

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 22/06/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E REPRODUTIVOS DA EXPOSIÇÃO DE VACAS
LEITEIRAS AO ESTRESSE TÉRMICO

RODRIGO DE ANDRADE FERRAZZA

BOTUCATU – SP
DEZEMBRO/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E REPRODUTIVOS DA EXPOSIÇÃO DE VACAS
LEITEIRAS AO ESTRESSE TÉRMICO

RODRIGO DE ANDRADE FERRAZZA

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia
Animal para obtenção do título de
Doutor

Orientador: Prof. Dr. João Carlos
Pinheiro Ferreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Elizabeth
Moreira dos Santos Schmidt

BOTUCATU – SP
DEZEMBRO/2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ferrazza, Rodrigo de Andrade.

Aspectos fisiológicos e reprodutivos da exposição de vacas leiteiras ao estresse térmico / Rodrigo de Andrade Ferrazza. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Coorientador: Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt

Capes: 50504002

1. Transtornos de estresse por calor. 2. Temperatura corporal - Regulação. 3. Proteômica. 4. Expressão gênica. 5. Bovino - Reprodução. 6. Fisiologia veterinária.

Palavras-chave: Bovino; Estresse térmico; Foliculogênese; Proteômica; Termorregulação.

Nome do autor: Rodrigo de Andrade Ferrazza

Título: ASPECTOS FISIOLÓGICOS E REPRODUTIVOS DA EXPOSIÇÃO DE VACAS LEITEIRAS AO ESTRESSE TÉRMICO

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti

Membro

Departamento Produção e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Araçatuba

Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal

Prof. Dr. Roberto Sartori Filho

Membro

Departamento de Zootecnia

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP – Piracicaba

Data da defesa: 22 de dezembro de 2016

EPÍGRAFE

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

À minha avó, **Maria Stefanon Ferrazza** (*in memoriam*), que nos deixou ao longo desta jornada do Doutorado. Sua sabedoria e exemplo de vida eternamente serão lembrados.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador, professor João Carlos Ferreira, pela competência com que desempenha a orientação e pelo exemplo de profissional e humanismo. Impossível expressar toda a minha admiração!

À professora Elizabeth Schmidt, pela co-orientação, incentivo acadêmico e oportunidades oferecidas.

Aos professores Fabiana Souza, Eunice Oba e Cezinande Meira, pela amizade, ensinamentos e valiosas contribuições para este trabalho.

À Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Reprodução Animal, por tornar possível a realização deste curso.

Ao professor Roberto Sartori, por ceder gentilmente o seu laboratório para realização de parte das dosagens hormonais e por emprestar as vacas utilizadas nos experimentos.

Ao professor David Eckersall, pela supervisão e aprendizado durante o desenvolvimento do projeto BEPE (Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior) e por apontar os caminhos da ciência de alto nível.

À University of Glasgow e a School of Veterinary Medicine, em especial aos técnicos e membros do laboratório do Dr. Eckersall, pelo agradável convívio, auxílio e amizade.

À professora Janet Roser, da University of California, pelos ensinamentos e acompanhamento relativos a técnica de radioimunoensaio. Agradeço também a técnica de laboratório Lillian Sibley pelo auxílio na realização das análises.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos no Brasil (Processo nº 2013/20083-8) e no exterior (Processo nº 2014/21257-2).

Aos companheiros de equipe, Henry Garcia, Viviana Aristizábal, Flávia Caroline Destro, Julian Cuervo, Felipe Dalanezi e Camilla Nogueira, pela amizade e ajuda na condução dos experimentos.

Aos meus pais, Hildete Ferrazza e Antonio Ferrazza, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã, Daniele Ferrazza, pelo incentivo e cumplicidade constante. Ao Luiz Carlos Rocha, pela amizade. E à pequena Julia Ferrazza Rocha, que torna os nossos dias muito mais felizes.

A todos os meus familiares, que me motivam e me dão estrutura e entusiasmo na busca de meus ideais.

