

PEDRO HENRIQUE BUGALLO RISOLIA

**O efeito do fator de crescimento semelhante à insulina-I em
oócitos coletados de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* expostas
ao estresse térmico *in vivo***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação do
Instituto de Biociências de
Botucatu, Universidade Estadual
Paulista- UNESP para obtenção do
título de mestre em Ciências
Biológicas, Área Farmacologia

Orientadora: Profa Dra Fabíola Freitas de Paula Lopes

Botucatu- SP

2013

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

Risolia, Pedro Henrique Bugallo.

O efeito do fator de crescimento semelhante à insulina-I em oócitos coletados de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* expostas ao estresse térmico in vivo / Pedro Henrique Bugallo Risolia. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fabíola Freitas de Paula Lopes

Capes: 21001006

1. Bovino - Reprodução. 2. Oócitos. 3. Fertilização in vitro. 4. Zebu.

Palavras-chave: *Bos indicus*; *Bos taurus*; Estresse Térmico; IGF-I; Oócito.

Pedro Henrique Bugallo Risolia

O efeito do fator de crescimento semelhante à insulina-I em
oócitos coletados de vacas ***Bos indicus*** e ***Bos taurus*** expostas ao
estresse térmico ***in vivo***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra Fabiola Freitas de Paula Lopes

Comissão examinadora:

Prof(a). Dr(a).....
Universidade.....

Prof(a). Dr(a).....
Universidade.....

Prof(a). Dr(a).....
Universidade.....

Botucatu, 29 de Julho de 2013.

**Dedico à todos que me ajudaram direta ou
indiretamente,**

**À minha família...
Aos meus amigos...
À minha namorada...**

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo suporte, paciência e ajuda. Que até nos momentos mais difíceis estavam lá para dar um empurrão.

À Urya, que mesmo em aula, semana de provas, cansada ia me visitar e me ajudar em Pirassununga. Teve paciência e controle para me aturar nos momentos mais complicados, sempre tentando me trazer paz e um pouco de felicidade. Obrigado por aparecer na minha vida.

À Fabíola, minha orientadora e amiga, e às vezes irmã. Obrigado por esses 5 anos de orientação. Já seriam quase um mestrado e um doutorado! Obrigado também por me ajudar com problemas fora do laboratório, me ouvir e me colocar no rumo novamente. Obrigado por confiar em mim a responsabilidade deste projeto, que mesmo depois de tantos problemas, acabou por acontecer. Obrigado por todos ensinamentos acumulados ao longo destes anos, que tentei passar aos alunos que passaram e àqueles que ainda estão no laboratório. Agradeço também ao Maurício por toda ajuda indireta e direta ao projeto.

Ao professor Visintin por ter viabilizado o projeto, acelerado e inspecionado a obra da câmara climática desde o início na licitação. Obrigado por ter praticamente me co-orientado.

Ao Instituto de Biociência e todos os professores da UNESP- Botucatu.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia de São Paulo e de Pirassununga aonde o trabalho foi realizado.

À todos do VRA que conviveram durante o experimento, Flávia, Giana, Thais, Adriano, Robinson, Ju, Catarina, Pedro, Letícia, Patrícia, Mariana Giassetti, Renata, Camilla, Zeca, Samir, Rafaela, Fernanda, Profa Mayra. Ao Weber por todas conversas, ajudas, palpites e amizade. Ao Marcílio por toda ajuda na estatística. À Júlia Maria por toda ajuda, amizade e paciência no meu desespero.

Às meninas da UNIFESP, Jéssica pela ajuda em todas as FIVs juntos e por todas aquelas que fez sozinha durante meu experimento, quando ficava até tarde no laboratório e tinha de ir aos sábados inseminar as gotas... Obrigado pelo companheirismo e amizade desde a IC. À Thais pela amizade e parceria e por tudo que me ajudou no experimento, desde pesar sais, antibióticos, organizar material para levar para o experimento, lavar vidrarias, enfim tudo... e até ir a Pirassununga buscar os oócitos; À Debora que me ajudou quase igualmente a Thais, além de ficar uma semana comigo preparando e literalmente lavando o laboratório para os experimentos com FIV. A Dani que apesar de nova no laboratório, esta sempre disposta a dar uma mão.

Aos meus amigos de Botucatu, Satrapa, Bruno, Mariana, Paty, Rafa, Anthony, Isa, Carla, Lucacin, Diego, Ronaldo, Barbara, Maurício que me acolheram durante todas minhas idas para aulas e eventos, aos professores Ciro, Buratini e Di Stasi pela ajuda e dicas em relação ao projeto e principalmente ao Kaká (Antônio), ao Eduardo, e a Janahi que além de me acolherem em Botucatu, se deslocaram até Pirassununga para me ajudar no experimento, sem vocês três (principalmente a Jana) teria ficado mais louco do que já fiquei.

À Mariana Gurgel que “comprou” a idéia desde o momento que liguei perguntando se poderia me ajudar no experimento em Pirassununga. Obrigado por deixar sua casa e seus compromissos para me ajudar.

Ao Márcio que assim como a Mariana “comprou” a idéia e permitiu que o projeto acontecesse. Obrigado por ter cancelado compromissos e se deslocado até Pirassununga 2 vezes por semana para aspirar as vacas do experimento.

Ao professor Rennó por ter ajudado na inspeção da obra, na compra e disponibilidade das Holandesas e pedido na prefeitura as Nelores, na ajuda no experimento como todo, desde o pedido de concentrado e volumoso até com coisas mais burocráticas em relação ao **campus**.

Aos professores Mario e Rubens por terem me ajudado em tudo que precisei em Pirassununga.

Aos funcionários Zé Maria e Marcio por todo o suporte ao experimento, na rotina e com os animais, e por todas conversas e risadas.

A todos que me ajudaram durante o experimento, Juan, Fernando, Macu, Gisele, Saara, Kleber, Henrique, Moana, Milena, Tiago, Emiliana e principalmente ao Roney, Guilherme e Evérton que me ajudavam sempre que podiam, além das risadas, conversas e churrascos.

Ao seu João pelo material do abatedouro.

Aos meus amigos (ou poderia já considerá-los irmãos) Artusi, Marcelo, Danilo, Flávio, Rafaela, Gabriela e Christianne que estiveram comigo durante todos os momentos fora do experimento.

Agradeço a todos, inclusive àqueles que esqueci de nomear aqui... aos meus amigos que me ajudaram nos momentos que precisei e vivenciaram minha experiência no mestrado.

Todos são de extrema importância para mim já que não conseguiria fazer tudo sozinho.

EPÍGRAFE

Tocando em Frente Almir Sater

Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei

Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs

É preciso amor
Pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente

Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias
Pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou

Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs

É preciso amor
Pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir

Todo mundo ama um dia,
Todo mundo chora
Um dia a gente chega

E no outro vai embora

Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs

É preciso amor
Pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir

Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

RESUMO

Risolia, P.H.B. **O efeito do fator de crescimento semelhante à insulina-I em oócitos coletados de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* expostas ao estresse térmico *in vivo*.** The role of insulin-like growth factor-I on *Bos indicus* and *Bos taurus* oocytes exposed to heat stress. 2013. 131 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

As alterações no microambiente do trato reprodutivo comprometem a competência oocitária e o desenvolvimento embrionário pré-implantacional em bovinos. Vacas *Bos indicus* apresentam adaptações fenotípicas e genotípicas conferindo maior resistência e tolerância à temperatura elevada quando comparadas as vacas *Bos taurus*, que sofrem redução nos índices de prenhez durante os meses quentes do ano. Esta infertilidade causada pelo estresse térmico é um problema de ordem multifatorial, entretanto já foi demonstrado que o oócito e embrião são extremamente susceptíveis aos efeitos deletérios da temperatura elevada. Os danos celulares desencadeados pela temperatura elevada podem ser manipulados pelo fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), que além de minimizar a morte celular espontânea, resgata células que já iniciaram apoptose induzida por diferentes agentes ou estresses. A primeira etapa deste projeto visou avaliar o efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação *in vitro* (MIV) em meio quimicamente não definido (pré-experimento 1: meio MIV - 10% de soro fetal bovino) e semidefinido (pré-experimento 2: meio MIV - 6 mg/mL de albumina sérica bovina) na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos. Para tanto, complexos cumulus-oócito (CCOs) de vacas (mestiças *Bos indicus*) oriundas de abatedouro foram maturados *in vitro* em meio MIV não definido ou semidefinido suplementado com 0 (controle veículo), 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ou 200 ng/mL de IGF-I por 22-24 h. Em seguida os oócitos foram fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV). A adição de 25 ng/mL de IGF-I no meio MIV semidefinido ou não definido aumentou a porcentagem de oócitos clivados no dia 3 e a taxa de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Dessa forma, a dose de 25 ng/mL de IGF-I foi utilizada na segunda etapa deste projeto, cujo objetivo foi avaliar o papel do IGF-I na competência de desenvolvimento de oócitos coletados de vacas *Bos indicus* – Nelores (NEL; n= 6) e *Bos taurus* i Holandesas (HPB; n= 6) expostas ao estresse térmico *in vivo*. Para tanto, as vacas previamente adaptadas e sincronizadas (Fase I: Dia -90 a 0) foram expostas aos tratamentos Termoneutralidade (TN: Dia 0 a 28: normotermia) e Estresse Térmico [ET: Dia 0 à

