

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 24/08/2017.

DANIELA FRANCO DA SILVA

**ALTERAÇÕES CELULARES E MOLECULARES
INDUZIDAS PELO CHOQUE TÉRMICO
EM ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes

BOTUCATU

2017

DANIELA FRANCO DA SILVA

**ALTERAÇÕES CELULARES E MOLECULARES
INDUZIDAS PELO CHOQUE TÉRMICO
EM ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Doutora em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes

BOTUCATU

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Daniela Franco da.

Alterações celulares e moleculares induzidas pelo choque térmico em espermatozoides bovinos / Daniela Franco da Silva. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fabiola Freitas de Paula Lopes
Capes: 50504002

1. Bovino - Reprodução. 2. Transtornos de estresse por calor. 3. Espermatozoides. 4. Fertilização in vitro. 5. Stress oxidativo. 6. MicroRNAs.

Palavras-chave: Bos taurus taurus; Choque térmico; Espermatozoide; Estresse oxidativo; Fertilização in vitro.

FOLHA DE AVALIAÇÃONome: **SILVA, Daniela Franco da**Título: **Alterações celulares e moleculares induzidas pelo choque térmico em espermatozoides bovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Doutora em Farmacologia e Biotecnologia.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por sempre estar ao meu lado guiando o meu caminho.

À minha mãe **Neuzina**, minha amiga, pelo incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Companheira de toda a vida e de todos os experimentos realizados de madrugada. Não teria conseguido terminar esta etapa sem as suas palavras de apoio e carinho. Pessoa que me ensinou a valorizar, ajudar e principalmente respeitar o próximo sem esperar nada em troca.

Ao meu marido **Oleksandr**, pelas longas conversas via whatsapp durante os experimentos de madrugada, principalmente pelo incentivo e todo amor e paciência durante esta etapa.

À minha orientadora, Profa Dra **Fabíola Freitas de Paula Lopes** pelo suporte, correções e incentivo. Por ter dado a oportunidade de realizar uma etapa tão importante da minha vida. Por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa sem pedir referências, apenas por confiar em mim. Agradeço a chance de aprender novas técnicas, conhecer pessoas com visões, áreas e pesquisas diferentes das quais eu já estava habituada. Sou muito grata por ampliar o meu conhecimento na área da pesquisa.

À **Universidade Estadual Paulista (UNESP), seu corpo docente, administração e direção** pela oportunidade de conclusão deste curso e por permitir levar no meu currículo, o nome de uma instituição de méritos e ética.

Ao **Programa de Pós graduação em Farmacologia e Biotecnologia do IB-UNESP -Botucatu** por ter podido fazer parte desta família. `

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

À todos os colegas e funcionários do **IB-Farmacologia e Biotecnologia**

À **Universidade Federal de São Paulo - Unifesp (Eldorado-Diadema)** por ser a minha segunda casa durante esses quatro anos.

Aos colegas do Laboratório 28 da UNIFESP (Eldorado-Diadema), **Thaís, Larissa, Weber e Flávia** por toda a colaboração, auxílio e boa convivência. Àqueles que já saíram do lab, **Débora, Janahi e Cássia** sinto falta de vocês. Ao **Pedro**, que foi o caminho para que eu chegasse até o Lab 28. E todos os ICs que já passaram ou estão no lab, **Letícia, Jú Lopes, Barbara, Juliana, Rayana, Andreia, Giulia, Natália, Isabele, Thais, Leonardo e Glauca**.

Aos colegas e professores do **Laboratório 27 da UNIFESP (Eldorado-Diadema)**, Pamela, Bruna, Paty, professora Dra. Luciana e professora Dra. Monica, pelo bom relacionamento, auxílio em experimentos e educação.

Ao Laboratório 23 UNIFESP (Eldorado-Diadema), em especial à **professora Dra Mariele e todo o seu grupo de pesquisa**, muito obrigada pelas boas conversas e auxílio em experimentos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta formação, o meu muito obrigada.