Às vacas que participaram dos experimentos, que mesmo sem saber, doaram parte de suas vidas em prol do conhecimento e desenvolvimento da ciência.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

a.m.	<i>Ante meridiem</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADF	Acid detergent fiber
AGC	Automatic gain control
ANOVA	Analysis of variance
BCS	Body condition score
bpm	Breaths per minute / Beats per minute
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CID	Collision-induced dissociation
CP	Crude protein
D	Day
Dbt	Dry bulb temperature
DevF1	Largest follicle at deviation
DevF2	Second largest follicle at deviation
DM	Dry matter
DMI	Dry matter intake
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	1,4-dithiothreitol
E2	Estradiol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EE	Ether extract
F1	Largest follicle
F2	Second largest follicle
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDR	False discovery rate
FF	Fluido folicular / Follicular fluid
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FSH	Hormônio folículo estimulante
FTMS	Fourier transform mass analyzers
FXR	Farnesoid X receptor
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropina

h	Hour
HCD	High-energy collision-induced dissociation
HR	Heart rate
HR ₁	Morning heart rate
HR ₂	Afternoon heart rate
HS	Heat stress
IGFBPs	Proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina
IGFs	Fatores de crescimento semelhante à insulina
IPA	Ingenuity Pathway Analysis software
ITMS	Ion trap mass spectrometry
ITU	Índice de temperatura e umidade
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
LH	Hormônio luteinizante
LHr	Receptores de hormônio luteinizante
LXR	Liver X receptor
MHz	Megahertz
MM	Mineral matter
MS/MS	Tandem mass spectrometry
MS2	Second stage of mass spectrometry
MW	Molecular weight
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCE	Normalized collision energy
NDF	Neutral detergent fiber
NFC	Nonfibrous carbohydrates
NRC	National Research Council
p.m.	<i>Post meridiem</i>
P4	Progesterone
PCA	Principal component analysis
PGF2 α	Prostaglandin F2 α
pI	Isoelectric point
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PostDev	Post deviation
PreDev	Pre-deviation

PreOv	Pre-ovulatory
PSMs	Peptide spectrum matches
r	Correlation coefficient
R^2	Coefficient of determination
RH	Relative humidity
$RH_{\max-p}$	Maximum relative humidity of the previous day
RH_{mean}	Mean relative humidity
$RH_{\text{mean-p}}$	Mean relative humidity of the previous day
$RH_{\min-p}$	Minimum relative humidity of the previous day
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RR	Respiratory rate
RR_1	Morning respiratory rate
RR_2	Afternoon respiratory rate
RXR	Retinoid X receptor
SE	Standard error
SEM	Standard error of the mean
T	Treatment
T_a	Ambient temperature
TD	Interaction between treatment and day
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
THI	Temperature humidity index
$THI_{\max}$	Maximum temperature humidity index
$THI_{\max-p}$	Maximum temperature humidity index of the previous day
$THI_{\text{mean-p}}$	Mean temperature humidity index of the previous day
$THI_{\min-p}$	Minimum temperature humidity index of the previous day
$T_{\max-p}$	Maximum temperature of the previous day
$T_{\text{mean-p}}$	Mean temperature of the previous day
$T_{\min-p}$	Minimum temperature of the previous day
TMT	Tandem mass tags
TN	Thermoneutral
Tre	Rectal temperature

Tre ₁	Morning rectal temperature
Tre ₂	Afternoon rectal temperature
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VT	Vaginal temperature
VT ₁	Morning vaginal temperature
VT ₂	Afternoon vaginal temperature

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Table 1. Composition of ingredients and nutrients in the diets consumed by cows housed in a climate chamber	61
Table 2. Mean $\pm$ SEM of the environmental conditions in the climate chamber in the thermoneutral (TN) and heat stress (HS) treatments during the experimental period	62
Table 3. Mean $\pm$ SEM and variation of climate conditions and physiological parameters of Holstein cows housed in a climate chamber according to the time of the day (morning and afternoon)	63
Table 4. Daily mean, minimum, and maximum values (mean $\pm$ SEM and variation) of climate conditions and physiological parameters of Holstein cows housed in a climate chamber	64
Table 5. Effect of shift forward or backward in the dependent variables (rectal temperature, vaginal temperature, respiratory rate, heart rate, and dry matter intake) in relation to temperature humidity index on the coefficient of determination (R^2) of the regressions	65

