térmico

Em condições de estresse térmico (ET) uma vaca holandesa de alta produção pode atingir temperatura retal de 41,0°C, enquanto que sua temperatura média em condições de termoneutralidade é de 38,5 a 39,0°C. Porém, quando levamos em consideração os órgãos do sistema reprodutivo, esse aumento na temperatura é ainda mais relevante, pois a temperatura uterina pode atingir valores 0,2 a 0,5°C maiores que a retal (38).

‘Sob ET o organismo possui alguns mecanismos para tentar restabelecer a temperatura ideal, sendo assim uma forma de perder calor é pela pele. Para tanto, ocorre um direcionamento de maior aporte sanguíneo para a periferia em detrimento dos órgãos internos. Esse direcionamento diminui a quantidade de sangue que atinge os órgãos internos e por conseguinte o útero e os ovários, causando assim a queda da concentração de nutrientes e hormônios para esses órgãos (38). Recentemente foi demonstrado que o aporte sanguíneo para o sistema reprodutivo interno, útero e ovários diminui de 20 a 30% em animais sob ET, enquanto que o fluxo sanguíneo para a vulva aumenta cerca de 40%, devido a vasodilatação periférica (39).

Nas células, o estresse térmico (ET) leva a expressão de vários genes protetores que são regulados pelo fator de transcrição do estresse térmico (HSF) (40). O HSF rege a produção de proteínas do choque térmico (HSP), que possuem funções protetoras contra a hipertermia, hipóxia e isquemia cerebral durante o ET (41). Acredita-se que a resposta ao ET seja um mecanismo integrado de células e tecidos com o propósito de diminuir o dano das temperaturas elevadas à célula (42).

Quando as células são expostas a temperatura acima da faixa de conforto, algumas alterações ocorrem como: inibição da produção de proteínas, alterações no citoesqueleto, disfunções metabólicas, mudanças na dinâmica da membrana plasmática e diminuição da proliferação celular (43). Essas alterações levam a mudanças na expressão de alguns genes e consequentemente na produção proteica (44). O tempo e a eficiência da adaptação a essas condições é o que vai determinar a viabilidade ou a morte celular (42).

Todavia o ET pode alterar todas as fases do desenvolvimento folicular, como pode ser observado pela diminuição da diferença de tamanho entre folículos subordinados e dominantes, tanto animais que sofreram longo período de ET como animais submetidos a períodos curtos de estresse, ambos apresentaram uma continuação do crescimento dos folículos subordinados por mais tempo (45).

Em vista da ausência da dominância total de um dos folículos, há uma antecipação da segunda onda. Esse fenômeno provavelmente está relacionado a baixa concentração de inibina, que por sua vez não inibe a secreção de FSH, permitindo o crescimento do folículo subordinado (46). Essa falha na dominância além de atrapalhar o desenvolvimento correto da segunda onda (46), ainda altera a conformação uterina e a liberação de $PGF2\alpha$ (47), diminuindo a capacidade de implantação do embrião (6).

Recentemente, observou-se que o ET levou a um aumento da taxa de perda fetal, diminuiu a porcentagem de prenhez, aumentou o número de fetos mortos ao nascimento, aumentou a taxa de abortamento, e por fim aumentou o período de espera (período entre o nascimento e a primeira inseminação) e o intervalo entre os partos (48).

O efeito do ET sobre a liberação de LH é muito controverso. Alguns autores relatam aumento da liberação de LH (49), enquanto outros relatam que não há alteração (38,50) e ainda existem autores que defendem a diminuição da liberação de LH devido ao ET (51–54). A teoria mais aceita ainda é que o ET leve a diminuição da liberação de LH pela diminuição da amplitude (53) e da frequência (52) dos pulsos deste hormônio, sendo assim o folículo dominante desenvolve-se em baixas concentrações de LH, resultando em uma menor liberação de estradiol e uma diminuição na expressão do estro e consequentemente redução na fertilidade (6).

Em se tratando mais especificamente do oócito na espécie bovina, foi relatado que o ET leva a redução na capacidade do oócito se desenvolver em blastocisto (55), aumenta a chance de ocorrer anomalias durante a maturação oocitária (56), diminui a porcentagem de embriões saudáveis (57) e redução da esteroidogênese (58). A queda na capacidade oocitária pode estar associada ao fato dos oócitos sofrerem alterações morfológicas (59). Alterações no perfil de ácidos graxos de membrana e da homogeneidade do citoplasma

estão presentes durante o, assim como foram observadas falhas no armazenamento do mRNA e da transcrição reversa desse oócitos (60).

4. CONCLUSÃO

Com base no exposto podemos concluir que as EVs desempenham uma função importante na comunicação celular de vários tecidos, inclusive reprodutivos. Sendo assim o ET possui a capacidade de modificar o conteúdo das EVs, portanto essas vesículas produzidas durante situações de estresse têm a capacidade de sinalizar para outras células que devem modificar seu metabolismo visando sobreviver a situação adversa. Acredita-se que células foliculares apresentam esse tipo de comunicação evitando assim a morte oocitária.

5. REFERÊNCIAS

1. Igono MO, Bjotvedt G, Sanford-Crane HT. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. *Int J Biometeorol*. UNITED STATES; 1992 May;36(2):77–87.
2. Boni R, Perrone LL, Cecchini S. Heat stress affects reproductive performance of high producing dairy cows bred in an area of southern Apennines. *Livest Sci* [Internet]. Elsevier; 2014;160:172–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.016>
3. Rhoads ML, Rhoads RP, VanBaale MJ, Collier RJ, Sanders SR, Weber WJ, et al. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J Dairy Sci* [Internet]. Elsevier; 2009;92(5):1986–97. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209705132>
4. Wilson SJ, Marion RS, Spain JN, Spiers DE, Keisler DH, Lucy MC. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J Dairy Sci*. UNITED STATES; 1998 Aug;81(8):2124–31.
5. Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens S a, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* [Internet]. United States; 2002 Nov;85(11):2803–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74367-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1)
6. De Rensis F, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - A review. *Theriogenology*. 2003;60(6):1139–51.
7. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes : Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;73(10):1907–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>
8. Caby M, Lankar D, Vincendeau-scherrer C, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*. 2005;17(7):879–87.
9. Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, et al. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res*. 2009;8(3):1304–14.
10. Berckmans RJ, Sturk A, Van Tienen LM, Schaap MCL, Nieuwland R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood*. 2011;117(11):3172–80.
11. Pisitkun T, Shen R, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(36):13368–73.
12. da Silveira JC, Veeramachaneni DNR, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod* [Internet]. 2012;86(3):71–71. Available from: <http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.111.093252>

13. Taylor DD, Gercel-taylor C. The origin , function , and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet.* 2013;4(July):1–12.
14. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* [Internet]. 2006;20(9):1487–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791265>
15. Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal* [Internet]. 2010;4(07):1167–83. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S175173111000090X
16. Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, et al. Identification of MicroRNAs in human follicular fluid: Characterization of MicroRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* United States; 2013 Jul;98(7):3068–79.
17. da Silveira JC, Winger QA, Bouma GJ, Carnevale EM. Effects of age on follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth factor- β signalling during follicle development in the mare. *Reprod Fertil Dev.* 2015;
18. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes / microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;78(9):838–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.278>
19. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Anna Kowalska M, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood.* 2001;97(10):3075–85.
20. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* (80-). 2004;303:1007–10.
21. Sherer NM, Mothes W. Cytonemes and Tunnelling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol.* 2009;18(9):414–20.
22. De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, Roels F. Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. *Clin Chim Acta.* NETHERLANDS; 1977 Dec;81(3):237–45.
23. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol.* 1985;101(3):942–8.
24. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc cell Biol.* 2006;Chapter 3:Unit 3.22.

25. Raposo G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* [Internet]. 1996;183(3):1161–72. Available from: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.183.3.1161>
26. Heijnen BHFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Hemostasis, Thromb Biol*. 1999;94(11):3791–9.
27. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, et al. Platelet and Megakaryocyte derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS*. 2003;17(April 2002):33–42.
28. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):8–12.
29. Johnstone RM. Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2006;36(2):315–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979605001932>
30. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009;9(8):581–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498381>
31. De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage: It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*. 2011;16(3):235–49.
32. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Robert Turner A, et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*. 2001;98(10):3143–9.
33. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet J. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2004;11(3):156–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15257014>
34. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2009;19(2):43–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144520>
35. Sohel MMH, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, et al. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: Implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS One*. 2013;8(11).
36. da Silveira JC, de Andrade GM, Nogueira MFG, Meirelles F V, Perecin F. Involvement of miRNAs and cell-secreted vesicles in mammalian ovarian antral follicle development. *Reprod Sci* [Internet]. 2015;1933719115574344 – . Available from: <http://rsx.sagepub.com/content/early/2015/02/27/1933719115574344>