14: 37° C - 70% de umidade relativa (UR) durante o dia e 30° C - 90% UR durante a noite; Dia 14 à 28: 38° C - 75% UR durante o dia e 30° C - 90% UR durante a noite) em câmara climática. Durante este período os animais tiveram os parâmetros fisiológicos (frequências respiratória e cardíaca, temperatura retal e cutânea) aferidos e foram submetidos à sessões de aspiração folicular (OPU) a cada 3-4 dias. Os CCOs aspirados foram previamente classificados quanto ao grau, e maturados *in vitro* em meio semidefinido contendo 0 ou 25 ng/mL de IGF-I. Em seguida os CCOs foram fecundados e cultivados *in vitro*. As taxas de clivagem e blastocisto foram determinadas nos dias 3 e 7-9 após a fecundação, respectivamente. Os parâmetros fisiológicos foram diferentemente afetados pelas variáveis raça, temperatura e interação raça x temperatura caracterizando, de acordo com a raça, a condição de hipertermia induzida pelo tratamento ET. O número total de CCOs aspirados por vacas NEL foi reduzido ($p < 0,05$) no tratamento ET em relação ao TN, e houve tendência no número total de CCOs entre os tratamentos HPB ET e TN. O ET reduziu ($p < 0,05$) a porcentagem de CCOs grau I independente de raça. No entanto, a exposição de vacas HPB ao ET reduziu ($p < 0,05$) a porcentagem de CCOS grau II em relação as NEL ET. Houve uma tendência ($p = 0,07$) da taxa de CCOs Grau II ser reduzida no grupo HPB ET em relação ao HPB TN. O ET reduziu ($p < 0,05$) a taxa de clivagem independente de raça. O ET e o IGF-I não afetaram a competência de desenvolvimento de oócitos NEL. No entanto, a resposta do oócito HPB ao aumento de temperatura foi modulada pelo IGF-I (interação tratamento x IGF, $p = 0,07$). A adição de 25 ng/mL de IGF-I durante a MIV não afetou o desenvolvimento a blastocisto dos oócitos do grupo TN, porém aumentou ($p < 0,05$) a porcentagem de oócitos do grupo ET que se desenvolveu ao estágio de blastocisto no dia 9 após a fecundação.

Palavras-chaves: Estresse térmico. IGF-I. ***Bos taurus***. ***Bos indicus***. Oócito.

ABSTRACT

Risolia, P.H.B. **The role of insulin-like growth factor-I on *Bos indicus* and *Bos taurus* oocytes exposed to heat stress.** O efeito do fator de crescimento semelhante à insulina-I em oócitos coletados de vacas ***Bos indicus*** e ***Bos taurus*** expostas ao estresse térmico ***in vivo***. 2013. 131 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

Microenvironmental alterations on reproductive tract compromise oocyte competence and pre-implantational embryo development in bovine. This fact is well characterized in animals exposed to heat stress. ***Bos indicus*** have phenotypic and genotypic adaptations which confers a higher tolerance to high temperatures compared with ***Bos taurus***, suffering a reduction in the pregnancy rates during the hot months. This infertility caused by heat stress is a multifactorial problem, however it has been shown that oocyte and embryo are very susceptible to deleterious effects of high temperature. The cellular damage induced by high temperature could be manipulated by insulin-like growth factor I (IGF-I), which besides minimizing the spontaneous cell death, IGF-I rescue cells which have already initiated the apoptosis induced by different agents or stresses. The first step of this project aimed to evaluate dose-response effect of IGF-I during the maturation ***in vitro*** (MIV) in a non-defined medium (pre-experiment 1: MIV - 10% of bovine fetal serum) and semi-defined (pre-experiment 2: MIV - 6 mg/mL of bovine albumin serum) in competence of bovine oocytes. Therefore, cumulus-oocyte complexes (CCOs) obtained of cows (***Bos indicus*** crossbreed) from a slaughterhouse were matured ***in vitro*** in non-defined and semi-defined MIV medium supplemented with 0 (vehicle control), 6,25; 12,5; 25; 50; 100 or 200 ng/mL of IGF-I for 22-24 h. After, oocytes were fertilized (FIV) and cultured ***in vitro*** (CIV). The addition of 25 ng/ml of IGF-I on non-defined and semi-defined MIV medium increased percentage of cleavage on day 3 and blastocysts rate in day 8 after fertilization. In this way, 25 ng/ml IGF-I was used on second step of this experiment, which objective was to evaluate the role of IGF-I on oocyte competence of oocytes collected from ***Bos indicus*** – Nelore (NEL; n= 6) and ***Bos taurus*** – Holstein (HPB; n= 6) exposed to heat stress. Therefore, cows adapted and synchronized (Step I: Day -90 to 0) were exposed to treatments Termoneutrality (TN: Day 0 a 28: normotermly) and Heat Stress [ET: Day 0 to 14: 37 °C - 70% relative humidity (UR) during day and 30 °C - 90% UR overnight; Day 14 to 28: 38 °C - 75% UR during day and 30 °C - 90% UR overnight) in environmental chamber. During this

period, animals had their physiological parameters (heart and respiratory frequencies, rectal and cutaneous temperature) measured and submitted to ovum pick up sections (OPU) every 3-4 days. The CCOs collected were classified according to grade, and matured *in vitro* in semi-defined medium containing 0 or 25 ng/mL IGF-I. Next, the CCOs were fertilized and cultured *in vitro*. Cleavage and blastocyst rate were determined on days 3 and 7-9 after fertilization, respectively. The physiological parameters were affected differentially by breed, temperature and interaction between breed x temperature, characterizing, according to the breed, hyperthermia condition induced by ET. The total CCOs collected from each NEL was reduced ($p < 0,05$) in ET treatment in relation to TN, while there's tendency to total CCOs between the treatments HPB ET and TN. The ET reduced ($p < 0,05$) percentage of CCOs grade I independent from breed. However, the exposition of HPB cows to ET reduced ($p < 0,05$) the percentage of CCOS grade II in relation to NEL ET. There was a tendency ($p = 0,07$) of grade II CCOs reduction rate in HPB ET group in relation to HPB TN. The ET decreased ($p < 0.05$) cleavage rate regardless of race. The ET and IGF-I did not affect the developmental competence of NEL oocytes. However, HPB oocyte response to temperature increase was modulated by IGF-I (IGF x treatment interaction, $p = 0.07$). Addition of 25 ng/ml IGF-I during MIV did not affect the development of oocytes to blastocysts in TN group, but increased ($p < 0.05$) percentage of oocytes ET group that developed in blastocyst stage on day 9 after fertilization.

Keywords: Heat stress. IGF-I. *Bos taurus*. *Bos indicus*. Oocyte.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Zona de conforto e temperaturas críticas entre as sub-espécies <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i>	24
Figura 2: Delineamento esquemático do pré-experimento 1.	50
Figura 3: Delineamento experimental esquemático do pré-experimento 2.	51
Figura 4: Efeito dose resposta do IGF-I durante maturação <i>in vitro</i> em meio não definido na porcentagem de oócitos clivados no dia 3 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	52
Figura 5: Efeito dose resposta do IGF-I durante maturação <i>in vitro</i> em meio não definido na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto no dia 7 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	53
Figura 6: Efeito dose resposta do IGF-I durante maturação <i>in vitro</i> em meio não definido na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	53
Figura 7: Efeito dose resposta do IGF-I durante maturação <i>in vitro</i> em meio não definido na porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto no dia 7 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	54
Figura 8: Efeito dose resposta do IGF-I durante maturação <i>in vitro</i> em meio não definido na porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	54
Figura 9: Efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação <i>in vitro</i> em meio MIV quimicamente semidefinido na porcentagem de oócitos clivados no dia 3 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	55
Figura 10: Efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação <i>in vitro</i> em meio MIV quimicamente semidefinido na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto no dia 7 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	56
Figura 11: Efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação <i>in vitro</i> em meio MIV quimicamente semidefinido na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	56
Figura 12: Efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação <i>in vitro</i> em meio MIV quimicamente semidefinido na porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto no dia 7 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	57
Figura 13: Efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação <i>in vitro</i> em meio MIV quimicamente semidefinido na porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	57
Figura 14: Diagrama esquemático das sessões de aspiração folicular nas fases I e II do experimento. .	66
Figura 15: Figura esquemática dos diferentes grupos experimentais durante a MIV.	73
Figura 16: Demperatura do bulbo seco das condições ambientais de termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	76
Figura 17: Umidade relativa do ar das condições ambientais de termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	77
Figura 18: Índice de tempertatura e umidade das condições ambientais de termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	77

Figura 19: Temperatura retal em vacas Holandesas e Nelores expostas a condição ambiental de termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	78
Figura 20: Temperatura retal em vacas Holandesas e Nelores expostas a condição ambiental de termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	78
Figura 21: Temperatura cutânea em vacas Holandesas e Nelores expostas a condição ambiental de termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	79
Figura 22: Temperatura cutânea em vacas Holandesas e Nelores expostas a condição ambiental de termoneutralidade nos períodos da manhã e da tarde na fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	79
Figura 23: Temperatura do bulbo seco das condições ambientais de Termoneutralidade e de Estresse Térmico no decorrer dos dias da fase II. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	81
Figura 24: Umidade relativa das condições ambientais de termoneutralidade e de estresse térmico no decorrer dos dias da fase II. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	81
Figura 25: Índice de temperatura e umidade das condições ambientais de termoneutralidade e de estresse térmico no decorrer dos dias da fase II. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	82
Figura 26: Temperatura retal em vacas Holandesas expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	83
Figura 27: Temperatura retal em vacas Nelores expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos.....	84
Figura 28: Temperatura retal em vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	84
Figura 29: Frequência respiratória mensurada no período da manhã em vacas Holandesas expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	85
Figura 30: Frequência respiratória mensurada no período da manhã em vacas Nelore expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	86
Figura 31: Frequência respiratória mensurada no período da manhã em vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	86
Figura 32: Temperatura cutânea mensurada no período da manhã em vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	87
Figura 33: Frequência cardíaca em vacas Holandesas expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	88
Figura 34: Frequência cardíaca em vacas Nelores expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	88
Figura 35: Peso das vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.....	89