"Coragem é a resistência ao medo, o domínio do medo - não a ausência do medo"

Mark Twain

RESUMO

A função do espermatozoide pode ser comprometida por condições ambientais adversas. Estudos já demonstraram que a exposição *in vivo* e *in vitro* de espermatozoides bovinos a temperatura elevada induz a morte celular, reduz a motilidade espermática e o potencial fertilizante do espermatozoide. No entanto, as alterações celulares induzidas pelo choque térmico em espermatozoides bovinos ainda são controversas. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito do choque térmico em espermatozoides de touros holandeses na motilidade espermática, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade mitocondrial, atividade de caspase, potencial de fertilização, cinética e desenvolvimento embrionário pré-implantacional. As amostras de sêmen foram descongeladas e submetidas ao gradiente de Percoll. Na amostra controle (sem incubação) os espermatozoides foram avaliados imediatamente após o gradiente de Percoll. Posteriormente, as amostras foram incubadas à 35 °C (Controle da temperatura testicular), 38,5 °C (temperatura corporal) e 41 °C (choque térmico) por 4 horas. O choque térmico de 41 °C reduziu a motilidade espermática após 2 h de incubação em comparação com 35 e 38,5 °C. A exposição de espermatozoides a diferentes temperaturas aumentou a produção de EROs, sendo este efeito mais acentuado no grupo 41°C em relação aos demais tratamentos. O aumento das EROs em espermatozoides submetidos ao choque térmico foi seguido da redução na atividade mitocondrial espermática e aumento na atividade de enzimas caspases. A exposição de espermatozoides ao choque térmico também reduziu o potencial fecundante do espermatozoide, alterou a cinética de desenvolvimento de embriões de 2-células, a cinética da clivagem embrionária e o desenvolvimento a blastocisto. Em conclusão, a exposição de espermatozoides de touros holandeses ao choque térmico desencadeou o estresse oxidativo, alterações celulares compatíveis com apoptose e comprometeu o desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Sperm function can be compromised by adverse environmental conditions. It has been demonstrated that *in vivo* and *in vitro* exposure of bovine sperm to elevated temperature induces cell death, reduces sperm motility and fertilizing potential. However, the role of heat shock on sperm apoptosis still controversial. Therefore, the objective of this study was to determine the effect *Holstein* sperm heat shock on sperm motility, oxidative stress production, mitochondrial activity, caspase activity, fertilizing potential and subsequent preimplantation embryonic development. Frozen-thawed *Holstein* sperm were subjected to control (non-incubation: sperm were evaluated immediately after Percoll gradient) and incubation at 35°C (testicular temperature control), 38.5°C (body temperature) and 41°C (heat shock) for 4 hours. Heat shock reduced sperm motility after 3 and 4 h incubation at 41°C as compared to 35 and 38.5°C. Sperm mitochondrial activity was reduced by 38.5 and 41°C when compared to control. Heat shock also increased caspase activity after 41°C incubation for 4 hours as compared to 35°C and control. When sperm were incubated at different temperature for 4 h, there was a evidence enhance in ROS quantity induced by heat stress. Initial cleavages, evaluated as 2-cell embryo, were more expressive at 35 hpi when compared with other times of evaluation. Total cleavage was also more significant at 35 hpi.. The percentage of oocytes fertilized, cleaved and that reached the 2-cell and blastocyst stage was reduced by 41°C when compared to 35°C and control. There was no differences between 38.5 and 41°C for these variables. In conclusion, exposure of *Holstein* sperm to heat shock during 4 hours reduced sperm function as compared to sperm at testicular temperature.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	íon cálcio
CCCP	carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxiribonuclease
dsRBD	domínio de ligação de RNA de fita dupla
EROs	espécies reativas de oxigênio
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
g	Gramma
h	Hora
hpi	Horas após inseminação
H33342	hoeschst 33342
HSP	proteína do choque térmico
HSF1	fator choque térmico 1
HSF2	fator de choque térmico 2
IPCC	intergovernmental Panel on Climate Change
L	Litro
Lh	hormônio luteinizante
M	Molaridade
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mg	Miligrama
Mg	Magnésio
mM	Milimolar
micro RNA	miRNA
min	Minuto
MMP	potencial de membrana mitocondrial
mL	Mililitros

nmol	Nanomolar
Pol II	RNA polimerase II
pri-miRNA	miRNA primário
PMRs	Protaminas
TNPs	proteínas de transição
RISC	complexo de silenciamento
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RT - PCR	reação em cadeia de polimerase em tempo real
SAS	statistical analysis system
Talp	tyrode's albumin-lactate-pyruvate
T-GIST	transfecção de células germinativas intactas dos túbulos seminíferos
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UR	umidade relativa
µl	Microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
β	Beta
%	Porcentagem
×	Vezes
10 ⁶	Milhões
: para	(1:1)
®	marca registrada
<	menor que
>	maior que
±	mais ou menos
-	menos / negativo
+	mais/positivo
=	Igual
°	Grau

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Espermatogênese em touros.....	17
2.2	A célula espermática.....	19
2.3	Estresse térmico em touros.....	20
2.4	Estresse térmico na reprodução de touros.....	22
2.5	Choque térmico em espermatozoides.....	25
2.6	Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) em espermatozoides.....	27
2.7	Apoptose em espermatozoides.....	28
2.8	Desenvolvimento embrionário inicial.....	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo Geral.....	32
3.2	Objetivo Específico.....	32
4	HIPÓTESE	32
	Referências.....	33
3	Capítulo 1	45

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil é o país com o segundo maior rebanho bovino do mundo e o maior exportador de carne desde 2004 (Brasil, 2012/2013 a 2022/2023). Também é considerado um grande produtor mundial de leite bovino e sua projeção de crescimento está em torno de 1,9% ao ano (Brasil, 2012/2013 a 2022/2023).