37. Hung W-T, Christenson LK, McGinnis LK. Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. *Biol Reprod* [Internet]. 2015; Available from: <http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.115.132977>
38. Gwazdauskas FC, Thatcher WW, Wilcox CJ. Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination which may affect conception. *J Dairy Sci. UNITED STATES*; 1973 Jul;56(7):873–7.
39. Rocha DR, Salles MGF, Moura AN, Araújo A. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. *Rev Bras Reprod Anim*. 2012;36(1):18–24.
40. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* [Internet]. 2001;15(7):1118–31. Available from: <http://www.fasebj.org/content/15/7/1118.long>
41. Lee WC, Wen HC, Chang CP, Chen MY, Lin MT. Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *J Appl Physiol*. 2006;100(6):2073–82.
42. Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, Baumgard LH. Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. *J Dairy Sci* [Internet]. Elsevier; 2008;91(2):445–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030208713869>
43. Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol* [Internet]. 2002;92(4):1725–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007556>
44. Lanks W. Modulators of the eukaryotic. *Exp Cell Res*. 1986;165.
45. Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, et al. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol Reprod*. 1995;52(5):1106–13.
46. 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. *J Reprod Fertil*. 2000;120:83–90.
47. Shaham-Albalancy A, Folman Y, Kaim M, Rosenberg M, Wolfenson D. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF₂ α secretion in the subsequent oestrous cycle. *Reproduction*. 2001;122(4):643–8.
48. El-Tarabany MS, El-Tarabany AA. Impact of maternal heat stress at insemination on the subsequent reproductive performance of Holstein, Brown Swiss, and their crosses. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc; 2015;1–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15003994>
49. Roman-Ponce H, Thatcher WW, Wilcox CJ. Hormonal interrelationships and physiological responses of lactating dairy cows to a shade management system in a subtropical environment. *Theriogenology*. 1981;16(2):139–54.
50. Gauthier D. The influence of season and shade on oestrous behaviour, timing of preovulatory LH surge and the pattern of progesterone secretion in FFPN and Creole heifers in a tropical climate. *Reprod Nutr Dev. FRANCE*;

- 1986;26(3):767–75.
51. Madan ML, Johnson HD. Environmental heat effects on bovine luteinizing hormone. *J Dairy Sci* [Internet]. Elsevier; 1973;56(11):1420–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030273853767>
 52. Wise ME, Armstrong D V, Huber JT, Hunter R, Wiersma F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J Dairy Sci* [Internet]. 1988;71(9):2480–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3183143>
 53. Gilad E, Meidan R, Berman A, Graber Y, Wolfenson D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J Reprod Fertil*. 1993;99(2):315–21.
 54. Lee CN. Environmental stress effects on bovine reproduction. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. UNITED STATES; 1993 Jul;9(2):263–73.
 55. Torres-Júnior JR de S, Pires M de FA, de Sá WF, Ferreira A de M, Viana JHM, Camargo LSA, et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* [Internet]. 2008;69(2):155–66. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X07005286>
 56. Andreu-Vázquez C, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Maya-Soriano MJ, Hunter RHF, López-Béjar M. Does heat stress provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation? *Zygote* [Internet]. 2010;18(04):293–9. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0967199410000043
 57. Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*. 1988;30(2):195–209.
 58. Roth Z, Meidan R, Wolfenson D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*. 2001;121(5):745–51.
 59. Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: Relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* [Internet]. 2001;121(3):447–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226071> \n <http://www.reproduction-online.org/content/121/3/447.full.pdf>
 60. 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. *Biol Reprod* [Internet]. 2012;86(1):1–9. Available from: <http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.111.092882>

Veterinária e Zootecnia

CAPA SOBRE ACESSO CADASTRO PESQUISA ATUAL ANTERIORES

Capa > Sobre a revista > **Submissões**

Submissões

- [Submissões Online](#)
- [Diretrizes para Autores](#)
- [Declaração de Direito Autoral](#)
- [Política de Privacidade](#)

Submissões Online

Já possui um login/senha de acesso à revista Veterinária e Zootecnia?
[ACESSO](#)

Não tem login/senha?
[ACESSO A PÁGINA DE CADASTRO](#)

O cadastro no sistema e posterior acesso, por meio de login e senha, são obrigatórios para a submissão de trabalhos, bem como para acompanhar o processo editorial em curso.

Diretrizes para Autores

- **Artigos Científicos**

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. **Página de rosto, com:**
 - Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
 - Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

Diretrizes para Autores

- **Artigos Científicos**

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. **Página de rosto, com:**

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. **Página com resumo, abstract e resumen**

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.

- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

- **Artigos de Revisão Bibliográfica**

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

- **Relato de Caso**

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

- **Comunicações Curtas**

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas

com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

- **Referências e Citações**

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique somente até seis autores. Em caso de mais autores, usar et al. após o sexto autor.

1. Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Freqüência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2. Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3. Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4. Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5. Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

6. Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7. Publicações disponíveis na Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: .

ARTIGO 2

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2015.

EFEITO DA ADIÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES INTRAFOLICULARES DE VACAS HOLANDEASAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE TÉRMICO DURANTE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO*

1. RESUMO

Vários são os componentes que tem a capacidade de interferir no metabolismo e desenvolvimento do oócito no interior do folículos, dentre esses fatores estão as EVs. Sendo assim o objetivo deste estudo foi investigar a modulação da maturação oocitária *in vitro* pelas EVs extraídos de vacas submetidas ao estresse térmico (ET) ou não. Para tanto 12 vacas da raça holandesa foram submetidas ao ET e 12 vacas foram mantidas em condições de termo-neutralidade, em seguida tiveram seus folículos aspirados em dois momentos do ciclo estral (pré-ovulação e desvio). Após a separação das EVs do fluido folicular, foram visualizados por microscopia eletrônica. As EVs foram colocados em meio de maturação para avaliação da ação destas vesículas durante a maturação oocitária. Após 22 a 24 horas de maturação, os oócitos e as células do *cummulus* foram recuperados para posterior análise de progressão da maturação, avaliação da taxa de apoptose e também para expressão de genes de interesse. Não foi observada diferença estatística entre os grupos na análise de progressão meiótica tão pouco na taxa de apoptose. Indicando que as EVs não interferiram na morfologia oocitária. A expressão gênica no entanto demonstrou que genes relacionados a expansão do *cummulus* (BMP15, HAS2, GDF9, PTX3), metabolismo energético (BMP15, CPT1B, PFKP), IGF (IGFBP2 e 4) e apoptose (BCL2 e STAT3), apresentaram expressão diminuída no grupo termo-neutro. Os dados do nosso estudo indicam que o ambiente termo-neutro levou a uma sinalização intrafolicular das EVs com a finalidade de indicar uma situação favorável para o oócito.

Palavras-chave: Holandesa, células do *cummulus*, oócito

2. INTRODUÇÃO

Em países de clima tropical, caracterizado por apresentar verão com elevadas temperaturas médias, são bem conhecidos os efeitos deletérios do estresse térmico (ET) sobre a fertilidade, observados nos taurinos, principalmente em animais da raça Holandesa, durante os meses mais quentes do ano, que acarretam importantes perdas econômicas [1]. Vacas sob ET podem diminuir sua produção de leite diária em até 40% [2]. Já no âmbito da reprodução o ET ocasiona a diminuição do crescimento folicular, redução das concentrações séricas de estradiol, comprometimento da dominância folicular, atraso no dia esperado da luteólise [3], e falha no desenvolvimento embrionário, na fecundação e no reconhecimento materno da gestação [4,5]. Entretanto, os mecanismos fisiológicos que levam a infertilidade no verão são ainda parcialmente compreendidos.

As vesículas extracelulares (EVs), presentes no microambiente folicular, exibem funções biológicas pleiotrópicas [6] e são classificadas de acordo com o seu tamanho, formato, proteínas de membranas, lipídios estruturais e origem [7]. As microvesículas (MVs) são maiores, com o diâmetro variando entre 100-1000 nm, possuem formato irregular e possuem como origem a membrana plasmática da célula. Os EXOs possuem diâmetro entre 50-100 nm, formato de taça e têm origem dos endossomos tardios [7].

Presentes na saliva, plasma, urina [8–11] e líquido folicular [12,13], as EVs possibilitam o transporte intercelular de importantes mensageiros, como proteínas, miRNAs e mRNAs [7]. Esse fenômeno, que permite a íntima interação entre as células, é indispensável à coordenação das funções teciduais [14]. Células somáticas submetidas a estresse físico ou químico provavelmente secretam EVs com conteúdo específico capaz modular a atividade gênica e proteica, aumentando a resistência celular aos agentes estressores [15,16].

Sabendo-se que as EVs, liberadas pelas células da granulosa desempenham uma importante via de comunicação intrafolicular, influenciando diretamente o desenvolvimento do oócito [13,17]. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do meio de maturação enriquecido com EVs obtida do fluido folicular de vacas holandesas submetidas a condições de termo-neutralidade ou ET, sobre aspectos celulares moduladores de CCOs maturados *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo, aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (protocolo 86/2013), foi realizado de agosto a dezembro de 2013, na fazenda Experimental Lageado, FMVZ – Unesp, São Paulo Brasil (22° 53 S; 48° 26 W).

Animais

Foram empregadas 18 vacas Holandesas não lactantes, adultas, clinicamente saudáveis, com escore de condição corporal ≥ 3 (escala de 1-5). Durante o experimento, os animais permaneceram em piquetes de *Braquiária* sp, alimentados duas vezes ao dia com dieta total, composta por feno de capim-tifton 85 (*Cynodon* spp.), concentrado e água *ad libitum*. A dieta foi formulada para atender ou exceder as exigências nutricionais de vacas Holandesas não lactantes, conforme recomendações do NRC (2001).