Figura 36: Número total de CCOs aspirados de vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	90
Figura 37: Porcentagem de CCOs grau I aspirados de vacas (Holandesas + Nelores) expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	90
Figura 38: Porcentagem de CCOs grau II aspirados de vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	91
Figura 39: Porcentagem de CCOs grau III aspirados de vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	91
Figura 40: Porcentagem de CCOs grau IV aspirados de vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	92
Figura 41: Porcentagem de clivagem de oócitos aspirados de vacas das raças Holandesa e Nelore. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	94
Figura 42: Porcentagem de clivagem de oócitos aspirados de vacas expostas as condições ambientais de termoneutralidade e estresse térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	94
Figura 43: Porcentagem de oócitos aspirados de vacas das raças Holandesa e Nelore que atingiu o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	95
Figura 44: Efeito do estresse térmico e do IGF-I na porcentagem de oócitos aspirados de vacas Nelores e Holandesas que atingiu o estágio de blastocisto no dia 9 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	95
Figura 45: Efeito do estresse térmico e do IGF-I na porcentagem de embriões Nelore e Holandês que atingiu o estágio de blastocisto no dia 9 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	96
Figura 46: Categorias de itu. Figura baseada na classificação de Armstrong, 1994	126
Figura 47: Índice de temperatura e umidade (itu) calculado com base nos dados da estação meteorológica do campus da usp em Pirassununga (jan-08 até dez-11).	127
Figura 48: Umidade relativa do ar coletada da estação meteorológica do campus da usp em Pirassununga (jan-08 até dez-11).	128
Figura 49: Temperatura do bulbo seco (tbs) coletada da estação meteorológica do campus da usp em Pirassununga (jan-08 até dez-11).	129
Figura 50: Temperatura do bulbo seco máxima e mínima mensal em Pirassununga (2008 a 2011).	129
Figura 51 : temperatura do bulbo seco diária durante o período experimental em Pirassununga nas condições ambientais de termoneutralidade. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	130
Figura 52: Umidade relativa do ar diária durante o período experimental em Pirassununga nas condições ambientais de termoneutralidade. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	130
Figura 53: Temperatura do bulbo seco por hora durante o período experimental em Pirassununga nas condições ambientais de termoneutralidade. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	131
Figura 54: Umidade relativa do ar por hora durante o período experimental em Pirassununga nas condições ambientais de termoneutralidade. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de seleção das vacas Holandesas e Nelore.....	64
Tabela 2 - Alimentação balanceada de acordo com NRC apresentada em % total na matéria seca.....	65
Tabela 3 - Formulação do concentrado com porcentagens em relação a dieta total e ao concentrado.....	65
Tabela 4 - Nível de significância para os parâmetros fisiológicos (valores de p).....	82
Tabela 5 - Nível de significância referente ao número total de CCOs aspirados e a porcentagem de CCOs grau I a IV (valores de p)	90
Tabela 6 - Nível de significância referente a porcentagem de oócitos clivados e a porcentagem de blastocisto calculada a partir do número total de oócitos no dia 8 após a fecundação.	93
Tabela 7 - Nível de significância referente a porcentagem de blastocisto Nelore calculada a partir do número total de oócitos (Pb8 e Pb9) e a partir do número de embriões clivados (PbCliv 8 e 9) nos dias 8 e 9 após a fecundação. (valores de p).....	93
Tabela 8 - Nível de significância referente a porcentagem blastocisto Holandes calculada a partir do número total de oócitos (Pb8 e Pb9) e a partir do número de embriões clivados (Pbcliv 8 e 9) nos dias 8 e 9 após a fecundação. (valores de p).....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
BSA	Albumina sérica Bovina
PVA	Álcool polivinílico
OPU	Aspiração folicular via transvaginal
BPM	Batimentos por minutos
cm	Centímetro
CCOs	Complexo cumulus-oócitos
CL	Corpo lúteo
CIV	Cultivo in vitro
CO₂	Dióxido de carbono
ET	Estresse térmico
FC	Frequência respiratória
FR	Frequência cardíaca
IGF-I	Fator de crescimento semelhante a insulina-I
IGF-II	Fator de crescimento semelhante a insulina-II
TNF	Fator de necrose tumoral
FIV	Fecundação in vitro
FL	Folículo
GSH	Glutationa
g	Grama
HSP	Heat stress protein
h	Hora
GH	Hormônio de crescimento
FSH	Hormônio folículo estimulante
GHRH	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
HPB	Holandesa preta e branca
LH	Hormônio luteinizante
ECC	Índice de escore corporal
ITU	Índice de temperatura e umidade
IA	Inseminação artificial

IFN-T	Interferon tau
M	Manhã
MS	Matéria seca
MIV	Maduração <i>in vitro</i>
MCO	Meio de coleta de oócitos
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPM	Movimentos por minuto
ng	Nanograma
NEL	Nelore
NRC	"Nutrient Requirements of Cattle"
OD	Ovário direito
OE	Ovário esquerdo
KSOM	Potassium simplex optimized médium
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIV	Produção <i>in vitro</i>
IGFBP	Proteína ligadora de fator de crescimento semelhante a insulina
PAPP-A	Proteína plasmática associada à gestação – A
PKA	Proteína quinase A
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitose
CDK	Proteína quinase dependente de ciclina
AKT	Proteína quinase serina/treonina
PO	Puro de origem
Kg	Quilograma
IGF-IR	Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina-I
IGF-IIR	Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina-II
ROI	“Região in interesse”
S6K	S6 quinase
SFB	Soro fetal bovino

IRS	Substrato do receptor de insulina
PBS	Tampão fosfato-salino
T	Tarde
TC	Temperatura cutânea
TR	Temperatura retal
TOR	Target of rapamicina
TBS	Temperatura de bulbo seco
TBU	Temperatura de bulbo úmido
TN	Termoneutralidade
TCM-199	Tissue Culture Medium- 199
TALP	Tyrode's albumin-lactate-pyruvate
UR	Umidade relativa
VG	Vesícula germinativa

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$>$	Maior que
$<$	Menor que
$\pm$	Mais ou menos
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada
U	Unidades
μ	Micro
%	Porcentagem
M	Molar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1 GAMETOGENESE FEMININA.....	28
2.2 FATORES CLIMÁTICOS.....	29
2.3 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO EM BOVINOS	30
2.3.1 EFEITOS FISIOLÓGICOS E NA PRODUÇÃO DE LEITE.....	30
2.3.2 EFEITOS NA REPRODUÇÃO – FERTILIDADE	32
2.4 TERMOREGULAÇÃO ENTRE BOS INDICUS E BOS TAURUS	34
2.4.1 DIFERENÇAS CELULARES DE TOLERÂNCIA TÉRMICA ENTRE BOS INDICUS E BOS TAURUS.....	35
2.5 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO EM OÓCITOS BOVINOS	36
2.5.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO EM OÓCITOS BOVINOS	38
2.6 FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA TIPO I.....	39
2.6.1 O PAPEL DO IGF-I EM OÓCITOS BOVINOS.....	40
3 PRÉ-EXPERIMENTO.....	45
3.1 JUSTIFICATIVA	45
3.2 HIPÓTESES	46
3.3 OBJETIVOS.....	46
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.4.1 COLETA DE OVÁRIOS E COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS (CCOS).....	47
3.4.2 DILUIÇÃO DO IGF-I.....	48
3.4.3 MATURAÇÃO IN VITRO	48
3.4.4 FECUNDAÇÃO IN VITRO.....	48
3.4.5 CULTIVO IN VITRO	49
3.4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
3.4.6.1 PRÉ-EXPERIMENTO 1: EFEITO DOSE RESPOSTA DO IGF-I DURANTE A MATURAÇÃO IN VITRO EM MEIO NÃO DEFINIDO NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS.....	49
3.4.6.2 PRÉ-EXPERIMENTO 2: EFEITO DOSE RESPOSTA DO IGF-I DURANTE A MATURAÇÃO IN VITRO EM MEIO MIV QUIMICAMENTE SEMIDEFINIDO NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS.....	50
3.4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
3.5 RESULTADOS	52
3.5.1 PRÉ-EXPERIMENTO 1: EFEITO DOSE RESPOSTA DO IGF-I DURANTE A MATURAÇÃO IN VITRO EM MEIO NÃO DEFINIDO NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS.....	52
3.5.2 PRÉ-EXPERIMENTO 2: EFEITO DOSE RESPOSTA DO IGF-I DURANTE A MATURAÇÃO IN VITRO EM MEIO MIV QUIMICAMENTE SEMIDEFINIDO NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS.....	55
3.6 DISCUSSÃO	58
3.7 CONCLUSÃO	61
4 EXPERIMENTO	63
4.1 HIPÓTESES	63
4.2 OBJETIVOS.....	63
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
4.3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	64
4.3.2 ANIMAIS – DOADORAS DE OÓCITOS	64
4.3.3 ALIMENTAÇÃO	65
4.3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	65
4.3.5 TRATAMENTOS DA FASE II.....	66
4.3.6 CONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS.....	67