Em sistemas de pecuária extensiva, a presença física dos touros corresponde a apenas 5% do total de animais. No entanto, na cadeia produtiva da bovinocultura, um macho é responsável por mais de 70% do melhoramento genético do rebanho (Ferreira *et al.*, 2009).

Por centenas de milhares de anos a evolução das subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* ocorreu sob diferentes condições ambientais (Hansen, 2004). Os bovinos taurinos evoluíram em clima temperado e não foram expostos ao desafio dos estresses presentes nas regiões tropicais, sendo pouco produtivos nestes ambientes. Todavia, os zebuínos evoluíram nos trópicos na presença de elevadas cargas de calor, de doenças tropicais e de alto desafio de parasitas internos e externos (Assis, 2007). Ademais, esses animais tendem a ter uma menor exigência nutricional e a responder melhor do que animais *Bos taurus taurus* em ambientes com certo grau de restrição nutricional (Medeiros e Vieira, 1997). Entretanto, os bovinos em condições de estresse térmico, induzidos artificialmente quanto naturalmente pela estação do ano, apresentam inibição da secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas). Como consequência, na hipófise anterior, há a queda na liberação de LH (hormônio luteinizante) e de FSH (hormônio folículo estimulante). A diminuição na liberação das gonadotrofinas (LH e FSH) afeta produção de estrógenos, acarretando vários problemas de ordem reprodutiva no macho e na fêmea (Butler *et al.*, 2003; De Rensis e Scaramuzzi, 2003)

Grande parte dos animais de produção apresentam perda de sua performance reprodutiva com o aumento de 1 °C na temperatura retal (MCDowell *et al.*, 1976). Este aumento de temperatura quando nas primeiras 12 h após inseminação artificial diminui a fertilização em cerca de 16% e aumenta a taxa de mortalidade embrionária de 45 para 61% entre os dias 35 e 42 de gestação (Ulberg e Burfening, 1967). Assim, em vacas lactantes a exposição em temperaturas e umidade elevadas causa hipertermia, resultando em estresse térmico e diminuição dos índices de gestação (Al-katanani *et al.*, 1999). Nestas condições, os animais podem atingir e até ultrapassar temperaturas retais de 41

°C (Ealy et al., 1993) estando esta temperatura associada à baixa taxa de prenhez (Ulberg e Burfening, 1967).

A infertilidade ou sub-fertilidade de touros é um dos principais problemas em criação animal, pois tem um impacto significativo sobre o desempenho reprodutivo do rebanho. Os efeitos das mudanças climáticas e do aquecimento global afetam imensamente a saúde dos bovinos (Nardone *et al.*, 2010). As altas temperaturas típicas do Brasil promovem o aumento da temperatura corporal em animais de aptidão para a produção de leite e carne, o que resulta em diminuição da produtividade e fertilidade (Hansen, 2009).

Entre as diversas causas que provocam a diminuição do desempenho reprodutivo de touros, destacam-se as condições ambientais adversas (Hansen, 2009). Segundo Skinner Louw (1966), a temperatura ambiente crítica para prejuízo na espermatogênese em touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* está entre 27 °C e 32 °C. Estas temperaturas causam estresse térmico levando ao aumento da temperatura escrotal e testicular com consequente degeneração testicular (Waites, 1970).