Protocolo de Sincronização

Doze vacas escolhidas por sorteio foram submetidas ao seguinte protocolo para sincronização do ciclo estral: dia -9 - aplicação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH; 50 μ g de lecirelina) e colocação de dispositivo intravaginal de P4; dia -2 - aplicação de prostaglandina 2 α (PGF2 α ; 250 μ g de cloprostenol sódico) e retirada do dispositivo intravaginal de progesterona; dia 0 – aplicação da segunda dose de GnRH (50 μ g de lecirelina; Figura 1).

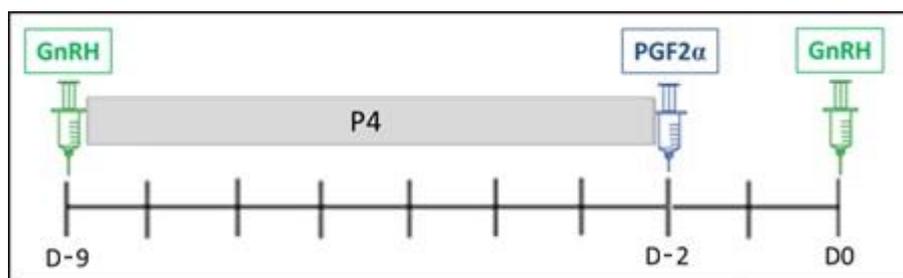


Figura 1 – Diagrama do protocolo de sincronização de ovulação Ovsynch® adicionado de dispositivo de progesterona.

Delineamento Experimental

O dia da ovulação foi determinado por ultrassonografia diária realizada a partir da segunda administração de GnRH (Dia 0 - D0). Uma vez constatada a ovulação, foram sorteadas seis fêmeas e aleatoriamente distribuídas em dois ambientes distintos:

- Ambiente de termo-neutralidade (n = 3): mantido à temperatura de 24°C e com umidade relativa do ar de 60%.
- Ambiente de estresse térmico (n = 3): mantido à temperatura de 38°C e com umidade relativa do ar de 60% durante o dia e termoneutro durante a noite (24°C), visando mimetizar as condições de ambiente reais.

A câmara bioclimática existente era composta por um conjunto de dois ambientes com capacidade para três vacas cada. O experimento foi realizado em quatro replicatas. Três vacas foram submetidas ao tratamento ET e três vacas foram mantidas em condições termo-neutras na primeira replicata. As vacas da primeira replicata do grupo submetido ao ambiente de ET não foram subsequentemente utilizadas, enquanto que as alojadas no ambiente termo-neutro foram ser reutilizadas nas demais replicatas do ambiente de ET. Assim, ao final do estudo 12 vacas foram submetidas a cada tratamento.

No dia 9, os dois maiores folículos (F1 e F2, respectivamente, o maior e o menor) foram aspirados com um sistema de duas vias de modo individual e seus conteúdos processados. Em seguida, foi realizada a ablação dos folículos remanescentes. A partir desse dia foi monitorada diariamente por ultrassonografia a emergência e o desenvolvimento da nova onda folicular. No dia da determinação do estabelecimento da dominância (F1 \geq 8,5 mm), F1 e F2 foram também aspirados individualmente.

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se um equipamento de ultrassom (MyLab30 VetGold, Esaote, Italy) com transdutor microconvexo de 5,0 e 7,5 MHz acoplado a uma guia de biópsia para uso transvaginal. As aspirações foram realizadas com agulhas 18G descartáveis e sistema de mangueiras de silicone de duas vias. Para evitar movimentos peristálticos e desconforto ao animal, em cada aspiração, foi utilizada anestesia epidural com 5 mL de cloridrato de lidocaína 2% seguida da limpeza da região perineal com água e álcool. A seguir o transdutor foi inserido na cavidade vaginal e, com auxílio de manipulação transretal, os ovários foram posicionados para obtenção de uma boa visibilização ultrassonográfica. Os folículos a serem aspirados foram posicionados na linha de punção indicada na tela do ultrassom e, após inserir a

agulha no folículo a ser aspirado, um operador acionou as seringas acopladas ao sistema de duas vias para lavagem e recuperação do fluido folicular. O meio de aspiração e lavagem do sistema era composto de PBS e heparina sódica (10000UI/L).

Isolamento das vesículas extracelulares

As EVs foram obtidos a partir do fluido folicular recuperado. Foram realizados pools de fluido folicular de cada grupo, formando um total de 4 grupos. O fluido folicular de cada pool foi centrifugado três vezes consecutivas a temperatura de 4°C, a 300xg por 10 min, a 2000xg por 10 min e a 16500xg por 30 min. Posteriormente, os sobrenadantes foram depositados em tubos próprios da ultracentrífuga (Sorvall MTX 150 - Micro-Ultracentrífuga, Thermo Scientific, EUA) e foram ultracentrifugados a 120000xg por 70 min à 4°C, e o pellet proveniente desta etapa foi lavado em PBS (pH= 7,4) e ultracentrifugado novamente a 120000xg por 70 min 4°C. O pellet, contendo as EVs foi diluídos em PBS (proporção de 1 mL de fluido/100 µL de PBS) e aliqüotados para a utilização nos experimentos.

Validação do modelo experimental

Para comprovar a presença de EVs no fluido folicular provenientes de vacas submetidas ou não ao ET, o pellet das vesículas dos grupos experimentais foram inseridos em uma grade revestida de níquel e fixados com 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído. Após a fixação foram lavados com PBS (pH= 7,4) e contrastados com 2% de acetato de uranila e 0,13% de metil celulose acrescido de 0,4% de acetato de uranila. Após esse procedimento, as grades foram analisadas sob microscopia eletrônica de transmissão para a validação da presença de EVs no fluido folicular.

Efeito da adição de EVs sobre a maturação oocitária *in vitro*

Os ovários, predominantemente de fêmeas *Bos indicus*, foram obtidos em um abatedouro localizado a cerca de 50km de distância do laboratório. Os ovários foram transportados do abatedouro até o laboratório em aproximadamente 40 minutos em recipiente térmico contendo solução de NaCl à 0,9% estéril aquecida a 30°C. No laboratório, foram lavados em solução NaCl à 0,9%, higienizados com álcool 70%, e os folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm foram aspirados. O fluido folicular recuperado foi depositado em tubo cônico e então colocado em repouso no banho seco a 35°C para a formação do pellet de células. O pellet recuperado foi colocado, juntamente com 5 mL de

líquido folicular, em placa de Petri (90mm) para rastreamento e seleção dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs) de grau 1 e 2 de acordo com Stojkovic et al. (2001). Portanto, apenas oócitos com citoplasma homogêneo e granulações finas, ou com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, e múltiplas camadas compactas de células do *cumulus* foram utilizados nos experimentos.

Grupos de 20 CCOs foram cultivados em gotas de 90 μ L de meio básico contendo 90 μ L de meio TCM 199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO_3 (Sigma) e suplementado com piruvato (22 μ g/mL), amicacina (75 μ g/mL) e FSH (1 μ g/ml). A maturação *in vitro* foi realizada a 38,5°C por 22/24 horas, em atmosfera úmida e gasosa com 5,5% de CO_2 . Os tratamentos foram adicionados ao meio básico de maturação, conforme descrito abaixo. Os efeitos dos diferentes tratamentos foram analisados em 4 réplicas (20 CCOs/réplica) de cada um dos grupos experimentais descritos abaixo:

- Grupo 1: Controle 1 (Meio comercial – Progest[®])
- Grupo 2: Controle 2 ; 81 μ L de Meio base + 9 μ L de PBS.
- Grupo 3: TNM1 81 μ L Meio base + 9 μ L de EVs extraídos de folículos pré-ovulatórios de fêmeas não estressadas diluídas em PBS.
- Grupo 4: TNM2 81 μ L Meio base + 9 μ L de EVs extraídos de folículos pré-desvio de fêmeas não estressadas diluídas em PBS.
- Grupo 5: ESM1 81 μ L Meio base + 9 μ L de EVs extraídos de folículos pré-ovulatórios de fêmeas estressadas diluídas em PBS.
- Grupo 6: ESM2 81 μ L Meio base + 9 μ L de EVs extraídos de folículos pré-desvio de fêmeas estressadas diluídas em PBS.

Após 22/24 horas de maturação, a progressão meiótica, a fragmentação de DNA (apoptose) e expressão de genes relacionados à competência do CCOs, em oócitos e células do *cumulus* separadamente, foram realizadas.