Capítulo III

Table 1. Morphological, hormonal, and biochemical characteristics of the <i>in vivo</i> aspirated bovine follicles on different stages of follicle development	100
Table 2. Differentially expressed proteins in bovine follicular fluid over follicle development.....	101
Supplementary Table S1. List of identified proteins in bovine follicular fluid ..	111
Supplementary Table S2. Signaling pathway networks associated with proteins identified in bovine follicular fluid	117

Capítulo IV

Table 1. Environmental conditions of thermoneutral and heat stress treatments (mean $\pm$ SE and variation)	143
---	-----

Table 2. Effect of heat stress on follicular diameter, hormonal profile, and protein concentration (mean $\pm$ SE) according to the stage of follicle development of Holstein cows	144
Table 3. Differentially expressed proteins in follicular fluid from cows kept under thermoneutral and heat stress treatments.....	145
Supplementary Table S1. List of identified proteins in bovine follicular fluid ..	150

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figure 1. Mean $\pm$ SEM of rectal temperature (A) and vaginal temperature (B) of cows exposed to thermoneutral ($n = 12$, ○) or heat stress ($n = 12$, ●) conditions. Probabilities for the main effects (T, treatment; D, day) and the interaction between treatment and day (TD) are shown. The interval with a significant effect ($p < 0.05$) of the interaction between treatment and day is indicated by a dotted line with an asterisk (*). The cut between days 5 and 7 in B represents the interval when the intravaginal thermometer was removed..... 66

Figure 2. Mean $\pm$ SEM of respiratory rate (A) and heart rate (B) of cows exposed to thermoneutral ($n = 12$, ○) or heat stress ($n = 12$, ●) conditions. Probabilities for the main effects (T, treatment; D, day) and the interaction between treatment and day (TD) are shown. The dotted line with an asterisk (*) indicates the interval with a significant difference ($p < 0.05$) between treatments. On the day scale, an asterisk (*) indicates the day with a significant difference ($p < 0.05$) between treatments, and a pound sign (#) indicates a trend ($p < 0.1$)...... 67

Figure 3. Mean $\pm$ SEM of dry matter intake of cows exposed to thermoneutral ($n = 12$, ○) or heat stress ($n = 12$, ●) conditions. Probabilities for the main effects (T, treatment; D, day) and the interaction between treatment and day (TD) are shown. The dotted line with an asterisk (*) indicates the interval with a significant difference ($p < 0.001$) between treatments..... 68

Figure 4. Linear models showing the correlation between rectal temperature and vaginal temperature (A), respiratory rate (B) and dry matter intake (C). The points represent individual observations, and the line represents the regression equation. The information on the chart refers to the linear regression at the points indicated..... 69

Figure 5. Effect of heat stress on the acute response (●) and chronic response (◇) of the rectal temperature (A), vaginal temperature (B), respiratory rate (C), heart rate (D), and dry matter intake (E), expressed as Y. The points represent individual observations, the solid line represents the best-fit model for the acute response, and the dotted line represents the best-fit model for the chronic

response to heat stress. No correlation ($p > 0.05$) was observed between vaginal temperature and heart rate for the sustained response to heat stress. 70

Figure 6. Mean $\pm$ SEM of rectal temperature (black bars) and respiratory rate (white bars) grouped into three intervals of daily temperature humidity index (THI). Asterisks indicate significant differences ($p < 0.001$) between the intervals for both variables..... 71

Capítulo III

Graphical abstract..... 102

Fig. 1. Distribution of the protein molecular weight (A), protein isoelectric point (pI) values (B), protein sequence coverage (C), and number of unique peptide (D) of the identified proteins in the follicular fluid..... 103