4.3.7 SINCRONIZAÇÃO DAS ONDAS FOLICULARES.....	67
4.3.8 PARÂMETROS CLIMÁTICOS	68
4.3.9 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	68
4.3.10 COLETA DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRASSOM	69
4.3.10.1 MONTAGEM DOS EQUIPAMENTOS E PREPARO DOS MEIOS DE ASPIRAÇÃO	69
4.3.11 PREPARO DOS ANIMAIS	70
4.3.11.1 CONTENÇÃO FÍSICA	70
4.3.11.2 ANESTESIA.....	70
4.3.11.3 HIGIENIZAÇÃO DA DOADORA	70
4.3.11.4 ASPIRAÇÃO FOLICULAR.....	71
4.3.12 MANIPULAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS OÓCITOS ASPIRADOS.....	71
4.3.12.1 AVALIAÇÃO DOS CCOS	72
4.3.12.2 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES.....	72
4.3.12.3 MATURAÇÃO IN VITRO	73
4.3.12.4 FECUNDAÇÃO IN VITRO	73
4.3.2.5 CULTIVO IN VITRO	74
4.3.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
4.4 RESULTADOS	76
4.4.1 FASE I.....	76
4.4.1.1 PARÂMETROS CLIMÁTICOS – FASE I	76
4.4.1.2 TEMPERATURA RETAL – FASE I.....	77
4.4.1.3 TEMPERATURA CUTÂNEA – FASE I.....	78
4.4.2 FASE II.....	80
4.4.2.1 PARÂMETROS CLIMÁTICOS.....	80
4.4.2.2 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	82
4.4.2.2.1 TEMPERATURA RETAL	82
4.4.2.2.2 FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA	84
4.4.2.2.3 TEMPERATURA CUTÂNEA	86
4.4.2.2.4 FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	87
4.4.2.2.5 PESO	88
4.4.2.2.6 COMPLEXOS CUMULUS OÓCITOS	89
4.4.2.2.7 BLASTOCISTOS.....	92
4.3 DISCUSSÃO.....	97
4.4 CONCLUSÃO.....	105
5 BIBLIOGRAFIA	107
ANEXOS	126

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial nos últimos anos promoveu um incremento da demanda por alimentos. Uma das principais fontes de proteína de origem animal na alimentação humana é o leite e seus derivados. A produção de leite bovina do Brasil representa cerca de 5% da produção mundial (CEPEA 2010), sendo o Brasil o sexto maior produtor de leite (ANUALPEC 2007; CEPEA 2010; FAS/USDA 2012). No entanto, o Brasil ocupa a 12^a colocação quando analisada a produtividade do rebanho leiteiro (FAS/USDA 2012). Esta baixa produtividade está intimamente ligada às condições ambientais adversas. O Brasil possui clima tipicamente tropical e subtropical (IBGE, 2010), estando sujeito à interferência da sazonalidade sobre a produtividade e fertilidade das vacas leiteiras (WILTBANK et al., 2006). Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Brasil importou aproximadamente 180.000 ton de lácteos em 2012, 8% a mais do que 2011, tendo um custo de US\$ 638 milhões (MAPA, 2012)

O estresse térmico em vacas lactantes é um fator de grande impacto econômico na indústria de leite em regiões de clima quente do Brasil e do mundo, especialmente em vacas de alta produção leiteira de origem européia (***Bos taurus***). Em contraste, animais de origem zebuína (***Bos indicus***) são mais adaptados e resistentes às condições adversas de temperatura. Nestas condições ambientais características de climas tropicais, os animais não apresentam amplitude ideal da zona de conforto térmico comprometendo a eficiência ótima de desempenho produtivo. O intervalo de temperatura da zona conforto térmico (Figura 1) corresponde aos limites de temperatura em que o animal apresenta seu pico de produção sem fazer uso de dispositivos termorreguladores para se ajustar às condições ambientais (PEREIRA, 2005).

Figura 1 - Zona de conforto e temperaturas críticas entre as sub-espécies *Bos taurus* e *Bos indicus*. Figura adaptada de Curtis, 1981.

Animal	Estresse pelo frio	Conforto térmico	Estresse pelo calor
<i>Bos taurus</i>	até -10 °C	0 a 16 °C	acima de 27 °C
<i>Bos indicus</i>	até 0 °C	10 a 27 °C	acima de 35 °C

T °C T °C

Crítica Inferior Crítica Superior

Já foi demonstrado que animais ***Bos indicus*** contam com adaptações fenotípicas e genotípicas que conferem maior resistência e tolerância às condições ambientais adversas tais como temperatura e umidade elevada. A termoregulação mais eficiente dos ***Bos indicus*** deve-se à menor produção de calor interna associada a maior dissipação de calor para o ambiente, uma vez que estas raças apresentam grande superfície corporal. Além da eficiência termoregulatória, já foi observado maior resistência das células e dos embriões ***Bos indicus*** à temperatura elevada quando comparados aos ***Bos taurus*** (PAULA-LOPES et al., 2003; HANSEN, 2004). Sugere-se, a partir das diferenças celulares de tolerância térmica entre ***Bos indicus*** e ***Bos taurus***, um padrão diferenciado na expressão de genes associados à termoproteção.

A exposição de vacas lactantes à temperatura e umidade elevadas causa aumento da temperatura corporal interna (hipertermia), resultando em estresse térmico e diminuição dos índices de gestação (AL-KATANANI et al., 1999). Nestas condições de hipertermia os animais podem atingir e até ultrapassar temperaturas retais de 41 °C (GAALAAS, 1945; TURNER 1982; ELVINGER et al., 1992; EALY et al., 1993; WOLFENSON et al., 1993), assim como temperaturas uterinas e vaginais (Gwazdauskas et al., 1973). Este aumento da temperatura retal está associado a baixa taxa de prenhez (ULBERG e BURFENING, 1967).

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, o estresse térmico compromete o crescimento folicular (BADINGA et al., 1993; WOLFENSON et al., 1995), a secreção hormonal (WOLFENSON et al., 1995; ROTH et al., 2000), a função do endométrio

(MALAYER et al., 1988), o fluxo sanguíneo para o útero (ROMAN-PONCE et al., 1978) e a capacidade de desenvolvimento do oócito (ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI et al., 2002) e do embrião (PUTNEY et al., 1988; EALY et al., 1993). No entanto, sabe-se hoje que o oócito e o embrião são os alvos principais dos efeitos deletérios induzidos pelo estresse térmico.

Uma das consequências do estresse térmico materno é a redução na competência oocitária, a qual só é recuperada 2 a 3 ciclos estrais após o final do verão (ROTH et al., 2001), indicando que o estresse térmico pode danificar o estoque de folículos e oócitos que iniciaram seu crescimento ainda no período quente. A susceptibilidade de oócitos bovinos à temperatura elevada pode ser constatada tanto durante a fase de vesícula germinativa (VG) como durante o período de maturação oocitária. Quando oócitos na fase de VG foram colhidos de vacas Holandesas expostas ao estresse térmico **in vivo** e submetidos à fecundação **in vitro** (FIV), houve redução no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI et al., 2002). O oócito bovino no estágio de VG permanece no folículo antral por 42 dias (LUSSIER et al., 1974) e durante este longo período de tempo o animal exposto ao estresse térmico pode sofrer oscilações de temperatura corporal acima de 40 – 41 °C (PUTNEY et al., 1989; EALY et al., 1993; WOLFENSON et al., 1993; RIVERA e HANSEN, 2001), comprometendo a função oocitária antes da maturação.

O uso de modificações de manejo ambiental, tais como ventiladores e aspersores de água visando contornar os problemas associados ao estresse térmico, permitem apenas uma melhora parcial na eficiência reprodutiva do rebanho além de resultar em alto custo para propriedade (HANSEN et al., 1992). Dessa forma, o desenvolvimento de alternativas a fim prevenir os efeitos negativos da temperatura e umidade elevada na reprodução de gado de leite é de suma importância para o melhor aproveitamento da capacidade produtiva deste setor no país.

Uma alternativa a fim de reverter o efeito deletério do estresse térmico seria o uso de fatores de crescimento, como por exemplo, o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I). Estudos **in vitro** demonstraram o papel benéfico do IGF-I (SAKAGUCHI et al., 2002; KOLLE et al., 2003) durante a maturação oocitária em bovinos. Em particular, a adição do IGF-I durante a maturação **in vitro** (MIV) reduziu a apoptose oocitária induzida pelo estresse térmico **in vitro** (ISPADA et al. 2010). O IGF-I reverteu o efeito da choque térmico que prejudicou a organização dos

filamentos de actina (RODRIGUES et al., 2012). Dessa forma, este projeto visa avaliar o efeito dose resposta do IGF-I durante a MIV em meio quimicamente não definido (10% de soro fetal bovino) e em meio quimicamente semidefinido (6 mg/mL de albumina sérica bovina) na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos. Visa também avaliar as diferenças de termotolerância em oócitos ***Bos indicus*** e ***Bos taurus*** expostos ao estresse térmico ***in vivo*** e determinar o papel do IGF-I na competência de oócitos ***Bos indicus*** e ***Bos taurus*** expostos ao estresse térmico ***in vivo***.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GAMETOGENESE FEMININA

Oogênese é o processo que consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais dando origem as oogônias, oócitos primários e secundários, até a formação do oócito haplóide fecundado. Estes eventos tem início durante o período fetal e ocorrem ao longo da vida reprodutiva da fêmea (RÜSSE, 1983; GONSALVES et al., 2002; VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Durante o desenvolvimento fetal, as células germinativas primordiais, originários da camada mesodérmica extraembrionária (LAWSON e HAGE, 1994), migram para a gônada fetal. Estas células sofrem uma série de divisões mitóticas, colonizam ovário fetal e diferenciam-se em oogônias (MCLAREN, 2003). As oogônias apresentam citoplasma claro, devido a pouca quantidade de organelas e a alta frequência de divisões mitóticas, chegando a 2.700.000 oogônias no dia 110 de gestação (ERICKSON, 1966). Durante a fase fetal inicial, aproximadamente 60 dias pós-concepção em bovinos, tem início uma intensa atividade mitótica das oogônias (HIRSHFIELD, 1991). Neste período ocorre a replicação final do DNA para formar os oócitos primários (RAHMAN et al., 2008) que progredem até a primeira prófase meiótica entre 75 e 80 dias gestacionais (ERICKSON, 1966). Nos folículos primordiais (30 a 40 μ m), formados a partir de uma única camada de células escamosas da granulosa em torno dos oócitos primários individuais (25 a 30 μ m de diâmetro no bovino) (HYTTEL et al., 1997), formam-se então estoques finitos de oócitos, que permanecem quiescentes até que sejam estimulados a crescer (ERICKSON, 1966).