Avaliação da maturação nuclear e apoptose em oócitos

Após 22h de maturação, os CCOs foram desnudos mecanicamente por pipetagens sucessivas em PBS contendo 1mg/ml de PVP (PBS-PVP) (polivinilpirrolidona). A técnica TUNEL (do inglês terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick

end labeling) foi utilizada para detectar a fragmentação de DNA, característica de apoptose, em oócitos desnudos (OD) conforme descrito [18]. As células foram fixadas em gotas de 100µl de solução de paraformaldeído 4% por 1 hora a temperatura ambiente (15-25°C), lavadas em PBS-PVP e armazenadas a 4°C até a realização do TUNEL. No dia da coloração, os ODs foram permeabilizados em solução 0.5% Triton-X 100 contendo 0.1% de citrato de sódio por 1 hora em câmara úmida em temperatura ambiente e lavadas três vezes em PBS-PVP. Os ODs dos controles positivo e negativo foram incubados em 200µl DNase RNase-free (Invitrogen® 50UI/ml) por 1 hora a 38.5°C no escuro e as demais células dos grupos experimentais permanecerão em solução de lavagem PBS-PVP. A reação de TUNEL foi preparada conforme indicado pelo fabricante (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche), contendo solução enzimática transferase (Tdt) + solução marcadora de 2-deoxiuridina-5-trifosfato marcado com FITC (dUTP-FITC). O controle positivo e os grupos experimentais foram incubados em gotas de 25µl da reação TUNEL em lâminas com coroa de esmalte por 1 hora a temperatura de 38.5°C no escuro e em câmara úmida. O controle negativo foi incubado em 25µl de solução marcadora na ausência da enzima transferase. Após a incubação, as células foram novamente lavadas em PBS-PVP e colocadas sobre lâminas em uma gota de 5µl da solução de Hoechst 33342 com glicerol e cobertas com lamínulas. Após 15 minutos, as células foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i). A visualização do material genético (DNA) fluorescente em azul (corante Hoechst 33342) foi verificada no microscópio (filtro de excitação de 365 nm e de emissão 420 nm) e indicou o estágio de meiose dos oócitos em MI (meiose I) ou MII (após telófase I até bloqueio da meiose II). Já a visualização de núcleos fluorescentes em verde (ensaio de TUNEL; filtro 450-490nm e de emissão 515nm) indicaram células com fragmentação no DNA.

Avaliação da expressão gênica

A análise da expressão gênica dos oócitos e células do *cummulus* foi realizada usando o ensaio TaqMan (20X, Applied Biosystems), específico para a espécie *Bos taurus*. Os genes analisados estão descritos na tabela 1 de acordo com suas características. Anteriormente a realização do qPCR, as amostras foram submetidas ao seguinte protocolo de pré-amplificação: 1,25 ul mix de ensaio (ensaio TaqMan concentrada até uma

concentração final de 0,2 x para cada um dos ensaios), 2,5 mL PreAmp TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) e 1,25 mL de cDNA. As reações foram ativadas a 95°C durante 10 min, seguido por desnaturação a 95°C durante 15s, e de anelamento e de amplificação a 60 ° C durante 4 minutos por 14 ciclos. Estes produtos pré-amplificados foram diluídos 5 vezes antes da análise por RT-qPCR com TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e ensaios TaqMan (20x, Applied Biosystem) no aparelho 96.96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits on Biomark HD System (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) utilizando o protocolo TaqMan GE 96x96 padrão, de acordo com as instruções do fabricante. A análise foi efetuada em duplicata, e os valores Ct foram calculados a partir de software do sistema (Biomark Real-time PCR Analysis, Fluidigm). Os valores relativos de expressão de cada gene foram calculados com o método $\Delta\Delta C_t$ utilizando uma amostra de controle como calibrador.

Tabela 1. Genes para análise de expressão gênica nas células do *cummulus* e oócito.

N	Sigla do Gene	Identificação do Ensaio	Nome do Gene	Função
1	IGFBP2	Bt03215063_m1	Insulin-like growth factor binding protein 2	Regulação da ação e transporte de IGF
2	IGFBP4	Bt03259498_m1	Insulin-like growth fator binding portein 4	Regulação da ação e transporte de IGF
3	IGFR1	Bt03649217_m1	Insulin-like growth fator receptor	Receptor de IGF
4	BAX	Bt03211775_g1	BCL2-associated X protein	Pro-apoptose
5	CASP9	Bt04282453_m1	Caspase 9	Pro-apoptose
6	BCL2	Bt04298952_m1	B-cell CLL/lymphoma 2	Anti-apoptose
7	MTIF3	Bt03231841_m1	mitochondrial translational initiation factor 3	Viabilidade celular
8	NLRP5	Bt03218031_m1	NLR family, pyrin domain containing 5 (MATER)	Viabilidade celular
9	STAT3	Bt03259875_g1	signal transducer and activator of transcription 3	Viabilidade celular
10	RPS25	Bt03220437_g1	ribosomal protein S25	Viabilidade celular
11	TFAM	Bt03260080_m1	transcription factor A, mitochondrial	Viabilidade celular
12	RPL15	Bt03288449_g1	ribosomal protein L15	Manutenção celular
13	PFKP	Bt04316544_m1	Phosphofructokinase, platelet	Manutenção celular
14	SDHA	Bt04307507_m1	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	Manutenção celular
15	BMP15	Bt03286494_u1	bone morphogenetic protein 15	Competência oocitária
16	GDF9	Bt03223996_m1	growth differentiation factor 9	Competência oocitária
17	OOSP1	Bt03233531_g1	oocyte-secreted protein 1	Competência oocitária
18	CAT	Bt03228716_m1	Catalase	Estresse oxidativo /Metabolismo
19	CPT1B	Bt03244638_m1	carnitine palmitoyltransferase 1B	Estresse oxidativo /Metabolismo
20	CPT2	Bt03233823_m1	carnitine palmitoyltransferase 2	Estresse oxidativo /Metabolismo
21	HAS2	Bt03212695_g1	Hyaluronan synthase 2	Expansão das células do <i>cummulus</i>
22	PTX3	Bt03249012_m1	Pentraxin 3, long	Expansão das células do <i>cummulus</i>
23	CCND2	Bt03249250_m1	cyclin D2	Ciclo celular
24	CDCA8	Bt03257047_m1	cell division cycle associated 8	Ciclo celular
25	CDK6	Bt04311261_m1	cyclin-dependent kinase 6	Ciclo celular
26	GADD45A	Bt03225650_m1	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	Ciclo celular
27	VEGFA	Bt03213282_m1	vascular endothelial growth factor A	Ciclo celular
28	HSF1	Bt03249686_m1	heat shock transcription factor 1	Proteção contra estresse térmico
29	HSP90AA1	Bt03218068_g1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	Proteção contra estresse térmico
30	CLIC3	Bt03263041_g1	Chloride intracellular channel 3	Predição da qualidade embrionária
31	GATM	Bt03237897_g1t	Glycine amidinotransferase	Predição da qualidade embrionária
32	LUM	Bt03211921_m1	Lumican	Predição de qualidade embrionária
33	FSHR	Bt03212670_m1	Follicle stimulating hormone receptor	Receptor de FSH
34	GREM1	Bt03255355_m1	Gremlin 1	Antagonista das BMPs
35	MAPK1	Bt03216714_m1	mitogen-activated protein kinase 1	Proliferação celular

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O efeito da adição, durante a maturação oocitária *in vitro*, das EVs provenientes de fluido folicular de fêmeas submetidas ou não ao ET sobre a progressão meiótica, taxa de apoptose e expressão gênica em CCOs maturados *in vitro*. Foram avaliados por análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparação de média (Tukey e contraste ortogonal) utilizando o programa JMP (versão 11.0; SAS). Os valores obtidos foram representados pela média \pm erro padrão da média (EPM). Foram consideradas diferenças significativa quando $P < 0,05$. Como não foi observado diferenças estatísticas entre os momentos de aspiração dos folículos (pré-desvio ou pré-ovulação), os dados foram agrupado de forma a comparar apenas os efeitos do tratamentos.

5. RESULTADOS

Progressão meiótica e taxa de apoptose

Foram realizadas análises pela coloração de Hoechst para avaliar a progressão da meiose. Não foi observada diferença na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de meiose II (MII) nos diferentes grupos experimentais (Controle 2 = $80,8\% \pm 7,24$; TNM1 = $75,6\% \pm 0,78$; TNM2 = $64,2\% \pm 6,89$; ESM1 = $79,5\% \pm 5,09$; ESM2 = $68,3\% \pm 7,16$ – $P > 0,05$).

A avaliação taxa de apoptose foi medida pela integridade do DNA avaliada pela técnica de TUNEL. Também não houve diferença na porcentagem de oócitos com DNA íntegro nos diferentes grupos experimentais (Controle 2 = $55,45\% \pm 21,56$; TNM1 = $67,55\% \pm 14,48$; TNM2 = $73,2\% \pm 18,35$; ESM1 = $59,25\% \pm 19,40$; ESM2 = $45,1\% \pm 15,78$ – $P > 0,05$).

A fim de avaliar apenas o efeito do estresse térmico sem a influência dos momentos do ciclo foi realizada análise de todas as amostras considerando apenas o tratamento termoneutro *versus* ET, porém também não foi notada diferença estatística na porcentagem de oócitos em MII (Controle 2 = $80,8 \pm 7,24$; TN = $77,6\% \pm 2,9$; ES = $66,30\% \pm 7,0$) nem diferença na integridade do DNA oocitário (Controle 2 = $55,45\% \pm 21,56$; TN = $63,4\% \pm 16,9$; ES = $59,15\% \pm 17,0$).

Expressão Gênica

O resultado da expressão dos genes de interesse está demonstrado nas tabelas abaixo. Os valores das médias dos *fold changes* de cada gene está seguido do seu erro padrão. Quanto maior o valor do *fold change* da amostra maior é a expressão do gene no tecido estudado.