Fig. 2. (A) Hierarchical clustering heat map showing different expression pattern of 143 proteins identified by LC-MS/MS in bovine follicular fluid over follicle development. The heat map indicates up-regulation (red), down-regulation (blue), and mean protein expression (white). The rows represent different stages of follicular development. The columns represent individual proteins. (B) PCA plots of the bovine follicular fluid proteome reveal grouping according to stage of follicle development. The data points refer to follicular fluid samples obtained at different stages of follicle development. Time points are identified by colors shown in the legend. (C) PCA biplot with proteins plotted in two dimensions using their projections onto the first two principal components, and stages of follicle development plotted using their weights for the components (red points)..... 104

Fig. 3. Gene Ontology analysis of the proteins identified in bovine follicular fluid. Proteins were classified according to (A) cellular localization, (B) biological processes, and (C) molecular function. Results are displayed as percent of genes classified to a category over the total. 105

Fig. 4. Hierarchical clustering heat map showing the effect of the stage of follicle development on protein expression profiling of 22 differentially expressed proteins in bovine follicular fluid. The heat map indicates up-regulation (red), down-regulation (blue), and mean protein expression (white). Individual proteins

are represented by a single row, and each stage of follicle development is represented by a single column. 106

Fig. 5. Correlation between abundance of proteins and estradiol (A) and progesterone (B) concentrations in bovine follicular fluid over follicle development..... 107

Fig. 6. List of the most significant canonical pathways and their respective scores obtained from Ingenuity Pathway Analysis software. Color intensity indicates the magnitude of regulation inferred from z-score (orange: up-regulation, blue: down-regulation, white: z-score = 0, indicating up-regulation of some proteins and down-regulation of other). LXR = liver X receptor; RXR = retinoid X receptor.108

Fig. 7. Network of proteins involved in the acute phase response. The network was generated in Ingenuity Pathway Analysis software. Entire lines represent direct and evidence interactions and dash lines represent presumed interactions between proteins. Colors indicate the nature of the expression: red are up-regulated and green are down-regulated. Uncolored nodes mean unspecified effect in our experiment and were integrated into the computationally generated network based on the evidence stored in the IPA knowledge memory indicating a relevance to this network..... 109

Fig. 8. Network of proteins involved in the coagulation system. The network was generated in Ingenuity Pathway Analysis software. Entire lines represent direct and evidence interactions and dash lines represent presumed interactions between proteins. Colors indicate the nature of the expression: red are up-regulated and green are down-regulated. Uncolored nodes mean unspecified effect in our experiment and were integrated into the computationally generated network based on the evidence stored in the IPA knowledge memory indicating a relevance to this network..... 110

Capítulo IV

Fig. 1. Rectal temperature (A) and respiratory rate (B) of cows exposed to thermoneutral and heat stress treatments..... 146

Fig. 2. Effect of heat stress on proteome profile of dairy cows. Hierarchical clustering heat map shows changes in protein abundance of follicular fluid at

deviation (DevF1 and DevF2) and post deviation (PostDev) stages of follicle development. The heat map indicates up-regulation (red), down-regulation (blue), and mean protein expression (white) relative to thermoneutral cows at PostDev (control). The columns represent treatments and the rows represent individual proteins. 147

Fig. 3. Significant canonical pathways associated with the proteins identified in follicular fluid. The significance of enrichment is indicated by negative log of the p-value obtained by a Fisher's exact test in IPA..... 148

Fig. 4. Heat map showing expression of the most significantly enriched genes associated to respective canonical pathways at deviation (DevF1 and DevF2) and dominance (PostDev). The heat map indicates up-regulation (red), down-regulation (blue), and mean protein expression (white) relative to thermoneutral cows at PostDev (control). The columns represent treatments and the rows represent individual proteins. HS = heat stress; TN = thermoneutral; LXR = liver X receptor; RXR = retinoid X receptor; ROS = production of nitric oxide and reactive oxygen species pathway..... 149