Estudos utilizando modelo de insulação escrotal demonstraram que o aumento da temperatura escrotal causa erros na espermatogênese com aumento na produção de espermatozoides anormais, redução da motilidade e comprometimento da maturação espermática. Nestes estudos, as alterações espermáticas ocorreram 12 a 14 dias após a exposição do animal ao estresse térmico, permanecendo por 26 a 90 dias pós-insulação escrotal, dependendo da severidade de estresse térmico ao qual os animais foram submetidos (Setchell, 1998). Além disto, a insulação escrotal reduziu o número total de espermatozoides ejaculados possivelmente devido reabsorção dos espermatozoides com defeitos morfológicos no epidídimo e ductos deferentes. No entanto, o número de espermatozoides ejaculados retornou aos valores experimentais iniciais após a remoção da insulação escrotal (Setchell, 1998). Nestes estudos, as taxas de clivagem demonstraram-se semelhantes quando oócitos foram fecundados com espermatozoides de touros pré-insulação e nos dias 7 e 14 pós- insulação. No entanto, as taxas de blastocisto foram reduzidas quando os oócitos foram fecundados com espermatozoides coletados no dia 14 e 21 pós-insulação (Fernandes *et al.*, 2008). Além de reduzir a capacidade fecundante do espermatozoide, o estresse térmico também aumentou as taxas de blastômeros positivos para apoptose após a fecundação de oócitos com sêmen coletado de touros submetidos à insulação escrotal de 48 horas (Walters *et al.*, 2005).

Os efeitos diretos da temperatura elevada na função espermática também já foram demonstrados em experimentos *in vitro* (choque térmico). A exposição de espermatozoides bovinos as temperaturas entre 41 a 43 °C reduziram a viabilidade espermática em função do tempo de exposição quando comparados ao controle 39 °C. A exposição dos espermatozoides a temperatura de 41 °C por 3 ou 4 horas, levou a diminuição da motilidade espermática. As temperaturas de 41 °C e 42 °C reduziram a velocidade espermática, enquanto que a temperatura de 43 °C reduziu significativamente a viabilidade e motilidade dos espermatozoides (Monterroso *et al.*, 1995). No entanto, não foram observadas diferenças na resistência ao choque térmico entre espermatozoides *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* (Chandolia *et al.*, 1999).

O efeito deletério do choque térmico na capacidade fecundante do espermatozoide e na capacidade de produzir embriões depende da intensidade do estresse (Chandolia *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 2014). A incubação de espermatozoides à 38,5 °C e 40 °C por 4 horas diminuiu a motilidade espermática em ambos os grupos, sendo esta redução mais severa na temperatura de 40 °C. Outrossim, a incubação dos espermatozoides a 40 °C por 4 horas não afetou as taxas de fecundação, clivagem e desenvolvimento a blastocisto (Hendricks *et al.*, 2009). Entretanto, quando espermatozoides foram submetidos ao choque térmico de 41 °C por 4 horas houve redução na porcentagem de células espermáticas com motilidade progressiva, na integridade de membrana plasmática, no potencial de membrana mitocondrial, na proporção de oócitos fecundados (formação de pró-núcleos), clivados e que atingiram o estágio de blastocisto (Rahman *et al.*, 2014).

Deste modo, a infertilidade causada pelo estresse térmico é um problema de ordem multifatorial, pois afeta as funções fisiológicas e celulares em vários tecidos. No que diz respeito à função reprodutiva do touro, o estresse térmico causa erros na espermatogênese com aumento na produção de espermatozoides anormais, comprometimento da maturação espermática no epidídimo e redução da motilidade (Setchell, 1998). Já no trato reprodutor da vaca o estresse térmico compromete o crescimento folicular (Badinga *et al.*, 1993; Wolfenson *et al.*, 1995), a função do endométrio (Malayer *et al.*, 1988), o fluxo sanguíneo para o útero (ROMAN-PONCE *et al.*, 1978) além de reduzir a taxa de fertilização e aumentar a morte embrionária (Ulberg e Burfening, 1967). Com tal características, o intuito deste trabalho foi avaliar o efeito do trato reprodutor da vaca no choque térmico de espermatozoides de touros holandeses.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, K. A.; BHARGAVA, P. M. Nucleic acid metabolism of mammalian spermatozoa. **Biochem J**, v. 86, p. 298-307, Feb 1963. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14010728> >.

AKERFELT, M. et al. Promoter ChIP-chip analysis in mouse testis reveals Y chromosome occupancy by HSF2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 32, p. 11224-9, Aug 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18682557> >.

ALBERTS, B. **Molecular Biology of the Cell**. New york: 1994.

AMANAI, M.; BRAHMAJOSYULA, M.; PERRY, A. C. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. **Biol Reprod**, v. 75, n. 6, p. 877-84, Dec 2006. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943360> >.

AMARAL, A.; RAMALHO-SANTOS, J. The male gamete is not a somatic cell- the possible meaning of varying sperm RNA levels. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 2, p. 179-80, Jan 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22703389> >.

ANTON, E.; KRAWETZ, S. A. Spermatozoa as biomarkers for the assessment of human male infertility and genotoxicity. **Syst Biol Reprod Med**, v. 58, n. 1, p. 41-50, Feb 2012. ISSN 1939-6376. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22239080> >.

ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. **J Dairy Sci**, v. 77, n. 7, p. 2044-50, Jul 1994. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929964> >.

ARRUDA, R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). . 2000. 121 Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo., São Paulo - Pirassununga.

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

AUSTIN, J. W.; HUPP, E. W.; MURPHEE, R. L. Effects of scrotal insulation on semen of Hereford bulls. **Journal of Animal Science**, v. 20, p. 307-310, 1961.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438> >.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Can Vet J**, v. 35, n. 2, p. 93-102, Feb 1994. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069831> >.

BETTEGOWDA, A.; WILKINSON, M. F. Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 365, n. 1546, p. 1637-51, May 2010. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403875> >.

BJÖRK, J. K. et al. miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis. **Development**, v. 137, n. 19, p. 3177-84, Oct 2010. ISSN 1477-9129. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724452> >.

BLOOM, D.; FAWCETT, D. W. **A textbook of Histology**. Saunders Company. Philadelphia: 1975.

BOUHALLIER, F. et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. **RNA**, v. 16, n. 4, p. 720-31, Apr 2010. ISSN 1469-9001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150330> >.

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

BRIONIZIO, J. D.; MAINIER F. B. Avaliação de temperatura e umidade em uma câmara climática . ENQUALAB, 2006.

BRITO, L. F. et al. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 79, n. 1-2, p. 1-15, Nov 2003. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853175> >.

BRYKCYNSKA, U. et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. **Nat Struct Mol Biol**, v. 17, n. 6, p. 679-87, Jun 2010. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473313> >.

BUJAN, L. [Environment and spermatogenesis]. **Contracept Fertil Sex**, v. 26, n. 1, p. 39-48, Jan 1998. ISSN 1165-1083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9532881> >.

BUTLER, S.T.; MARR, A.L.; PELTON, S.H.; RADCLIFF, R.P.; LUCY, M.C.; BUTLER, W.R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative

energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **J Endocrinol**, v. 176, p. 205-217, 2003.

BUKOWSKA, D. et al. Analysis of integrins and vascular endothelial growth factor isoforms mRNA expression in the canine uterus during perimplantation period. **Pol J Vet Sci**, v. 14, n. 2, p. 253-8, 2011. ISSN 1505-1773. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21721410> >.

BUSHATI, N.; COHEN, S. M. microRNA functions. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 175-205, 2007. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506695> >.

CARLETON, M.; CLEARY, M. A.; LINSLEY, P. S. MicroRNAs and cell cycle regulation. **Cell Cycle**, v. 6, n. 17, p. 2127-32, Sep 2007. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786041> >.

CARLSEN, E. et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **BMJ**, v. 305, n. 6854, p. 609-13, Sep 1992. ISSN 0959-8138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1393072> >.

CHANDOLIA, R. K.; REINERTSEN, E. M.; HANSEN, P. J. Short communication: lack of breed differences in responses of bovine spermatozoa to heat shock. **J Dairy Sci**, v. 82, n. 12, p. 2617-9, Dec 1999. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10629808> >.

CHUMA, S.; NAKANO, T. piRNA and spermatogenesis in mice. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 368, n. 1609, p. 20110338, Jan 2013. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166399> >.

CURRY, E.; ELLIS, S. E.; PRATT, S. L. Detection of porcine sperm microRNAs using a heterologous microRNA microarray and reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Mol Reprod Dev**, v. 76, n. 3, p. 218-9, Mar 2009. ISSN 1098-2795. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19012322> >.

DADOUNE, J. P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microsc Res Tech**, v. 61, n. 1, p. 56-75, May 2003. ISSN 1059-910X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672123> >.

DE LEEUW, F. E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, n. 2, p. 171-83, Apr 1990. ISSN 0011-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2331890> >.

DE ROOIJ, D. G.; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **J Androl**, v. 21, n. 6, p. 776-98, 2000 Nov-Dec 2000. ISSN 0196-3635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105904> >.

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

DUKES. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 1988.

FAGOONEE, S. et al. Potential applications of germline cell-derived pluripotent stem cells in organ regeneration. **Organogenesis**, v. 7, n. 2, p. 116-22, 2011 Apr-Jun 2011. ISSN 1555-8592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593601> >.

FERNANDES, C. E. et al. Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1560-8, Dec 2008. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18723216> >.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-48, Mar 2009. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121865> >.

FERREIRA, F. et al. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 732-738, 2006.

FONSECA, V. O.; CHOW, L. A. Características seminais de touros zebus com degeneração testicular transitória. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 707-716, 1995.

GABALDI, S. H. Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore submetidos à insulação escrotal. 1999. 85 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphatedependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, p. 340-350, 2002.