Células do <i>Cummulus</i>						
MOMENTOS						
GENE	CONT.	Pré-Ovulação		Desvio		P
		TN	ET	TN	ET	
BAX	1,19±0,04	1,06±0,04	1,24±0,05	1,25±0,05	1,27±0,11	0,26
BCL2	1,21±0,08	1,06±0,15	1,31±0,12	1,13±0,07	1,07±0,15	0,60
BMP15	1,20±0,15	0,66±0,15	0,92±0,31	0,53±0,14	0,63±0,21	0,27
CASP9	1,36±0,12	1,11±0,07	1,21±0,06	1,23±0,08	1,25±0,14	0,58
CAT	1,58±0,10	1,35±0,14	1,43±0,06	1,53±0,16	1,43±0,16	0,76
CCND2	1,18±0,08	1,16±0,21	1,23±0,12	1,22±0,10	1,07±0,11	0,93
CDCA8	1,28±0,21	0,92±0,10	1,18±0,09	1,17±0,06	1,12±0,09	0,37
CDK6	2,33±0,42	1,98±0,16	2,07±0,14	2,00±0,25	1,96±0,24	0,86
CLIK3	1,26±0,51	0,89±0,25	1,19±0,16	1,30±0,48	1,47±0,40	0,87
CPT1B	2,17±0,30	1,57±0,08	2,00±0,24	2,10±0,33	2,28±0,37	0,47
CPT2	1,31±0,12	1,17±0,12	1,19±0,04	1,15±0,03	1,18±0,11	0,80
FSHR	0,93±0,05	0,93±0,15	1,09±0,08	0,71±0,09	0,86±0,13	0,26
GADD45A	1,13±0,30	0,98±0,20	1,14±0,15	1,22±0,18	1,26±0,13	0,88
GATM	1,47±0,07	1,29±0,17	1,56±0,10	1,48±0,08	1,59±0,23	0,62
GREM1	0,72±0,20	0,64±0,16	0,92±0,21	1,29±0,22	1,21±0,05	0,09
HAS2	0,84±0,14	0,82±0,11	0,95±0,04	0,87±0,08	0,93±0,06	0,85
HSF1	0,68±0,13	0,72±0,12	0,95±0,08	0,82±0,15	0,81±0,12	0,63
HSP90AA1	1,06±0,02	0,97±0,05	1,09±0,65	0,95±0,03	0,94±0,04	0,15
IGFR1	1,07±0,04	0,93±0,07	1,06±0,39	0,98±0,02	0,99±0,26	0,20
IGFBP2	0,90±0,09	0,78±0,09	1,18±0,32	0,95±0,24	1,05±0,27	0,78
IGFBP4	1,01±0,07 ^{ab}	0,92±0,07 ^b	1,28±0,07 ^a	1,06±0,09 ^{ab}	1,17±0,07 ^{ab}	0,04
LOCK	0,81±0,32	1,60±0,82	2,09±1,08	1,97±0,82	1,84±0,59	0,60
LUM	1,24±0,13	1,14±0,26	1,56±0,25	1,23±0,42	1,55±0,34	0,78
MAPK1	1,08±0,04	0,95±0,04	1,05±0,02	1,03±0,02	1,02±0,01	0,13
MTIF3	0,77±0,07	0,84±0,14	1,13±0,12	1,00±0,18	0,84±0,10	0,33
OOSP1	3,60±2,10	1,24±0,19	1,54±0,14	1,68±0,35	1,74±0,35	0,75
PFKP	1,35±0,10	1,12±0,08	1,30±0,08	1,34±0,06	1,41±0,16	0,39
PTX3	1,30±0,27	1,33±0,39	2,07±0,47	1,77±0,33	2,07±0,49	0,50
RPL15	0,85±0,25	0,97±0,27	1,16±0,17	1,07±0,08	1,11±0,12	0,86
RPS25	0,91±0,15	0,94±0,15	1,27±0,07	1,09±0,14	1,09±0,07	0,31
SDHA	1,00±0,07	0,93±0,04	1,08±0,39	0,99±0,01	0,98±0,009	0,25
STAT3	1,44±0,24	1,01±0,09	1,25±0,12	1,16±0,07	1,17±0,05	0,37
TFAM	2,12±0,21	2,02±0,29	2,08±0,10	2,02±0,13	2,16±0,19	0,98
VEGFA	1,42±0,21	1,12±0,26	1,03±0,18	1,26±0,09	1,20±0,10	0,66

Células do <i>Cummulus</i>				
GENE	CONTROLE	TERMONEUTRO	ESTRESSE	P
BAX	1,19±0,04	1,15±0,04	1,25±0,05	0,40
BCL2	1,21±0,08	1,10±0,08	1,19±0,10	0,67
BMP15	1,20±0,15	0,59±0,10	0,77±0,18	0,12
CASP9	1,36±0,12	1,17±0,05	1,23±0,07	0,34
CAT	1,58±0,10	1,44±0,10	1,43±0,08	0,59
CCND2	1,18±0,08	1,19±0,11	1,15±0,08	0,95
CDCA8	1,28±0,21	1,04±0,07	1,15±0,06	0,32
CDK6	2,33±0,42	1,99±0,13	2,01±0,13	0,52
CLIK3	1,26±0,51	1,09±0,26	1,33±0,20	0,81
CPT1B	2,17±0,30	1,84±0,18	2,14±0,21	0,49
CPT2	1,31±0,12	1,16±0,05	1,19±0,05	0,42
FSHR	0,93±0,05	0,82±0,27	0,97±0,24	0,44
GADD45A	1,13±0,30	1,10±0,13	1,20±0,09	0,88
GATM	1,47±0,07	1,38±0,09	1,58±0,11	0,40
GREM1	0,72±0,20	0,97±0,17	1,06±0,11	0,43
HAS2	0,84±0,14	0,85±0,06	0,94±0,03	0,54
HSF1	0,68±0,13	0,77±0,09	0,88±0,07	0,63
HSP90AA1	1,06±0,02	0,96±0,03	1,02±0,04	0,30
IGFR1	1,07±0,04	0,96±0,03	1,03±0,02	0,10
IGFBP2	0,90±0,09	0,87±0,12	1,11±0,19	0,50
IGFBP4	1,01±0,07 ^{ab}	0,99±0,06 ^b	1,23±0,05 ^a	0,01
LOCK	0,81±0,32	1,76±0,54	1,96±0,57	0,24
LUM	1,24±0,13	1,19±0,23	1,56±0,19	0,40
MAPK1	1,08±0,04	0,99±0,02	1,04±0,01	0,13
MTIF3	0,77±0,07	0,92±0,11	0,99±0,09	0,40
OOSP1	3,60±2,10	1,46±0,20	1,49±0,10	0,98
PFKP	1,35±0,10	1,23±0,06	1,35±0,09	0,46
PTX3	1,30±0,27	1,55±0,25	2,07±0,31	0,23
RPL15	0,85±0,25	1,14±0,06	1,13±0,10	0,29
RPS25	0,91±0,15	1,01±0,10	1,18±0,05	0,19
SDHA	1,00±0,07	0,98±0,01	1,03±0,02	0,58
STAT3	1,44±0,24	1,09±0,06	1,21±0,06	0,18
TFAM	2,12±0,21	2,02±0,14	2,12±0,10	0,84
VEGFA	1,42±0,21	1,19±0,13	1,12±0,10	0,40

Oócitos						
MOMENTOS						
GENE	CONT.	Pré-Ovulação		Desvio		P
		TN	ET	TN	ET	
BAX	0,93±0,09	0,65±0,08	0,86±0,07	0,72±0,07	0,86±0,12	0,24
BCL2	1,07±0,17	0,47±0,11	1,22±0,32	0,67±0,37	1,26±0,27	0,16
BMP15	0,92±0,10 ^{ab}	0,59±0,04 ^b	0,96±0,06 ^a	0,72±0,01 ^{ab}	0,83±0,09 ^{ab}	0,02
CASP9	0,73±0,05	0,62±0,13	0,80±0,15	0,61±0,13	0,70±0,08	0,66
CAT	0,69±0,06	0,62±0,07	0,80±0,15	0,61±0,13	0,64±0,08	0,56
CCND2	1,23±0,18	1,12±0,50	1,06±0,27	0,70±0,09	0,90±0,26	0,74
CDCA8	1,01±0,13	0,68±0,03	1,02±0,06	0,80±0,008	0,86±0,08	0,06
CDK6	0,57±0,05	0,40±0,12	0,72±0,13	0,30±0,09	0,44±0,06	0,09
CLIK3	0,75±0,19	0,89±0,35	0,78±0,28	0,75±0,37	0,67±0,19	0,98
CPT1B	0,59±0,06 ^{ab}	0,47±0,05 ^b	0,77±0,07 ^a	0,52±0,06 ^b	0,78±0,10 ^a	0,03
CPT2	0,80±0,08	0,69±0,02	0,84±0,06	0,67±0,05	0,68±0,003	0,18
GADD45A	1,34±0,17	0,83±0,17	1,18±0,22	1,00±0,21	1,19±0,17	0,39
GATM	0,70±0,23	0,59±0,15	1,01±0,35	0,99±0,13	0,62±0,12	0,48
GDF9	1,06±0,10	0,83±0,03	0,99±0,02	0,90±0,05	0,95±0,06	0,17
GREM1	0,89±0,04	0,72±0,11	0,95±0,14	0,64±0,04	0,67±0,02	0,10
HAS2	0,99±0,07 ^a	0,65±0,06 ^b	0,92±0,02 ^a	0,75±0,01 ^{ab}	0,80±0,08 ^{ab}	0,01
HSF1	0,86±0,11	0,54±0,07	0,93±0,10	0,79±0,09	0,64±0,03	0,06
HSP90AA1	1,26±0,19	0,91±0,05	1,17±0,14	1,09±0,07	1,13±0,07	0,41
IGFR1	0,86±0,13	0,61±0,09	0,83±0,12	0,56±0,06	0,86±0,14	0,28
IGFBP2	0,86±0,09	0,53±0,06	0,87±0,05	0,71±0,04	0,80±0,14	0,10
LUM	1,37±0,97	0,55±0,34	5,94±4,00	0,93±0,64	0,81±0,56	0,40
MAPK1	0,96±0,09	0,79±0,07	0,92±0,08	0,81±0,09	0,95±0,09	0,58
MTIF3	0,88±0,07	0,60±0,07	0,78±0,07	0,62±0,13	0,82±0,18	0,38
NLRP5	0,97±0,11	0,74±0,07	0,93±0,08	0,78±0,15	0,94±0,04	0,37
OOSP1	1,16±0,17	0,91±0,05	1,10±0,06	1,06±0,08	0,93±0,04	0,30
PFKP	1,22±0,23	0,88±0,13	0,77±0,11	0,56±0,10	0,71±0,13	0,10
PTX3	1,09±0,46	1,04±0,23	4,40±2,02	0,47±0,27	2,57±1,32	0,06
RPL15	0,88±0,03 ^{ab}	0,61±0,06 ^c	0,92±0,07 ^a	0,68±0,03 ^{bc}	0,78±0,10 ^{abc}	0,04
RPS25	1,11±0,13	0,90±0,15	1,10±0,06	1,03±0,26	0,88±0,15	0,72
SDHA	0,82±0,07	0,63±0,07	0,78±0,06	0,81±0,02	0,84±0,10	0,32
STAT3	1,01±0,10	0,72±0,05	0,96±0,08	0,77±0,07	0,93±0,13	0,19
TFAM	0,71±0,15	0,69±0,17	0,87±0,04	0,51±0,08	0,68±0,09	0,45
VEGFA	1,08±0,46	0,57±0,10	0,68±0,02	0,42±0,07	0,73±0,12	0,60