Os oócitos primários iniciam a primeira divisão meiótica, bloqueada na fase de diplóteno da prófase I caracterizando o estágio de vesícula germinativa (MOTLÍK et al., 1978). Estes então iniciam a formação de ligações íntimas com células da granulosa vizinhas, mediados por processos que se estendem no ooplasma e pelas junções comunicantes (SENBON et al., 2003) que permitem a troca bidirecional entre o oócito e as células da granulosa. Esta comunicação proporciona o desenvolvimento do futuro gameta. As junções serão necessárias para a aquisição da competência oocitária e manutenção do bloqueio meiótico (GERSHON et al., 2008; CANIPARI et al., 1984). Inicia-se também o desenvolvimento e deslocamento do

complexo de Golgi, do retículo endoplasmático liso, e das gotas lipídicas para a periferia do oócito, as formações dos grânulos corticais e da zona pelúcida, a diferenciação da mitocôndria, quebra dos centríolos, deposição ou síntese dos RNAm maternos (FAIR et al., 1996; HYTTEL et al., 1997).

As células foliculares produzem fatores que inibem a retomada da meiose. Em experimentos que utilizam a técnica de maturação *in vitro*, a retirada do oócito do seu ambiente folicular priva o mesmo de fatores inibidores fazendo com que retomem a meiose espontaneamente (PINCUS e ENZMANN, 1935). Entretanto, quando no animal, a maturação do primeiro oócito ocorre durante a maturidade sexual, antes da ovulação, no momento em que ocorre o pico de LH (HYTTEL et al., 1986), e repete-se a cada onda folicular, terminando com a ovulação a cada 21 dias em média. A maturação oocitária é a progressão do ciclo celular do oócito de prófase I até metáfase II e é caracterizada por transformações bioquímicas e estruturais no núcleo e no citoplasma do oócito (HYTTEL et al., 1986; DE SOUSA et al., 2004). Ao final da maturação nuclear o oócito permanecerá no estágio de metáfase II até a fecundação (MAYES E SIRARD, 2001).

2.2 FATORES CLIMÁTICOS

O conjunto de fatores climáticos tais como latitude, altitude, massas de ar, continentalidade, maritimidade e correntes marítimas define o tipo de clima de determinada região. A latitude determina a proporção de incidência de raios solares em determinada região, de maneira que quanto mais próximo ao equador, maior a incidência. A altitude indica a densidade do ar, sendo assim, o ar rarefeito não consegue reter calor e umidade. As massas de ar são porções de ar atmosférico que se deslocam, carreando as condições ambientais de sua origem. A continentalidade e a maritimidade correspondem à maior ou menor proximidade de uma determinada região a grandes massas de água, interferindo na umidade e na temperatura da região, pois a água tem capacidade de manter a temperatura do ar constante. Correntes marítimas são porções de águas extensas que fazem um movimento de descolamento nos oceanos, assim como as massas de ar, carregam as condições de temperatura de sua origem (MENDONÇA e DANNI-OLIVEIRA, 2007).

A temperatura do ar, radiação e umidade relativa são os parâmetros que podem interferir na produção animal (BACCARI JR., 2001; AGUIAR e BACCARI

JR, 2003). Desta maneira McDowell e colaboradores (1976) a partir da temperatura e UR propuseram o cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU) poderia ser usado utilizado como indicador das condições climáticas térmicas para vacas Holandesas produtoras de leite. O índice de temperatura e umidade (ITU) é calculado a partir das temperaturas de bulbo seco, segundo a fórmula citada por NRC,1971:

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

Legenda:

ITU = Índice de temperatura e umidade

TBS = Temperatura de bulbo seco

UR = Umidade relativa

A classificação do ITU foi dividida conforme as variações do estresse térmico (ARMSTRONG, 1994), sendo ausência de estresse térmico quando o resultado do cálculo for 72, estresse ameno ou brando quando o intervalo do resultado for de 72 a 78, moderado quando for 79 a 88 e severo quando for 89 a 98. Segundo Lemerle e Goddard (1986), embora a temperatura retal só aumente quando ITU for superior a 80, a frequência respiratória começa a aumentar com o ITU maior que 73 e, provavelmente, aumentar acentuadamente em valores de ITU 80. Este achado sugere que mecanismos de homeostase, incluindo aumento da frequência respiratória, pode evitar um aumento da temperatura retal até o ITU atingir o valor de 80, o que é próximo ao nível crítico de 78 do ITU citado por McDowell e colaboradores (1976).

2.3 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO EM BOVINOS

2.3.1 EFEITOS FISIOLÓGICOS E NA PRODUÇÃO DE LEITE

Estresse térmico é definido como a tensão exercida pelos fatores climáticos sobre um organismo, determinando uma reação fisiológica proporcional à intensidade de estímulo aplicado e à capacidade de compensação do organismo (YOUSEF, 1985; SILVA, 2000;). Nesta revisão de literatura, as terminologias estresse térmico e choque térmico serão utilizadas para descrever o aumento da temperatura *in vivo* e *in vitro*, respectivamente.

O estresse térmico provoca respostas de termoregulação em bovinos. O primeiro mecanismo de termorregulação é a vasodilatação, seguida de sudação e aumento da frequência respiratória (AL-KATANANI et al., 1999; BACCARI JR., 2001). Com a vasodilatação há aumento do fluxo sanguíneo para regiões periféricas na tentativa de reduzir a temperatura corporal, assim em vacas produtoras de leite, provoca a redução na absorção de nutrientes e na disponibilidade desses à glândula mamária (MCGUIRE et al., 1989). O aumento da frequência respiratória é a primeira alteração visível, e para perder calor por evaporação respiratória, vacas ***Bos taurus*** aumentam a frequência acima de 12 a 36 movimentos respiratórios por minuto (NÃÃS, 1989; SMITH, 1993). Ocorre também redução no consumo de alimentos, na tentativa de reduzir o metabolismo basal e manter a temperatura constante. A redução no consumo é diretamente proporcional ao estresse térmico sofrido, sendo atribuída à inibição do centro do apetite no hipotálamo (MARCHETO et al., 2002). Há aumento da ingestão de água para reposição das perdas sudativas e respiratórias, além de promover o resfriamento corporal, por meio do contato direto com as mucosas do trato digestivo (TITTO, 1998).

O estresse térmico em bovinos, pode promover alterações metabólicas, redução do consumo de matéria seca, aumento do consumo de água, alterações fisiológicas, redução na produção de leite e seus sólidos, aumento da sudorese, além de alterações reprodutivas (WEST, 2003; ROBINSON, 2004).

As alterações metabólicas causadas pelo estresse térmico ocorrem em resposta ao aumento da frequência respiratória e consequente aumento no volume de gás carbônico liberado através da expiração, redução na produção de ácido carbônico no sangue e elevação do pH do plasma desencadeando alcalose respiratória (BENJAMIN, 1981; WEST, 2003). Concomitantemente, devido a redução na ingestão de matéria seca, o animal terá menor motilidade gástrica, predileção por alimentos concentrados (menor fermentação no rúmen), redução do pH ruminal promovendo a maior produção de ácido lático, redução do pH sanguíneo e acidose metabólica (MACHADO, 1998).

O estresse térmico reduz a produção de leite de vacas em lactação. Pinarelli (2003) demonstrou um decréscimo de 17% na produção de leite de vacas de 15 kg de leite/dia e de 22% em vacas de 40 kg/dia. Segundo Ingraham e colaboradores (1979) a redução na produção de leite pela vaca termicamente estressada é de 320 g de leite para cada unidade aumentada no ITU. Ravagnolo e

Misztal, (2000) demonstraram um decréscimo de 200 g de leite para cada unidade do ITU acima de 72.

A redução na produção de leite pode ser associada, à redução no consumo de alimentos, provocada pela inibição do centro do apetite no hipotálamo (BACCARI JR., 2001), à hipofunção da tireoide e à energia utilizada para termorregulação. O decréscimo nos teores de gordura, proteína, cálcio (TITTO, 1998), lactose, ácido cítrico e potássio (HEAD, 1989) no leite pode também estar associada a redução na ingestão alimentar em vacas em estresse térmico. Em vacas mantidas em baixas temperaturas os teores de gordura, proteína e lactose foram de 3,47%, 3,07% e 5,08% respectivamente. No entanto, para vacas mantidas em altas temperaturas os teores de gordura, proteína e lactose foram reduzidos para 3,17%, 2,89% e 5,01% (PINARELLI, 2003). O estresse térmico também reduz a contagem de células somáticas no leite, pois número de leucócitos no sangue reduz em 16% em vacas estressadas (FUQUAY, 2011).

2.3.2 EFEITOS NA REPRODUÇÃO – FERTILIDADE

Segundo Lee e colaboradores (1974), em experimento com vacas Holandesas, afirmam que a temperatura ambiental é o fator com maior impacto sobre a reprodução. O aumento na temperatura ambiente durante os meses quentes do ano diminui a fertilidade do gado leiteiro (BADINGA et al., 1985; AL-KATANANI et al., 1999; PIRES et al., 2002). Bovinos em estresse térmico, tanto induzidos artificialmente quanto naturalmente pela estação, 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 (LUCY et al., 1992; BUTLER et al., 2003; DE RENSIS e SCARAMUZZI, 2003), acarretando em diversos problemas de ordem reprodutiva assim como redução na intensidade e duração do estro com consequentes falhas de detecção. Por exemplo, no estado da Flórida nos Estados Unidos, as falhas de detecção do estro durante o verão variam de 75 a 80% em relação ao inverno (NEBEL et al., 1997; HANSEN e ARÉCHIGA, 1999). Da mesma forma a taxa de ovulações silenciosas chega a 86% durante o verão versus 65% durante o inverno (THATCHER e COLLIER, 1986). O estresse térmico também aumenta a frequência de vacas **Bos**

taurus em anestro (GWAZDAUSKAS et al., 1981), e reduz o fluxo sanguíneo para o útero e aumenta temperatura uterina, assim como a temperatura retal, o que compromete o ambiente intrauterino, reduzindo a fertilidade (DE RENSIS e SCARAMUZZI, 2003) podendo interferir nas funções ovarianas e uterina (COLLIER et al., 1982; HANSEN e ARÉCHIGA, 1999). O aumento em 0,5 °C na temperatura uterina no dia posterior à inseminação provoca uma queda de 6,9% na taxa de concepção (THATCHER et al., 2010). Em vacas **Bos indicus** da raça Gir expostas ao estresse térmico em câmara climática foi observada redução na concentração de progesterona circulante, anestro prolongado e redução do ciclo estral mesmo após o período de exposição (TORRES-JÚNIOR et al., 2008).