SUMÁRIO

RESUMO	1
Capítulo I.....	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Desenvolvimento folicular	6
2.2. Estresse térmico.....	8
2.3. Efeito do estresse térmico nos parâmetros fisiológicos e desempenho produtivo	9
2.4. Efeito do estresse térmico na função reprodutiva	10
3. REFERÊNCIAS	13
Capítulo II.....	24
Abstract.....	26
1. Introduction	27
2. Materials and Methods	28
2.1. Cows and adaptation	29
2.2. Experimental design and facilities.....	29
2.3. Feeding management and diet composition	30
2.4. Measurement of physiological variables and dry matter intake.....	31
2.5. Collection of environmental data and calculation of the temperature humidity index.....	32
2.6. Data processing.....	32
2.7. Statistical analysis	33
3. Results	34
3.1. Environmental conditions.....	34
3.2. Physiological variables, BCS, and DMI.....	35
3.3. Correlations and simple regression analysis between physiological responses.....	36
3.4. Correlations and simple regression analysis between the physiological responses and the environmental variables	37
3.5. Multiple regression analyses between environmental variables and physiological responses.....	38
3.6. Comparison between acute and chronic responses to heat stress..	40
4. Discussion	40
5. Conclusion	50

Acknowledgements.....	51
References	51
Capítulo III.....	72
Abstract.....	74
1. Introduction	75
2. Material and methods.....	76
2.1. Animals and experimental design	76
2.2. In vivo transvaginal follicular aspiration	77
2.3. Hormone analysis and sample preparation.....	78
2.4. Protein in-solution digestion and peptide labeling	79
2.5. Mass spectrometry analysis.....	79
2.6. Database searching and bioinformatics analysis	80
2.7. Statistical analysis	81
2.8. Functional analysis	82
3. Results	82
3.1. Morphological, hormonal, and biochemical characteristics of the bovine follicles	82
3.2. Proteins identified in bovine follicular fluid	83
3.3. Gene Ontology analysis.....	84
3.4. Differentially abundant proteins in the bovine follicular fluid.....	84
3.5. Correlations between differentially abundant proteins and steroids content in the bovine follicular fluid	85
3.6. Pathway analysis of differentially abundant proteins in the bovine follicular fluid	85
4. Discussion	86
5. Conclusions.....	91
Acknowledgements.....	92
References	92
Capítulo IV	123
Abstract.....	125
1. Introduction	125
2. Material and methods.....	127
2.1. Animals and experimental design	127
2.2. Physiological and environmental measurements	128
2.3. In vivo transvaginal follicular aspiration	128

2.4. Hormone assays	129
2.5. Protein in-solution digestion and peptide labeling	129
2.6. Mass spectrometry analysis	130
2.7. Database searching and bioinformatics analysis	131
2.8. Statistical analysis	132
2.9. Functional analysis	132
3. Results	133
4. Discussion	134
5. Conclusions	136
Acknowledgements	137
References	137
Capítulo V	157
Considerações finais	158

FERRAZZA, R. de A. **Aspectos fisiológicos e reprodutivos da exposição de vacas leiteiras ao estresse térmico**. Botucatu, 2016. 159 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu.

RESUMO

O estresse térmico reduz a eficiência reprodutiva em vacas leiteiras. O fluido folicular (FF) contém proteínas envolvidas na atividade e diferenciação celular do folículo e maturação oocitária. A caracterização das proteínas do FF pode contribuir para melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na foliculogênese e comprometimento da função reprodutiva durante o estresse térmico. No primeiro experimento avaliou-se o perfil proteômico do FF de vacas em diferentes estágios do desenvolvimento folicular (pré-desvio, desvio, dominância e pré-ovulatório) e foi testada a associação das proteínas com as concentrações intrafoliculares de hormônios esteroides. Foram encontradas 22 proteínas diferentemente expressas ($P < 0.05$) entre as categorias foliculares, sendo o desvio um momento-chave na determinação da expressão das proteínas. Além disso, três proteínas foram correlacionadas ($P < 0.05$) com as concentrações intrafoliculares de estradiol, enquanto dezesseis foram correlacionadas ($P < 0.05$) com as concentrações locais de progesterona. A análise de vias canônicas identificou a ativação/inibição das vias associadas com a resposta de fase aguda, sistema de coagulação, sistema complemento, receptor X do fígado e retinóide e produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. No segundo experimento, testou-se o efeito do estresse térmico sobre a expressão das proteínas do FF de vacas. Na validação do modelo