Oócitos				
GENE	CONTROLE	TERMONEUTRO	ESTRESSE	P
BAX	0,93±0,09	0,68±0,05	0,86±0,06	0,06
BCL2	1,07±0,17 ^{ab}	0,56±0,15 ^b	1,24±0,19 ^a	0,03
BMP15	0,92±0,10 ^a	0,65±0,03 ^b	0,90±0,05 ^a	0,01
CASP9	0,73±0,05	0,61±0,06	0,75±0,08	0,82
CAT	0,69±0,06	0,59±0,03	0,68±0,05	0,37
CCND2	1,23±0,18	0,94±0,28	0,98±0,18	0,72
CDCA8	1,01±0,13 ^a	0,73±0,03 ^b	0,94±0,05 ^a	0,02
CDK6	0,57±0,05	0,36±0,07	0,58±0,08	0,13
CLIK3	0,75±0,19	0,83±0,23	0,72±0,16	0,92
CPT1B	0,59±0,06 ^b	0,49±0,04 ^b	0,78±0,05 ^a	0,01
CPT2	0,80±0,08	0,68±0,02	0,76±0,04	0,26
GADD45A	1,34±0,17	0,90±0,12	1,19±0,13	0,13
GATM	0,70±0,23	0,76±0,12	0,82±0,18	0,91
GDF9	1,06±0,10 ^a	0,86±0,03 ^b	0,97±0,03 ^{ab}	0,04
GREM1	0,89±0,04	0,69±0,06	0,81±0,08	0,23
HAS2	0,99±0,07 ^a	0,69±0,03 ^b	0,86±0,04 ^a	0,04
HSF1	0,86±0,11 ^a	0,59±0,04 ^b	0,86±0,06 ^a	0,01
HSP90AA1	1,26±0,19	0,99±0,05	1,15±0,07	0,21
IGFR1	0,86±0,13	0,59±0,05	0,84±0,08	0,07
IGFBP2	0,86±0,09 ^a	0,61±0,05 ^b	0,83±0,07 ^a	0,04
LUM	1,37±0,97	0,70±0,2	2,09±1,34	0,64
MAPK1	0,96±0,09	0,80±0,05	0,93±0,06	0,22
MTIF3	0,88±0,07	0,61±0,06	0,80±0,09	0,11
NLRP5	0,97±0,11	0,76±0,07	0,94±0,04	0,11
OOSP1	1,16±0,17	0,97±0,05	1,01±0,04	0,30
PFKP	1,22±0,23 ^a	0,74±0,10 ^b	0,74±0,08 ^b	0,04
PTX3	1,09±0,46 ^b	0,85±0,20 ^b	3,49±1,12 ^a	0,03
RPL15	0,88±0,03 ^a	0,64±0,03 ^b	0,85±0,06 ^a	0,02
RPS25	1,11±0,13	0,95±0,13	0,99±0,08	0,69
SDHA	0,82±0,07	0,70±0,05	0,81±0,05	0,35
STAT3	1,01±0,10 ^a	0,74±0,04 ^b	0,95±0,07 ^a	0,04
TFAM	0,71±0,15	0,61±0,10	0,78±0,06	0,44
VEGFA	1,08±0,46	0,51±0,06	0,70±0,13	0,35

6. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou pela primeira vez que EVs obtidas a partir do fluido folicular de vacas mantidas sob condições de termo-neutralidade ou ET têm a capacidade de modular a expressão gênica de CCOs durante a maturação in-vitro.

Nas células do *cumulus* foi observado diferença estatística apenas no gene codificador da IGFBP4. As IGFBPs são proteínas da classe dos IGFs responsáveis por coordenar a ação dos membros desta família pela inibição do IGF. Em nosso experimento a IGFBP4 apresentou expressão diminuída nas células do *cumulus* no grupo termo-neutro. Foi demonstrado anteriormente que oócitos de fêmeas Nelores apresentam menor expressão dos genes codificadores das IGFBPs, quando comparados a vacas holandesas [19], indicando que os oócitos de vacas Nelores tratados com EVs de vacas holandesas sob termo-neutralidade não apresentaram modificação de sua expressão, enquanto que os oócitos tratados com EVs de vacas holandesas sob ET aumentaram sua expressão.

Nos oócitos, a IGFBP2 também apresentou maior expressão no grupo ET comparado com o grupo termo-neutro, semelhante ao que se observado em oócitos de vacas nelores comparados a vacas holandesas [19]. Esses achados em conjunto demonstram que houver menor disponibilidade de IGF livre os complexos *cumulus-oócitos* cultivados na presença de EVs oriundos de fluido folicular das vacas do grupo ET [20].

BCL-2 é um regulador da apoptose celular, esta proteína age de forma a evitar uma possível apoptose do oócito [21]. Em nosso estudo foi observado menor expressão de BCL-2 no grupo termo-neutro. A maior expressão do BCL2 no grupo ET, semelhante a observada no controle, indica provavelmente uma resposta protetora das celular para suplantam os efeitos deletérios do ET sem o desencadeamento da cascata da apoptose. Essa efeito foi demonstrado em oócito de ratas e outros tipo celulares nos quais a expressão aumentada de BCL-2 evitou a apoptose [22–24].

A STAT3 codifica uma proteína relacionada com o crescimento celular, motilidade celular e ação anti-apoptótica [25] e a sua ausência leva a morte embrionária [26]. Sendo assim a menor expressão em oócitos do grupo termo-neutro fato esse que reforça a hipótese de uma ação protetora celular devido aos efeitos do ET. A RPL15 é uma proteína que participa da composição dos ribossomos [27]. Nosso dados corroboram com achados em cistos foliculares de bovinos, onde a expressão de RPL15 se apresentou

aumentada em decorrência de uma persistência do oócito no interior do folículo sem ocorrer a ovulação [28]. Situação parecida com a que encontramos em vacas sob ET, onde os folículos crescem por mais tempo que em animais em condições normais de temperatura [29].

A BMP-15 e GDF9 são fundamentais para o desenvolvimento das células germinativas feminina em espécies monovulatórias e sua baixa expressão leva a diminuição da taxa de ovulação ou infertilidade [30–33]. A BMP15 atua melhorando a expansão das células do *cummulus* e também participa do metabolismo da glicose [34,35]. CCOs bovinos maturados na presença de BMP-15 exógena apresentaram maior absorção e utilização de glicose comparado com CCOs sem adição de BMP-15 ao meio de maturação [36]. Essas informações podem indicar que a menor expressão da BMP-15 em oócitos maturados com EVs oriundo de animais que não sofreram ET é uma sinalização celular indicando que o metabolismo celular não necessita de alterações para manter as funções normais da célula. Já nas células sob estresse a situação é outra e as células apresentam expressão gênica alterada para melhorar a produção de energia. Esta hipótese é reforçada pelo fato da BMP-15 exógena acarretar uma melhora no funcionamento das mitocôndrias e uma proteção celular contra estresse causado à células [37]. Em conjunto com a BMP-15 o CPT1B possui a função de melhorar a produção de energia pelos oócitos [38] e seu aumento no grupo ET indica que as EVs podem sinalizar para as células foliculares sob ET que elas devem aumentar sua produção de energia na tentativa de sobreviver a esta condição adversa. Adicionalmente a PFKP também auxilia no metabolismo da glicose [39], além de sua maior expressão estar relacionada com oócitos e embriões de melhor qualidade [40,41].