Badinga e colaboradores (1985) demonstraram em estudo realizado no estado da Flórida nos Estados Unidos que as taxas de concepção de vacas Holandesas em lactação diminuíram de 52 para 32% quando a temperatura máxima do ar aumentou de 23,9 °C para 32,2 °C no verão. Em experimento no Brasil, Pires e colaboradores (2002) demonstraram queda na taxa de gestação de vacas Holandesas confinadas em **free stall** de 71,2% no inverno para 45,7% no verão, por um período de 3 anos de estudo, no qual a variação média da temperatura do ar foi de 19 °C até 25,6 °C. Um fator limitante para a manutenção da gestação é a deficiência na síntese da proteína interferon tau (IFN-T) pelo blastocisto quando em estresse térmico (PIRES et al., 1999; HICKMAN et al., 2013). A proteína IFN-T, é sintetizada pelo embrião e é responsável pela inibição dos fatores relacionados com a luteólise e pelo reconhecimento materno fetal da gestação. A falha ou atraso na sua síntese causa mortalidade embrionária (ARAÚJO et al., 2005). Um outro fator que pode interferir na concepção de vacas em estresse térmico é a secreção de prostaglandina no oviduto. Kobayashi e colaboradores (2013) relataram que cultura de células epiteliais do oviduto, quando incubadas a altas temperaturas (40,5 °C), aumentam a secreção de prostaglandinas e reduzem a motilidade da musculatura lisa do oviduto. Esta alteração pode levar à diminuição do transporte de gametas e embriões pelo oviduto, o que teria um impacto negativo nas taxas de concepção.

A maioria dos animais de produção já apresenta perda de performance reprodutiva com o aumento de 1 °C na temperatura retal (MCDOWELL et al., 1976). Este aumento quando nas primeiras 12 h após inseminação artificial diminui a fertilização em 16% e aumenta a taxa de mortalidade embrionária de 45 para 61% entre os dias 35 e 42 de gestação (ULBERG e BURFENING, 1967). O aumento de

0,5 °C intrauterino no dia da inseminação ou no dia após a inseminação resulta em queda na taxa de concepção de 13 para 7%.

2.4 TERMOREGULAÇÃO ENTRE *BOS INDICUS* E *BOS TAURUS*

Os bovinos são animais homeotérmicos que regulam a temperatura corporal interna pelo balanço entre a quantidade de calor metabólico e a dissipação de calor para o ambiente, a fim de manter a temperatura corporal constante (SWENSON e REECE, 1996; HANSEN, 2004; MARTELLO et al., 2006). Os animais *Bos indicus* (zebuíno) possuem maior capacidade de termoregulação do que os animais *Bos taurus*. Rebanhos que apresentam maior proporção genética de raças *Bos indicus*, sejam puros de origem (PO) ou a partir de cruzamentos, apresentam maior resistência às altas temperaturas (ADEYEMO et al., 1979; FRISCH e VERCOE, 1984).

A maior eficiência termoregulatória dos *Bos indicus* em comparação a *Bos taurus* já foi amplamente relatada. O gado zebuíno pode sobreviver em regiões de clima árido e seus representantes são conhecidos por sua adaptabilidade a altas temperaturas e condições climáticas adversas. A resposta diferencial de uma espécie ao estresse térmico (MARAIA e HAEEDB, 2010; PEGORER et al., 2007) tem sido documentada com base nas diferenças anatômicas e parâmetros fisiológicos (HANSEN, 2004). Diversos fatores promovem esta característica única, como a maior densidade e quantidade de glândulas sudoríparas e a habilidade maior para dissipação de calor para o ambiente (HANSEN, 2004; VEERASAMY et al., 2012). A presença de pêlo curto, grosso, denso e brilhante reflete maior quantidade de raios do sol, aumentando a condutividade e a convecção da perda de calor. Uma abundância de pele solta contribui para a habilidade de resistir a climas quentes, aumentando a superfície corporal para dissipar o calor. Todas essas características tornam o gado *Bos indicus* mais termotolerante quando comparado ao gado *Bos taurus* (CARTWRIGHT, 1955; ROCHA et al., 1998; HANSEN, 2004; PEGORER et al., 2006; VILELA, 2008)

A frequência respiratória é uma variável muito sensível ao aumento da carga térmica ambiental e ocorre logo após os mecanismos de vasodilatação e sudação (BACCARI JR., 2001). Em condições termoneutras, os bovinos apresentam de 12 a 36 movimentos respiratórios por minuto (SMITH, 1993). A adaptação das raças zebuínas aos trópicos favorece seus mecanismos termorregulatórios quando

comparados aos animais taurinos de clima temperado. Foi verificado que **Bos indicus** nascidos no Brasil apresentam média de 15 movimentos respiratórios por minuto enquanto **Bos taurus** também nascidos no Brasil apresentam frequência respiratória média de 35 movimentos por minuto (CARVALHO et al., 1995). Em um experimento que avaliou as respostas fisiológicas do estresse térmico em novilhas **Bos taurus** (cruzadas) e **Bos indicus** (Brahman) utilizando câmara climática com alta umidade (BEATTY et al., 2006), a média diária da FR foi superior para as duas raças em estresse térmico quando comparado ao grupo controle (ausência de estresse), acompanhando o aumento da temperatura corporal. Apesar de não encontrada diferença na FR final entre as duas raças (126 mpm), novilhas taurinas responderam ao estresse térmico a uma temperatura corporal inferior do observado pelas zebuínas. Esse mesmo experimento relatou também um aumento de FC no grupo das novilhas taurinas. Foi observado uma diminuição da FC do dia 7 ao dia 16 de exposição ao estresse térmico. Não foram observadas alterações de FC para as novilhas zebuínas.

2.4.1 DIFERENÇAS CELULARES DE TOLERÂNCIA TÉRMICA ENTRE **BOS INDICUS** E **BOS TAURUS**

As células de animais **Bos indicus** são mais resistentes ao choque térmico do que as células de **Bos taurus**. Este fenômeno já foi demonstrado em embriões (PAULA-LOPES e HANSEN, 2001; PAULA-LOPES et al., 2003; HERNÁNDEZ-CÉRON et al., 2004) células do endométrio (MALAYER e HANSEN, 1990) e linfócitos (KAMWANJA et al., 1994; PAULA-LOPES et al., 2003)

Paula-Lopes e colaboradores (2003) demonstraram que o efeito deletério do choque térmico sobre o desenvolvimento embrionário foi mais acentuado em embriões das raças Angus e Holandesa do que em embriões da raça Brahman. Neste estudo a exposição de embriões Angus, Holandês e Brahman no estágio de 8 células ao choque térmico de 41 °C por 6 horas reduziu o desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto no dia 8 de 51% no grupo 38,5 °C (controle) para 2,6% no grupo 41 °C para Angus; de 32% para próximo de 0% para Holandês e de 29% para 15,3% para Brahman, respectivamente. Da mesma forma, Sartorelli e colaboradores (2006) demonstraram que os embriões de animais da raça Nelore foram mais resistentes ao choque térmico do que embriões da raça Angus. Quando estes embriões foram transferidos para receptoras, os índices de prenhez foram de 29,41% e 28,95%,

respectivamente, para embriões Nelore dos grupos controle e estresse térmico e de 21,43% e 7,14%, respectivamente, para embriões Angus dos grupos controle e estresse térmico (SARTORELLI et al., 2006). Nesta mesma direção, Satrapa (2011) relatou que o choque térmico de 41 °C por 12 horas (h) em embriões da raça Holandesa com 16 ou mais células, reduziu a taxa de clivagem e de blastocistos quando comparado com oócitos de vacas Nelore.

Em estudo realizado com células do endométrio de vacas Brahman e Holandesas (MALAYER e HANSEN, 1990) submetidas ao choque térmico *in vitro* (43 °C), observou-se que nos tecidos submetidos ao estresse térmico, a secreção de proteínas foi reduzida em ambos os ovidutos de Brahman, porém, em Holandesas, apenas no oviduto ipsi-lateral da ovulação. Esses achados corroboram com outros autores que relataram maiores concentrações de proteínas presentes no lumen uterino de vacas estressadas pelo calor quando comparadas a vacas controle (GEISERT et al., 1988).

Pouco se sabe sobre as moléculas envolvidas na resistência celular à temperatura elevada nas raças ***Bos indicus***. Foi demonstrado que as concentrações intracelulares da HSP70 (proteína do estresse térmico 70) aumentaram em linfócitos (KAMWANJA et al., 1994) e em tecido endometrial (MALAYER e HANSEN, 1990) submetidos ao choque térmico. No entanto, esse aumento não diferiu entre ***Bos indicus*** e ***Bos taurus***. Da mesma forma, o estresse térmico reduziu a concentração intracelular do antioxidante glutathione (GSH) em linfócitos, independentemente da raça (PAULA-LOPES et al., 2003), sugerindo que a resistência térmica celular das raças ***Bos indicus*** deve-se a outras moléculas termoprotetoras ainda não identificadas.