GADELLA, B. M. et al. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. **Int J Dev Biol**, v. 52, n. 5-6, p. 473-80, 2008. ISSN 0214-6282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18649260> >.

Garcia M. L. S; Fernández G. C. **EMBRIOLOGIA**: 2º edição, 2001.

GARRIDO, N. et al. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. **Reprod Biomed Online**, v. 17, n. 6, p. 855-65, Dec 2008. ISSN 1472-6491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079971> >.

GRISART B, MASSIP A, DESSY F 1994 Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. **Journal of Reproduction and Fertility** 101 257-264.

GHOLAMI, H. et al. Improvement of Semen Quality in Holstein Bulls during Heat Stress by Dietary Supplementation of Omega-3 Fatty Acids. **Int J Fertil Steril**, v. 4, n. 4, p. 160-7, Jan 2011. ISSN 2008-076X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24851176> >.

GILBERT, I. et al. A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1073-86, Jun 2007. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17636162> >.

GRUNEWALD, S. et al. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. **Andrologia**, v. 37, n. 2-3, p. 69-71, Jun 2005. ISSN 0303-4569. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16026427> >.

GUR, Y.; BREITBART, H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. **Genes Dev**, v. 20, n. 4, p. 411-6, Feb 2006. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449571> >.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: **Oxford University Press**, 1999. 936p.

HAMMOUD, S. S. et al. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. **Nature**, v. 460, n. 7254, p. 473-8, Jul 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19525931> >.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 349-60, Jul 2004. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271465> >.

_____. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1534, p. 3341-50, Nov 2009. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19833646> >.

HAYASHI, K. et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. **PLoS One**, v. 3, n. 3, p. e1738, 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18320056> >.

HE, H. et al. Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. **J Biol Chem**, v. 278, n. 37, p. 35465-75, Sep 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813038> >.

HENDRICKS, K. E.; MARTINS, L.; HANSEN, P. J. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to post-ejaculatory aging and heat shock: development to the blastocyst stage and sex ratio. **J Reprod Dev**,

v. 55, n. 1, p. 69-74, Feb 2009. ISSN 0916-8818. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957823> >.

HENKEL, R. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. **Asian J Androl**, v. 14, n. 2, p. 260-9, Mar 2012. ISSN 1745-7262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138904> >.

HESS, R. A.; RENATO DE FRANCA, L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. **Adv Exp Med Biol**, v. 636, p. 1-15, 2008. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19856159> >.

Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C, Callesen H 1998 Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology** v. 50 p. 1285-1299.

IZADYAR, F. et al. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. **Reproduction**, v. 124, n. 1, p. 85-94, Jul 2002. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12090922> >.

JOHNSON, G. D. et al. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 21-36, Jan 2011. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876223> >.

JOHNSON, L. et al. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 471-80, Jul 2000. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844217> >.

KAUR. S; BANSAL M. P. Protective role of dietary-supplemented selenium and vitamin E in heat-induced apoptosis and oxidative stress in mice testes . **Andrology** p. 1109-19 v. 47. PMID: 25521483 DOI: 10.1111/12390. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25521483> >.

KALLIO, M. et al. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. **EMBO J**, v. 21, n. 11, p. 2591-601, Jun 2002. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032072> >.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 13, n. 2, p. 271-82, Jul 1997. ISSN 0749-0720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9216048> >.

KEMPISTY, B. et al. Morphological and molecular aspects of zygote formation and early stages of embryo development in pigs in light of genetic and microfluidic research v. 67, p. 380-384, 2011.

KIANI, J.; RASSOULZADEGAN, M. A load of small RNAs in the sperm - how many bits of hereditary information? **Cell Res**, v. 23, n. 1, p. 18-9, Jan 2013. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266892> >.

KRAMER, J. A.; KRAWETZ, S. A. RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. **Mol Hum Reprod**, v. 3, n. 6, p. 473-8, Jun 1997. ISSN 1360-9947. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9239735> >.

KRAWETZ, S. A. et al. A survey of small RNAs in human sperm. **Hum Reprod**, v. 26, n. 12, p. 3401-12, Dec 2011. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21989093> >.

LARSON KL, DEJONGE CJ, BARNES AM, JOST LK, EVENSON DP 2000 Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. **Human Reproduction** 15 1717-1722.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **J Anim Sci**, v. 48, n. 1, p. 76-86, Jan 1979. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/573253> >.

LEWIS, B. P. et al. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787-98, Dec 2003. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697198> >.

LIAN, J. et al. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 7, p. 13, 2009. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210773> >.

LIU, W. M. et al. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 2, p. 490-4, Jan 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22203953> >.