Assim como a BMP-15 a HAS-2, GDF9 e PTX-3 também auxiliam na expansão das células do *cummulus*, estes fatores são responsáveis pela estimulação da produção de hialuronidase, que é vital para a expansão das células do *cummulus* [35,42,43]. Entretanto foi notada diferença estatística na expressão do gene de HAS-2 apenas no grupo termo-neutro indicando que esse grupo apresentou menor produção de hialuronidase, essa menor produção pode estar relacionada com a menor produção de glicose que é importante para a produção desta substância [44]. Contudo a expressão de PTX-3 se mostrou aumentada no grupo ET, este aumento muito provavelmente é originado do aumento da produção de BMP-15, visto que oócitos suplementados com BMP-15 apresentam maior expressão de PTX-3 [45]. Em nosso estudo não foi observada expressão de GDF9 nas células do

cummulus, apenas no oócito, este dado é apoiado por estudos anteriores [46]. Recentemente demonstrou que o GDF9 é mais expresso em folículos maiores indicando sua atuação na fase final de maturação, auxiliando na expansão das células do *cummulus* [35].

A CDCA8 é uma proteína que compõe o complexo de proteínas cromossômicas de passagem, que são responsáveis pela coordenação dos cromossomos e do citoesqueleto durante a duplicação celular [47,48]. Esta proteína revelou grande importância do desenvolvimento inicial de células embrionária de ratas [49]. A CDCA8 é importante também na progressão da meiose em oócitos de ratas [50]. A diminuição da expressão desse gene no grupo termo-neutro indica então que os oócitos tratados com EVs provenientes de vacas sob ET apresentaram uma aumento da atividade celular, provavelmente em decorrência da tentativa de sobreviver ao estado de estresse.

O HSF1 é o principal fator responsável pela expressão dos genes relacionados às HSPs durante episódios de hipertermia [51]. Igualmente o HSF1 está relacionado com o metabolismo de carboidratos, transporte celular e ao citoesqueleto [52]. Nosso experimento vai de encontro com essas informações, pois oócitos tratados com EVs do grupo termo-neutro apresentaram diminuição deste gene enquanto que o grupo ET e controle mantiveram a expressão. Os genes relacionados com metabolismo de glicose e genes responsáveis por aumentar a capacidade celular de se adaptar ao ET acompanharam a expressão do gene HSF1 tanto no grupo controle como no grupo ET. Outro dado importante que as análises mostraram foi a alta expressão desse gene no grupo controle, assim como no grupo ET, essas informações contradizem com as já publicadas, onde a expressão de HSF1 foi menor em embriões de animais zebuínos submetidos ao ET [53].

O cortisol é um hormônio produzido durante situações de estresse [54], recentemente observou-se que a adição de glicocorticóides ao meio de maturação de oócitos levou a uma diminuição da expressão de genes do sistema IGF [55], resultado também observado em nosso estudo onde o aumento da expressão das IGFbps leva a diminuição da disponibilidade de IGF1 [20]. Alguns artigos demonstram que vários tipos de estresse levam a uma menor qualidade oocitária [56–61]. Entretanto outra hipótese proposta é que existe uma quantidade sub letal de estresse que os oócitos podem sofrer sem que ocorra a apoptose [62]. Especificamente com ET essa hipótese foi provada, quando uma certa temperatura e tempo de exposição ao ET melhorou a viabilidade oocitária [63]. Este mesmo comportamento foi observado em oócitos que sofreram outros

tipos de estresse [64–66]. Estudo recente demonstrou aumento da expressão de genes relacionados a viabilidade celular em oócito de ratas tratado com estresse sub letal indicando um possível mecanismo de proteção celular [67]. Este artigo apoia os dados encontrados em nossos experimentos que demonstram aumento da expressão de genes relacionados com a viabilidade celular (RPL15, STAT3, CDCA8).

A ausência de diferença entre os grupos nas análises morfológicas demonstrou que as EVs não alteraram a morfologia do oócitos, a não alteração se deve provavelmente ao pouco tempo que as células permaneceram em contato com as EVs, que não permitiu tempo hábil para mudança visíveis, entretanto a modificação da expressão gênica indica que a longo prazo poderiam ocorrer mudanças na produção embrionária. Novos estudos devem ser realizados para melhor entender a função das EVs ao decorrer do desenvolvimento embrionário.

7. CONCLUSÃO

Os achados em nosso estudo indicam uma ação atenuadora das EVs extraídos do fluido folicular de vacas não estressadas no oócito. As EVs diminuíram a expressão de alguns genes indicando para o oócito uma condição intrafolicular ideal, enquanto que as EVs de vacas sob ET indicaram uma situação adversa aumentando a expressão de genes relacionados com a sobrevivência celular. Mostrando assim a capacidade que essas vesículas tem de modular a expressão gênica dos oócitos.

8. REFERÊNCIAS

- [1] Igono MO, Bjotvedt G, Sanford-Crane HT. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. *Int J Biometeorol* 1992;36:77–87.
- [2] Rhoads ML, Rhoads RP, VanBaale MJ, Collier RJ, Sanders SR, Weber WJ, et al. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J Dairy Sci* 2009;92:1986–97. doi:10.3168/jds.2008-1641.
- [3] Wilson SJ, Marion RS, Spain JN, Spiers DE, Keisler DH, Lucy MC. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J Dairy Sci* 1998;81:2124–31. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75788-1.
- [4] De Rensis F, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - A review. *Theriogenology* 2003;60:1139–51. doi:10.1016/S0093-691X(03)00126-2.
- [5] Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens S a, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002;85:2803–12. doi:S0022-0302(02)74367-1 [pii]\n10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1.
- [6] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes : Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73:1907–20. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006.
- [7] Taylor DD, Gercel-taylor C. The origin , function , and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet* 2013;4:1–12. doi:10.3389/fgene.2013.00142.
- [8] Berckmans RJ, Sturk A, Van Tienen LM, Schaap MCL, Nieuwland R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood* 2011;117:3172–80. doi:10.1182/blood-2010-06-290460.
- [9] Caby M, Lankar D, Vincendeau-scherrer C, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 2005;17:879–87. doi:10.1093/intimm/dxh267.
- [10] Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, et al. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res* 2009;8:1304–14. doi:10.1021/pr800658c.
- [11] Pisitkun T, Shen R, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13368–73.
- [12] da Silveira JC, Veeramachaneni DNR, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod* 2012;86:71–71. doi:10.1095/biolreprod.111.093252.
- [13] Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, et al. Identification of MicroRNAs in human follicular fluid: Characterization of MicroRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:3068–79. doi:10.1210/jc.2013-1715.

- [14] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes / microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 2010;78:838–48. doi:10.1038/ki.2010.278.
- [15] Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* 2006;20:1487–95. doi:10.1038/sj.leu.2404296.
- [16] Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal* 2010;4:1167–83. doi:10.1017/S175173111000090X.
- [17] da Silveira JC, Winger QA, Bouma GJ, Carnevale EM. Effects of age on follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth factor- β signalling during follicle development in the mare. *Reprod Fertil Dev* 2015. doi:10.1071/RD14452.
- [18] Paula-Lopes FF, Boelhauve M, Habermann F a., Sinowatz F, Wolf E. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes Via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. *Biol Reprod* 2007;76:532–41. doi:10.1095/biolreprod.106.054551.
- [19] Satrapa RA, Castilho AS, Razza EM, Pegorer MF, Puelker R, Barros CM. Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. *Anim Reprod Sci* 2013;138:155–8. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.02.023.
- [20] Monget P, Mazerbourg S, Delpuech T, Maurel M, Maniere S, Zapf J, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. *Biol Reprod* 2003;68:77–86. doi:10.1095/biolreprod.102.007609.
- [21] Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 1999;213:1–17. doi:10.1006/dbio.1999.9344.
- [22] Flaws JA, Hirshfield AN, Hewitt JA, Babus JK, Furth PA. Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. *Biol Reprod* 2001;64:1153–9. doi:10.1095/biolreprod64.4.1153.
- [23] Tan JGL, Lee YY, Wang T, Yap MGS, Tan TW, Ng SK. Heat shock protein 27 overexpression in CHO cells modulates apoptosis pathways and delays activation of caspases to improve recombinant monoclonal antibody titre in fed-batch bioreactors. *Biotechnol J* 2015;10:790–800. doi:10.1002/biot.201400764.
- [24] Lee JM, Lee JM, Kim KR, Im H, Kim YH. Zinc preconditioning protects against neuronal apoptosis through the mitogen-activated protein kinase-mediated induction of heat shock protein 70. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;459:220–6. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.068.
- [25] Shimoda K, Feng J, Murakami H, Nagata S, Watling D, Rogers NC, et al. Jak1 plays an essential role for receptor phosphorylation and stat activation in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1997;90:597–604.
- [26] Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A 1997;94:3801–4. doi:10.1073/pnas.94.8.3801.
- [27] Yao J, Ren X, Ireland JJ, Coussens PM, Smith TPL, Smith GW. Generation of a bovine oocyte cDNA library and microarray: resources for identification of genes important for follicular development and early embryogenesis. *Physiol Genomics* 2004;19:84–92. doi:10.1152/physiolgenomics.00123.2004.
- [28] Choe C, Cho YW, Kim CW, Son DS, Han J, Kang D. Identification of differentially expressed genes in bovine follicular cystic ovaries. *Korean J Physiol Pharmacol* 2010;14:265–72. doi:10.4196/kjpp.2010.14.5.265.
- [29] Guzeloglu A, Ambrose JD, Kassa T, Diaz T, Thatcher MJ, Thatcher WW. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Anim Reprod Sci* 2001;66:15–34. doi:10.1016/S0378-4320(01)00082-3.
- [30] Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000;25:279–83. doi:10.1038/77033.
- [31] Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004;25:72–101. doi:10.1210/er.2003-0007.
- [32] Yoshino O, McMahan HE, Sharma S, Shimasaki S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10678–83. doi:10.1073/pnas.0600507103.
- [33] Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, et al. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev* 1998;78:135–40. doi:10.1016/S0925-4773(98)00161-0.
- [34] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008;14:159–77. doi:10.1093/humupd/dmm040.
- [35] Kona SSR, Praveen Chakravarthi V, Siva Kumar AVN, Srividya D, Padmaja K, Rao VH. Quantitative expression patterns of GDF9 and BMP15 genes in sheep ovarian follicles grown in vivo or cultured in vitro. *Theriogenology* 2016;85:315–22. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.022.
- [36] Caixeta ES, Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG, Price CA, Machado MF, et al. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* 2013;146:27–35. doi:10.1530/REP-13-0079.
- [37] Sutton-McDowall ML, Purdey M, Brown HM, Abell AD, Mottershead DG, Cetica PD, et al. Redox and anti-oxidant state within cattle oocytes following in vitro maturation with bone morphogenetic protein 15 and follicle stimulating hormone. *Mol Reprod Dev* 2015;82:281–94. doi:10.1002/mrd.22470.
- [38] Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-oxidation I is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod* 2010;83:909–18. doi:10.1095/biolreprod.110.084145.