experimental, foi observado que a exposição contínua ao estresse térmico afetou os mecanismos termorregulatórios, levando a um aumento pronunciado da frequência respiratória, seguido pelo aumento da temperatura retal. As variáveis ambientais do dia anterior foram mais importantes para explicar as respostas dos parâmetros fisiológicos e ingestão de matéria seca, sendo a temperatura ambiente o principal fator envolvido na troca de calor. Embora a exposição prolongada ao estresse térmico indicasse um ajuste adaptativo, neste estudo foi observada apenas aclimação parcial. O crescimento folicular das vacas expostas ao estresse térmico foi afetado e pode, em parte, ser explicado pela expressão alterada das proteínas do FF. As 28 proteínas diferentemente ($P < 0.05$) expressas no FF de vacas estressadas por calor foram associadas, principalmente, às vias da função imune e cascata da coagulação. Tais achados indicam potenciais mecanismos moleculares e vias de sinalização envolvidos na foliculogênese e redução da fertilidade observada durante o verão.

Palavras-chave: Estresse térmico; Termorregulação; Foliculogênese; Proteômica; Bovino

FERRAZZA, R. de A. **Physiological and reproductive aspects of exposure of dairy cows to heat stress**. Botucatu, 2016. 159 p. Thesis (Doctorate) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu.

ABSTRACT

Heat stress reduces the reproductive efficiency in dairy cows. Follicular fluid (FF) contains proteins involved in the follicle activity and cell differentiation and oocyte maturation. The characterization of the proteome of FF may contribute to a better understanding of the physiological mechanisms involved in folliculogenesis and impairment of reproductive function during heat stress. In the first experiment, the FF proteomic profile of cows at different stages of follicle development (pre-deviation, deviation, dominance and pre-ovulatory) was evaluated and the association of proteins with intrafollicular concentrations of steroid hormones was tested. Twenty-two differentially expressed proteins ($P < 0.05$) were found among the follicular categories, with deviation being a critical time-point in the determination of protein expression. In addition, three proteins were correlated ($P < 0.05$) with the intrafollicular concentrations of estradiol, while sixteen were correlated ($P < 0.05$) with the local concentrations of progesterone. The canonical pathway analysis identified the activation/inhibition of the pathways associated with acute phase response, coagulation system, complement system, liver X receptor and retinoid, and production of nitric oxide and reactive oxygen species. In the second experiment, the effect of heat stress on the expression of cow FF proteins was tested. In the experimental model validation, we observed that the continuous exposure to heat stress affected thermoregulatory mechanisms,

leading to a marked increase in respiratory rate, followed by an increase in rectal temperature. The influence of environmental variables from the previous day on physiological parameters and dry matter intake were more important than the immediate effect and ambient temperature represented the most determinant factor for heat exchange. Although prolonged exposures to heat stress indicate an adaptive adjustment, in this study the acclimation process was only partial. The follicular growth of cows exposed to heat stress was affected and may be partly explained by the altered expression of the FF proteins. The 28 differentially ($P < 0.05$) expressed proteins in FF from heat stressed cows were closely associated to the immune function and the coagulation cascade pathways. Such findings indicate potential molecular mechanisms and signaling pathways involved in folliculogenesis and reduction fertility observed during the summer.

Keywords: Heat stress; Thermoregulation; Folliculogenesis; Proteomics; Bovine

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

O estresse térmico diminui a produção e a fertilidade de rebanhos leiteiros e, portanto, é um fator de significativo impacto econômico. Embora avanços nas estratégias mitigadoras de calor foram obtidos nos últimos anos, os efeitos negativos do estresse térmico na produção ainda são observados e a fertilidade continua reduzida durante o verão. Além disso, preocupações existem sobre o aquecimento global agravar ainda mais esse problema.