MAATOUK, D. M. et al. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. **Biol Reprod**, v. 79, n. 4, p. 696-703, Oct 2008. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633141> >.

MACLAUGHLIN, J.; TERNER, C. Ribonucleic acid synthesis by spermatozoa from the rat and hamster. **Biochem J**, v. 133, n. 4, p. 635-9, Aug 1973. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4748826> >.

MARCON, E. et al. miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. **Chromosome Res**, v. 16, n. 2, p. 243-60, 2008. ISSN 0967-3849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204908> >.

MARENGO, J. A. Caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI. Brasília: MMA 2006.

MAYA-SORIANO, M. J. et al. Retinol might stabilize sperm acrosomal membrane in situations of oxidative stress because of high temperatures. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 367-73, Jan 2013. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23149412> >.

MEDEIROS, L. F. D.; VIEIRA, D. H. **Bioclimatologia Animal**. Rio de Janeiro: 1997.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343-9, Sep 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372041> >.

MEISTRICH, M. L. et al. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. **Chromosoma**, v. 111, n. 8, p. 483-8, May 2003. ISSN 0009-5915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12743712> >.

MEYERHOEFFER, D. C. et al. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. **J Anim Sci**, v. 60, n. 2, p. 352-7, Feb 1985. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3988628> >.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 287-301, Feb 2010. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759174> >.

MONTERROSO, V. H. et al. Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 947-61, Nov 1995. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727790> >.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Hum Reprod Update**, v. 3, n. 5, p. 403-39, 1997 Sep-Oct 1997. ISSN 1355-4786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528908> >.

MW, P. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** p. 29-45, 2001.

NAGY ZP, JANSSENSWILLEN C, JANSSENS R, DE VOS A, STAESSEN C, VAN DE VELDE H, VAN STEIRTEGHEM AC 1998 Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. **Human Reproduction** 13 1606-1612.

NARDONE, A. et al. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems v. 130, p. 57-69, 2010.

OSTERMEIER, G. C. et al. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**, v. 429, n. 6988, p. 154, May 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15141202> >.

PATEL OV, BETTEGOWDA A, IRELAND JJ, COUSSENS PM, LONERGAN P, SMITH GW 2007 Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction** 133 95-106.

PAPAIOANNOU, M. D.; NEF, S. microRNAs in the testis: building up male fertility. **J Androl**, v. 31, n. 1, p. 26-33, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1939-4640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875496> >.

PARAZZINI, F.; BORTOLOTTI, A.; COLLI, E. Declining sperm count and fertility in males: an epidemiological controversy. **Arch Androl**, v. 41, n. 1, p. 27-30, 1998 Jul-Aug 1998. ISSN 0148-5016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9642457> >.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biol Reprod**, v. 66, n. 4, p. 1169-77, Apr 2002. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11906938> >.

PEREIRA, J. C. C. Fundamentos de bioclimatologia aplicados a produção animal. FEP MVZ. Minas Gerais: 2005.

PEZZINI, T. G. et al. Características seminais de touros Curraleiros e Holandeses submetidos a insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 41, p. 863-868, 2006.

PIRKKALA, L.; NYKÄNEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **FASEB J**, v. 15, n. 7, p. 1118-31, May 2001. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344080> >.

PINO JA, OSSES N, OYARZÚN D, FARÍAS JG, MORENO RD, REYES JG. Differential effects of temperature on reactive oxygen/nitrogen species production in rat pachytene spermatocytes and round spermatids. **Reproduction** Jan. 2013 24;145(2):203-12. doi: 10.1530/REP-12-0330. Print 2013 Feb. PMID: 23241345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23241345> >.

PITTOGGI, C. et al. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 20), p. 3537-48, Oct 1999. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504302> >.

PREMKUMAR, E.; BHARGAVA, P. M. Transcription and translation in bovine spermatozoa. **Nat New Biol**, v. 240, n. 100, p. 139-43, Nov 1972. ISSN 0090-0028. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4509027> >.

RAHMAN, M. B. et al. Bovine spermatozoa react to in vitro heat stress by activating the mitogen-activated protein kinase 14 signalling pathway. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, n. 2, p. 245-57, Jan 2014. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23327743> >.

REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901-6, Feb 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706289> >.

ROMERO, Y. et al. Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25241, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998645> >.

ROUSSEAU, S. et al. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. **Reprod Biomed Online**, v. 16, n. 4, p. 492-503, Apr 2008. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413057> >.

RP, A. **Sperm production rates**. Academic Press. New York: 1970. 433-482.

RUBY, J. G. et al. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1193-207, Dec 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174894> >.