Com os relatos citados, pode-se especular que existem variações na resposta celular dos órgãos reprodutivos entre ***Bos indicus*** e ***Bos taurus*** ao choque térmico *in vitro*. Além disso, uma variação racial foi notada no padrão qualitativo de proteínas secretadas pelo endométrio dos animais em estresse térmico. Porém, ainda não foi determinado se essas variações são suficientes para aumentar a resistência ao estresse térmico e exercer efeito na fertilidade destas fêmeas.

2.5 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO EM OÓCITOS BOVINOS

A exposição de vacas leiteiras ao estresse térmico durante o verão reduz os índices de concepção desde o verão até o início do outono (BADINGA et al.,

1985). Uma das consequências do estresse térmico sazonal é a redução na competência oocitária (TORRES-JÚNIOR et al., 2008; ROTH et al., 2001), a qual só é recuperada 2 a 3 ciclos estrais após o final do verão (ROTH et al., 2001), indicando que o estresse térmico pode danificar o estoque de folículos e oócitos que iniciaram seu crescimento ainda no período quente.

O estresse térmico pode afetar a competência de desenvolvimento de oócitos na fase de VG e durante a maturação oocitária. Os oócitos estão localizados em folículos que iniciam seu crescimento no ovário cerca de 90 à 110 dias antes da ovulação. O oócito bovino no estágio de VG permanece no folículo antral por 42 dias (LUSSIER et al., 1974) e durante este espaço de tempo o animal exposto ao estresse térmico pode sofrer oscilações de temperatura corporal acima de 40-41 °C (PUTNEY et al., 1989; EALY et al., 1993; WOLFENSON et al., 1993; RIVERA e HANSEN, 2001), comprometendo a função oocitária antes da maturação. Desta maneira, o estresse térmico nesta fase pode causar danos ao oócito, diminuindo sua viabilidade para fertilização. Essa perda de qualidade ocorrida no início do desenvolvimento do oócito pode causar problemas reprodutivos até mesmo depois de passado o período de calor (ROTH et al., 2001; FUQUAY et al., 2011).

Quando oócitos na fase de VG foram colhidos de vacas Holandesas expostas ao estresse térmico e submetidos à fecundação *in vitro* (FIV), houve redução no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, quando comparados a aqueles coletados durante o inverno (ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI et al., 2002). A exposição de vacas Holandesas ao estresse térmico sazonal reduziu a porcentagem de oócitos normais de 75,9% no inverno para 41% no verão e reduziu a porcentagem de embriões nos estágios de 2-células (82,4% no inverno para 45% no verão), 8-células (65,4% no inverno para 21,2% no verão) e mórula (46,6% no inverno para 6% no verão). No entanto, não foram observadas diferenças nestes parâmetros quando vacas Brahman foram expostas as mesmas condições no verão (ROCHA et al., 1998). Em estudo pioneiro Putney e colaboradores (1989) demonstraram que a exposição de novilhas Holandesas ao estresse térmico de 42 °C por 10 h durante o período de maturação oocitária (entre o estro e a inseminação artificial) diminuiu o número de embriões normais quando comparados ao grupo controle (24 °C).

Apesar da tolerância térmica constatada nas raças *Bos indicus*, existem evidências de que a temperatura elevada tem efeito deletério acumulativo sobre a

competência oocitária destes animais. Em estudo retrospectivo, utilizando 2.395 sessões de aspiração folicular (OPU) em vacas Nelore, foi demonstrado que o índice de produção embrionária **in vitro** foi reduzido após os meses quentes do ano (FERRAZ et al., 2005). Da mesma forma, quando vacas da raça Gir foram submetidas à temperatura e umidade elevada controladas em câmara climática por 28 dias houve diminuição na produção de blastocistos de 27,2% no grupo controle para 13,3% no grupo estresse térmico durante 119 dias pós-estresse (período compreendido do dia 28 ao dia 147; TORRES-JÚNIOR, 2006).

O estresse térmico sazonal também foi responsável por promover alterações nos componentes bioquímicos do complexo cumulus oócito (CCOs). Foi relatado que o perfil de ácidos graxos em oócitos bovinos coletados durante o verão apresentam um aumento de 2,2 vezes de ácidos graxos saturados na membrana celular, ocorrendo diminuição da porcentagem de ácidos poli-insaturados, como o ácido linoleico (ZERON et al., 2001). O ácido linoleico tem papel fundamental como fonte de energia para o organismo, atuando no crescimento e diferenciação do oócito em mamíferos (NISHIZUKA, 1988), estimula a atividade da adenilato ciclase (RACOWSKY, 1985) e da proteína quinase C (DELL e SEVERSON, 1989). Além dessas funções metabólicas, o ácido linoleico é precursor de leucotrienos e prostaglandinas, os quais atuam como hormônios autócrinos e parácrinos (SMITH, 1989).

2.5.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO EM OÓCITOS BOVINOS

Estudos **in vitro** demonstraram a susceptibilidade oocitária aos efeitos diretos da temperatura elevada. O choque térmico durante as primeiras 14 h de MIV (0-12h MIV) reduziu a maturação nuclear (LIMA, 2012), a fecundação (ROTH e HANSEN, 2005) e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004; JU, 2005; LIMA, 2012). A exposição de oócitos bovinos à temperatura severa de 42-43 °C (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004) ou à temperatura moderada de 40-41 °C (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004) durante 0-12h MIV bloqueou/reduziu o desenvolvimento embrionário, porém não alterou a taxa de clivagem mesmo após 14 h de exposição ao choque térmico. A exposição de oócitos VG ao estresse térmico de 41 °C reduziu a taxa de clivagem (LIMA, 2012),

desenvolvimento embrionário (PAYTON et al., 2004; LIMA, 2012) e aumentou a porcentagem de oócitos apoptóticos (LIMA, 2012). A susceptibilidade oocitária à temperatura elevada deve-se em parte à incapacidade do oócito em ativar mecanismos termoprotetores, como o aumento da síntese de do complexo proteico de estresse térmico – heat shock protein (HSPs) (EDWARDS e HANSEN, 1997).

Os mecanismos pelos quais o estresse térmico afeta a capacidade de desenvolvimento oocitária ainda não foram completamente esclarecidos. No entanto, tendo em vista que a apoptose é o principal processo responsável pela redução do número de oócitos durante a vida reprodutiva de fêmeas mamíferas (MORITA e TILLY, 1999; TILLY, 2001) é possível que esta forma de morte celular seja induzida em oócitos expostos às condições de estresse.

Recentemente, Roth e Hansen (2004, 2005) demonstraram o papel da apoptose oocitária induzida pelo choque térmico. A exposição de oócitos ao choque térmico durante as primeiras 12 h de MIV aumentou a proporção de oócitos positivos para apoptose. Nesses estudos, o bloqueio da apoptose oocitária com inibidor de caspases (z-DEVD-fmk) (ROTH e HANSEN, 2004) ou com esfingolipídio (esfingosina-1-fosfato) (ROTH e HANSEN, 2004) resgatou os índices de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto de oócitos expostos ao choque térmico. Dessa forma, a caracterização e a manipulação dos mecanismos envolvidos na indução de apoptose oocitária após o estresse térmico representam alternativas para minimizar os efeitos negativos da temperatura elevada sobre a capacidade reprodutiva de fêmeas bovinas.

2.6 FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA TIPO I

O sistema do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) inclui os ligantes IGF-I e IGF-II, ambos polipeptídios estruturalmente relacionados à pró-insulina e apresentam receptores específicos na superfície celular, os receptores (tipo 1 e 2 de IGF, IGF-IR e IGF-IIR, respectivamente), as proteínas lidadoras de IGF (IGFBP1 a 6) e as proteínas intracelulares sinalizadoras associadas ao IGF- IR, que incluem os membros da família do IRS (insulin-receptor substrate), AKT, TOR (target of rapamicina) e a S6K (S6 kinase) (SPINOLA E CASTRO e GUERRA-JÚNIOR, 2005).

O fígado é o responsável pela síntese da maior concentração circulante de

IGFs e IGFBPs, mas essas substâncias também podem ser localmente secretadas em outros órgãos por ação autócrina ou parácrina (CLEMMONS et al., 1998), como no oviduto (PUSHPAKUMARA et al., 2002) e endométrio (ROBINSON et al., 2000). A regulação da síntese dos IGFs se dá pelo eixo GH-IGF. O hipotálamo secreta hormônio liberador de GH (GHRH) que tem ação na hipófise anterior estimulando a secreção de hormônio de crescimento (GH) que age primariamente no fígado estimulando a produção e a liberação de IGF-I. O GH é o principal estimulador da produção de IGF-I, mas não de IGF-II. A secreção do GH também é estimulada pela ghrelina, que é secretada pelo estômago e hipotálamo (MARTINELLI JR et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008). As IGFs são transportadas para as células-alvo em complexo com as IGFBPs, diferentemente da insulina, o que prolonga sua meia vida e modula sua interação com a superfície de membrana dos receptores. A IGFBP3, entre as IGFBPs, é a forma circulante mais abundante, responsável pela maior parte da capacidade de ligação às IGFs, em especial à IGF-I. As IGFBP1 e IGFBP6 possuem uma capacidade de ligação 10 vezes maior à IGF-II em relação à IGF-I, enquanto as demais IGFBPs têm igual afinidade às IGFs. Nenhuma das IGFBPs se liga especificamente à insulina (SPINOLA E CASTRO e GUERRA-JÚNIOR, 2005).

As ações do IGF são geralmente anabólicos, no metabolismo de carboidratos e proteínas. Os principais efeitos são: na progressão do ciclo celular, estimulando a síntese de DNA e replicação celular; na proliferação celular, devido ao fato de diversos tipos celulares mostrarem respostas miogênica à estimulação com IGF-I; na apoptose, por ter a capacidade de, em certas células, inibir a morte celular; na função celular, por regular a secreção hormonal e potencializar a função em diversos tipos celulares (JONES e CLEMMONS, 1995; ADASHI et al., 1985).