Os efeitos do estresse térmico sobre a fertilidade incluem aumento dos dias em aberto, diminuição da taxa de concepção e maior incidência de vacas em anestro, com efeito não só limitado ao verão, mas também nos meses subsequentes. A redução na fertilidade causada pelo estresse térmico é um problema de ordem multifatorial, pois o estresse térmico afeta as funções fisiológicas e celulares em vários tecidos. No que diz respeito à função reprodutiva, já foi demonstrado que o estresse térmico compromete o crescimento folicular (BADINGA et al., 1994; WOLFENSON et al., 1995), a secreção hormonal (WOLFENSON et al., 1995; ROTH et al., 2000), o fluxo sanguíneo para o útero (ROMAN-PONCE et al., 1978), a função do endométrio (MALAYER; HANSEN; BUHI, 1988) e do oócito (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). Uma vez confirmada a gestação, o estresse térmico também pode afetar a capacidade de desenvolvimento do embrião (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002).

Diante dos efeitos negativos do estresse térmico na reprodução, torna-se imprescindível a realização de estudos a fim de melhorar a eficiência dos sistemas de produção animal em ambientes de clima quente. Diversos estudos apontam que o estresse térmico reduz a eficiência reprodutiva em vacas leiteiras,

porém, os mecanismos moleculares que levam a infertilidade no verão são apenas parcialmente compreendidos. Dessa forma, um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na foliculogênese permitirá não só maior controle sobre a função reprodutiva, mas também novas abordagens no tratamento da infertilidade ocasionada pelo estresse térmico. Neste contexto, os presentes estudos têm como objetivo caracterizar o perfil proteômico do fluido folicular em diferentes estágios do desenvolvimento folicular em condições termoneutras; investigar os mecanismos de termorregulação e preditores de balanço calórico envolvidos durante o estresse térmico; e testar o efeito do estresse térmico sobre a expressão das proteínas do fluido folicular de vacas leiteiras.

Considerações finais

O estresse térmico diminui a produção e a eficiência reprodutiva em rebanhos leiteiros, ocasionando significativo impacto econômico. O decréscimo da fertilidade associado ao estresse térmico é um problema de ordem multifatorial, pois prejudica as funções fisiológicas e celulares em vários tecidos do sistema reprodutivo, incluindo o microambiente folicular que banha os oócitos. A determinação da composição das proteínas do fluido folicular pode ser uma ferramenta útil para investigar a fisiologia ovariana, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento folicular e maturação oocitária. Além disso, a proteômica pode melhorar o entendimento dos mecanismos patofisiológicos que levam à infertilidade durante o verão. Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram caracterizar o perfil proteômico do fluido folicular em momentos-chave do desenvolvimento folicular em condições termoneutras; investigar os mecanismos de termorregulação e preditores de balanço calórico envolvidos durante o estresse térmico intenso; e testar o efeito do estresse térmico sobre a expressão das proteínas do fluido folicular de vacas leiteiras.

A partir dos resultados obtidos, demonstrou-se a modulação temporal da expressão de proteínas do fluido folicular e a associação dessas proteínas com as concentrações intrafoliculares de hormônios esteróides. O estágio do desenvolvimento folicular levou a ativação/inibição das vias canônicas relacionadas com a resposta de fase aguda, sistema de coagulação, sistema complemento, receptor X do fígado e retinóide e produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. A exposição contínua ao estresse térmico afetou os mecanismos termorregulatórios, levando a um aumento pronunciado da frequência respiratória, seguido pelo aumento da temperatura retal. As variáveis

ambientais do dia anterior foram mais importantes para explicar as respostas dos parâmetros fisiológicos e ingestão de matéria seca, sendo a temperatura ambiente o principal fator envolvido na troca de calor. Embora a exposição prolongada ao estresse térmico indique um ajuste adaptativo, neste estudo foi observada apenas aclimatação parcial. O crescimento folicular das vacas expostas ao estresse térmico também foi afetado e pode, em parte, ser explicado pela expressão alterada das proteínas do fluido folicular. As proteínas diferentemente expressas no fluido folicular revelaram que as vias da função imune e da cascata da coagulação foram intimamente associadas com a indução experimental do estresse térmico.

Coletivamente, tais achados expandem o conhecimento corrente sobre o efeito da hipertermia nos processos termorregulatórios da espécie bovina e sobre os mecanismos moleculares e vias de sinalização envolvidos na foliculogênese e na redução da fertilidade de vacas leiteiras durante o verão, oferecendo novas perspectivas para futuras pesquisas sobre o tema.