SALUMETS A, HYDÉN-GRANSKOG C, MÄKINEN S, SUIKKARI AM, TIITINEN A, TUURI T 2003 Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. **Human Reproduction** 18 821-825

SARGE, K. D. et al. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. **Genes Dev**, v. 5, n. 10, p. 1902-11, Oct 1991. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717345> >.

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A 1998 Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. **Human Reproduction** 13 182-187.

SEKONI, V. O.; GUSTAFSSON, B. K. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. **Br Vet J**, v. 143, n. 4, p. 312-7, 1987 Jul-Aug 1987. ISSN 0007-1935. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3620889> >.

SETCHELL, B. P. The Parkes Lecture. Heat and the testis. **J Reprod Fertil**, v. 114, n. 2, p. 179-94, Nov 1998. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10070346> >.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **J Appl Physiol**, v. 21, n. 6, p. 1784-90, Nov 1966. ISSN 0021-8987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5951717> >.

SYSTEM, S. A. **SAS**. EUA SAS Institute Inc., Cary, NC, 2002

TANG, F. et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. **Genes Dev**, v. 21, n. 6, p. 644-8, Mar 2007. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369397> >.

TURNER, M. J.; JIAO, A. L.; SLACK, F. J. Autoregulation of lin-4 microRNA transcription by RNA activation (RNAa) in *C. elegans*. **Cell Cycle**, v. 13, n. 5, p. 772-81, Mar 2014. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24398561> >.

TUSHER, V. G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 9, p. 5116-21, Apr 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309499> >.

VALENÇA RMB, GUERRA MMP. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.47-53, 2007.

VAN MONTFOORT AP, DUMOULIN JC, KESTER AD, EVERS JL 2004 Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. **Human Reproduction** 19 2103-2108.

VAN SOOM A, VAN VLAENDEREN I, MAHMOUDZADEH AR, DELUYKER H, DE KRUIF A 1992 Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology** 38 905-919.

VAN SOOM A, YSEBAERT MT, DE KRUIF A 1997 Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development** 47 47-56.

VANDAELE L, MATEUSEN B, MAES DG, DE KRUIF A, VAN SOOM A 2007 Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine in vitro produced embryos of different developmental capacity. **Reproduction** 133 709-718. 60.

VANDAELE L, MATEUSEN B, MAES D, DE KRUIF A, Van Soom A 2006 Is apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental kinetics and in vivo bull fertility? **Theriogenology** 65 1691-1703.

VOGLER, C. J. et al. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **J Dairy Sci**, v. 74, n. 11, p. 3827-35, Nov 1991. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1757624> >.

XU KP, GREVE T 1988 A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility** 82 127-134.

WAITES, G. M. H. **The testis**. Academic Press. New York: 1970.

WALTERS, A. H. et al. 5. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1925-37, Apr 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15823349> >.

WANG, G. R.; ZHOU, Z. D.; GE, Z. M.; ZHAO, M. J. Preliminary investigation of relationship between sperm apoptosis and male infertility. *Zhonghua Nan Ke Xue*, Beijing, v. 8, p. 25-27, 2002.

WARD F, RIZOS D, CORRIDAN D, QUINN K, BOLAND M, LONERGAN P 2001 Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction and Development* 60 47-55.

WENG, S. L.; SCHUFFNER, A.; MORSHEDI, M.; BEEBE, S.; TAYLOR, S.; OEHNINGER, S. C. Caspase-3 activity is present at low levels in ejaculated human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, New York, v. 76, n. 3, p. 193, 2001.

WRZESKA, M.; REJDUCH, B. Genomic imprinting in mammals. **J Appl Genet**, v. 45, n. 4, p. 427-33, 2004. ISSN 1234-1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15523153> >.

WU, Q. et al. The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis. **J Biol Chem**, v. 287, n. 30, p. 25173-90, Jul 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665486> >.

YADAV, R. P.; KOTAJA, N. Small RNAs in spermatogenesis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 382, n. 1, p. 498-508, Jan 2014. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23632103> >.

YAN, N. et al. Microarray profiling of microRNAs expressed in testis tissues of developing primates. **J Assist Reprod Genet**, v. 26, n. 4, p. 179-86, Apr 2009. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19242788> >.

YOSHIOKA K, SUZUKI C, IWAMURA S 2000 Effects of activin A and follistatin on developmental kinetics of bovine embryos: cinematographic analysis in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility** 118 119-125.

_____. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. **Reproduction**, v. 134, n. 1, p. 73-9, Jul 2007. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641090> >.

YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev**, v. 17, n. 24, p. 3011-6, Dec 2003. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681208> >.