- [39] Boruszewska D, Sinderewicz E, Kowalczyk-Zieba I, Grycmacher K, Woclawek-Potocka I. The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:44. doi:10.1186/s12958-015-0044-x.
- [40] Gebhardt KM, Feil DK, Dunning KR, Lane M, Russell DL. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertil Steril* 2011;96:47–52.e2. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.04.033.
- [41] Hammond ER, Stewart B, Peek JC, Shelling AN, Cree LM. Assessing embryo quality by combining non-invasive markers: early time-lapse parameters reflect gene expression in associated cumulus cells. *Hum Reprod* 2015;30:1850–60. doi:10.1093/humrep/dev121.
- [42] Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* 1997;272:13997–4000. doi:10.1074/jbc.272.22.13997.
- [43] Baranova NS, Inforzato A, Briggs DC, Tilakaratna V, Enghild JJ, Thakar D, et al. Incorporation of pentraxin 3 into hyaluronan matrices is tightly regulated and promotes matrix cross-linking. *J Biol Chem* 2014;289:30481–98. doi:10.1074/jbc.M114.568154.
- [44] Vigetti D, Deleonibus S, Moretto P, Karousou E, Viola M, Bartolini B, et al. Role of UDP-N-acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of hyaluronan synthase 2 in the control of chondroitin sulfate and hyaluronan synthesis. *J Biol Chem* 2012;287:35544–55. doi:10.1074/jbc.M112.402347.
- [45] Lin Z-L, Li Y-H, Xu Y-N, Wang Q-L, Namgoong S, Cui X-S, et al. Effects of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on the in vitro maturation of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2014;227:219–27. doi:10.1111/rda.12254.
- [46] Crawford JL, Heath DA, Reader KL, Quirke LD, Hudson NL, Juengel JL, et al. Oocytes in sheep homozygous for a mutation in bone morphogenetic protein receptor 1B express lower mRNA levels of bone morphogenetic protein 15 but not growth differentiation factor 9. *Reproduction* 2011;142:53–61. doi:10.1530/REP-10-0485.
- [47] Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, et al. Borealin: A novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* 2004;166:179–91. doi:10.1083/jcb.200404001.
- [48] Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A, Pozniakovski A, Funabiki H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* 2004;118:187–202. doi:10.1016/j.cell.2004.06.026.
- [49] Zhang Q, Lin G, Gu Y, Peng J, Nie Z, Huang Y, et al. Borealin is differentially expressed in ES cells and is essential for the early development of embryonic cells. *Mol Biol Rep* 2009;36:603–9. doi:10.1007/s11033-008-9220-9.
- [50] Sun S-C, Lin S-L, Zhang D-X, Lu S-S, Sun Q-Y, Kim N-H. Borealin regulates bipolar spindle formation but may not act as chromosomal passenger during mouse oocyte meiosis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010;2:991–1000.
- [51] Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 2001;15:1118–31. doi:10.1096/fj00-0294rev.
- [52] Page TJ, Sikder D, Yang L, Pluta L, Wolfinger RD, Kodadek T, et al. Genome-wide analysis

- of human HSF1 signaling reveals a transcriptional program linked to cellular adaptation and survival. *Mol Biosyst* 2006;2:627. doi:10.1039/b606129j.
- [53] Silva CF, Sartorelli ES, Castilho ACS, Satrapa RA, Puelker RZ, Razza EM, et al. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology* 2013;79:351–7. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.10.003.
- [54] Roman-Ponce H, Thatcher WW, Buffington DE, Wilkax CJ, Van Horn HH. Physiological and production responses of dairy cattle to a shade structure in a subtropical environment. *J Dairy Sci* 1977;60:424–30.
- [55] Li M, Leatherland JF, Vijayan MM, King W, Madan P. Glucocorticoid receptor activation following elevated oocyte cortisol content is associated with zygote activation, early embryo cell division, and IGF system gene responses in rainbow trout. *J Endocrinol* 2012;215:137–49. doi:10.1530/JOE-12-0030.
- [56] Agca Y, Liu J, Rutledge JJ, Critser ES, Critser JK. Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 2000;55:212–9. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200002)55:2<212::AID-MRD11>3.0.CO;2-M.
- [57] Mullen S, Rosebaum M, Critser JK. The effect of osmotic stress on the cell volume, metaphase II spindle and developmental potential of in vitro matured porcine oocytes. *Cryobiology* 2007;54:281–9. doi:10.1038/nature13314.A.
- [58] Mullen SF, Agca Y, Broermann DC, Jenkins CL, Johnson CA, Critser JK. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Hum Reprod* 2004;19:1148–54. doi:10.1093/humrep/deh201.
- [59] Ju JC, Parks JE, Yang X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Mol Reprod Dev* 1999;53:336–40. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199907)53:3<336::AID-MRD9>3.0.CO;2-M.
- [60] Tseng JK, Tang PC, Ju JC. In vitro thermal stress induces apoptosis and reduces development of porcine parthenotes. *Theriogenology* 2006;66:1073–82. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.003.
- [61] Rivera RM, Hansen PJ. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 2001;121:107–15.
- [62] Pribenszky C, Vajta G, Molnar M, Du Y, Lin L, Bolund L, et al. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biol Reprod* 2010;83:690–7. doi:10.1095/biolreprod.110.083386.
- [63] Isom SC, Lai L, Prather RS, Rucker EB. Heat shock of porcine zygotes immediately after oocyte activation increases viability. *Mol Reprod Dev* 2009;76:548–54. doi:10.1002/mrd.20975.
- [64] Pribenszky C, Du Y, Molnar M, Harnos A, Vajta G. Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim Reprod Sci* 2008;106:200–7. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.016.
- [65] Du Y, Lin L, Schmidt M, Bøgh IB, Kragh PM, Sørensen CB, et al. High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. *Cloning Stem Cells* 2008;10:325–30. doi:10.1089/clo.2007.0089.

- [66] Du Y, Pribenszky CS, Molnár M, Zhang X, Yang H, Kuwayama M, et al. High hydrostatic pressure: A new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction* 2008;135:13–7. doi:10.1530/REP-07-0362.
- [67] Bock IA, Losonczy EC, Carstea ACB, Feher AB. Controlled hydrostatic pressure stress downregulates the expression of ribosomal genes in preimplantation embryos : a possible protection mechanism ? *Reprod Fertil Dev* 2014. doi:http://dx.doi.org/10.1071/RD14346.

ELSEVIER

SEARCH MENU



> Submit your paper

> Track your paper

> Order journal

Browse journals > Theriogenology > Guide for authors

Guide for Authors

Author information pack

- Introduction
- Aims and Scope
- Types of Articles
- Page charges
- BEFORE YOU BEGIN**
- Ethics in publishing
- Human and animal rights
- Conflict of interest
- Submission declaration and
- Open access
- Green open access
- Language (usage and editing services)
- Submission
- Referees
- PREPARATION**
- Use of word processing software
- Article structure
- Artwork
- Tables
- References
- Video data
- AudioSlides
- Supplementary material
- Virtual Microscope
- Submission checklist
- Additional Style Notes

Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Aims and Scope

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Articles

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see

<https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative

works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio/>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees.

For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages and lines should be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language

help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents:

<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next

to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13.03.03].

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations:

<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations:

<http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service):

<http://www.cas.org/sent.html>

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:

<http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/about/content-innovation/virtual-microscope>. Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com>.

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete

- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."