2.6.1 O PAPEL DO IGF-I EM OÓCITOS BOVINOS

O sistema IGF tem um papel importante durante a foliculogênese e oogênese, participando desde o crescimento, dominância, desvio e até a maturação folicular e oocitária (FORTUNE et al., 2004; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2000; ITOH et al., 2002; LOUHIO et al., 2000; ZHAO et al., 2001). A concentração de IGF-I total no soro depende de fatores como a fase do ciclo estral e o manejo nutricional. Os valores de IGF-I circulantes mais elevados foram encontrados próximos ao período da ovulação. Em animais submetidos à dieta contendo alto e

baixo valor energético a concentração de IGF-I foi 600 e 350 ng/mL, respectivamente (ARMSTRONG et al., 2001). A concentração de IGF-I total no fluido folicular em novilhas, foi de 160 ng/mL para folículos pequenos, 179 ng/mL para folículos médios e 219 ng/mL para folículos grandes (SPICER et al., 1991). A concentração de IGF-I livre para o folículo dominante e folículo subordinado no momento do desvio (quando folículo dominante atinge 8,5 mm) foi de aproximadamente 12 ng/mL, e após o desvio a concentração de IGF-I livre sofreu um aumento para 17 ng/mL no folículo dominante e diminuiu para aproximadamente 5 ng/mL no folículo subordinado (GINTHER et al., 2002).

O ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) que codifica o receptor I do IGF-I foi identificado em oócitos e células do cumulus de bovinos (YOSHIDA et al., 1998; NUTTINCK et al., 2004). A transcrição de IGF-I ocorreu no período pré fertilização, somente em oócitos imaturos e posterior à fecundação em embriões de 2, 8, 16 células até o estágio de blastocistos. Porém a transcrição do seu receptor esteve presente durante todo o período pré e pós fecundação (YOSHIDA et al., 1998). Já Schultz e colaboradores (1992) relataram a presença do RNAm para o IGF-I e IGF-II e seus receptores em todas as fases do desenvolvimento, desde a fase de zigoto até blastocisto. Nuttinck e colaboradores (2004) observaram que o RNAm para IGF-I e IGFBP-4 está presente em células do cumulus, porém não foi encontrado no oócito de bovinos, entretanto o RNAm para o receptor de IGF-I e para o IGFBP-2 foram expressos em células do cumulus, oócitos e nos CCOs antes e após a maturação (NUTTINCK et al., 2004).

Em estudo recentemente publicado (SATRAPA et al., 2013), os níveis de RNAm da família IGF foram investigados em oócitos de vacas Nelore (***Bos indicus***) e Holandesas (***Bos taurus***) coletados por OPU. Após remoção de células do cumulus e zona pelúcida, os oócitos foram submetidos à extração de RNA total. Verificou-se que a expressão de RNAm de IGF-I, IGF-2, IGF-IR, IGF-2R, IGFBP2 e IGFBP4 foi significativamente maior maior em Holandesas, enquanto que a expressão de PAPP-A foi maior em oócitos de vacas Nelore. Esses autores indicam que vacas Nelore apresentam degradação mais eficiente das IGFBPs quando comparadas às representantes taurinas, resultando numa maior biodisponibilidade de IGF em oócitos zebuínos do que em taurinos.

Experimentos ***in vitro*** demonstraram que a suplementação do meio de MIV com 100 ng/mL de IGF-I acelerou a maturação nuclear (SAKAGUCHI et al.,

2002), reduziu a proporção de células positivas para apoptose em CCOs (KOLLE et al., 2003) e em blastocistos bovinos (BYRNE et al., 2002; MAKAREVICH e MARKKULA, 2002). De maneira similar, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* (CIV) com 100 ng/mL de IGF-I estimulou o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (PALMA et al., 1997; MOREIRA et al., 2002) e reduziu os índices de apoptose em blastocistos (MAKAREVICH e MARKKULA, 2002). Além de reduzir a apoptose embrionária espontânea, o IGF-I minimiza a apoptose induzida por vários estresses. O IGF-I inibiu a apoptose induzida pela radiação ultravioleta em embriões de coelho (HERRLER et al., 1998), pelo estresse oxidativo (KURZAVA et al., 2004), pelo TNF- α (BYRNE et al., 2002) e pela actinomicina (FABIAN et al., 2004) em embriões de camundongo. Em bovinos, a adição do IGF-I durante o CIV reduziu a apoptose embrionária induzida pelo estresse térmico (JOUSAN e HANSEN, 2004). Entretanto, o papel do IGF-I na competência de desenvolvimento de oócitos coletados de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* expostas ao estresse térmico *in vivo* ainda não foi demonstrado. É possível que o IGF-I em uma concentração adequada, exerça um papel termoprotetor em oócitos quando as vacas são expostas à temperatura elevada, reduzindo danos celulares e aumentando a competência de desenvolvimento subsequente.

A exposição de vacas Holandesas produtoras de leite ao estresse térmico diminuiu o consumo de matéria seca, reduzindo os níveis circulantes de glicose, insulina e IGF-I. Essa redução de IGF-I compromete o crescimento folicular e a qualidade oocitária (DE RENSIS e SCARAMUZZI, 2003; BUTLER et al., 2006). Estudos *in vitro* demonstraram o papel benéfico do IGF-I em oócitos e embriões expostos ao estresse térmico. Em bovinos, a adição de 100 ng/mL de IGF-I durante a maturação de oócitos (ISPADA et al., 2010) ou o cultivo de embriões (JOUSAN e HANSEN, 2004) expostos ao choque térmico reduziu a apoptose oocitária (ISPADA et al., 2010) e resgatou o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (JOUSAN e HANSEN, 2004). Outro estudo demonstrou que o choque térmico durante a MIV em oócitos bovinos afetou a organização dos filamentos de actina (RODRIGUES et al., 2012). Nesse estudo, o IGF-I foi capaz de reverter parte do efeito da temperatura, demonstrando seu papel termoprotetor no oócito. Porém, a organização dos microtúbulos e parte da maturação nuclear oocitária, afetada pelo choque térmico, não foi resgatada pelo IGF-I. Assim, este trabalho mostrou que o efeito positivo do IGF-I na progressão meiótica possa ser devido à ação do mesmo

nos filamentos de actina.

Em outro experimento a suplementação do meio CIV com IGF-I tornou blastocistos mais resistentes à temperatura elevada, aumentando a taxa de prenhez após a transferência de embriões para vacas Holandesas expostas ao estresse térmico *in vivo* (BLOCK et al., 2003). Quando observado a adição de 100 ng/mL no meio de maturação, houve uma redução do desenvolvimento a blastocisto em oócitos expostos ao choque térmico (ZHANDI et al., 2009). Entretanto a adição de 12,5 ng/mL de IGF-I durante a maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico nas primeiras 14 h da maturação resgatou os efeitos deletérios da temperatura elevada no desenvolvimento a blastocisto (LIMA, 2012).

PRÉ-EXPERIMENTO

EFEITO DOSE RESPOSTA DO IGF-I DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS

3 PRÉ-EXPERIMENTO

3.1 JUSTIFICATIVA

Os pré-experimentos visaram determinar as concentrações de IGF-I que estimulam a competência de desenvolvimento de oócitos bovinos durante a maturação *in vitro* (MIV). O primeiro pré-experimento foi conduzido com meio MIV padrão contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). No entanto, já foi demonstrado que o SFB apresenta em sua composição diferentes hormônios e fatores de crescimento, incluindo o IGF-I (PALMA et al., 1997; SINGH e ARMSTRONG, 1997). Além disso a concentração destes fatores pode variar de acordo com o lote de SFB produzido afetando a resposta experimental. Dessa forma, o pré-experimento 2 avaliou o efeito dose resposta do IGF-I na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos em meio MIV quimicamente semidefinido.

3.2 HIPÓTESES

- I. A concentração de IGF-I durante a MIV modula a competência de desenvolvimento de oócitos bovinos. Concentrações mais baixas estimulam a competência de desenvolvimento oocitária.
- II. O efeito do IGF-I durante a MIV na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos é mais acentuado em oócitos maturados em meio semidefinido do que em meio não definido.

3.3 OBJETIVOS

- I. Avaliar o efeito dose resposta do IGF-I (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 ng/mL de IGF-I) durante a MIV em meio quimicamente não definido (10% de soro fetal bovino) na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos.
- II. Avaliar o efeito dose resposta do IGF-I (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ng/mL de IGF-I) durante a MIV em meio quimicamente semidefinido (6 mg/mL de albumina sérica bovina) na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 COLETA DE OVÁRIOS E COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS (CCOS)

O projeto piloto foi desenvolvido no Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ- USP) e no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os ovários oriundos de vacas mestiças ***Bos indicus*** foram obtidos do abatedouro Angelelli (Piracicaba-SP), lavados imediatamente após a coleta em solução salina de transporte [0,9% (p/v) NaCl contendo 100 unidades/mL de penicilina-G e 100 µg/mL de estreptomicina], transferidos para sacos plástico contendo a mesma solução e transportados para o laboratório dentro de um recipiente térmico à 37 °C. No laboratório os ovários foram lavados em solução salina de transporte para remoção de sangue e tecidos remanescentes, selecionados pela quantidade de folículos 2-8 mm de diâmetro, transferidos para um béquer de 1000 mL contendo solução salina de transporte, mantida em banho-maria à 37 °C até o momento do fatiamento.

Os complexos cumulus oócitos (CCOs) foram coletados dos folículos de 2-8 mm de diâmetro pela técnica de fatiamento folicular (“slicing”) (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002). A coleta foi realizada em béqueres de 200 mL, contendo 50 mL de Meio de Coleta de Oócitos (MCO): Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) suplementado com 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 100 unidades/mL de penicilina-G, 100 µg/mL de estreptomicina, 1% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1 unidade USP de heparina. O conteúdo do béquer foi transferido para tubos de 50 mL e incubados por 5-10 minutos em banhomaria a 37 °C para decantar o conteúdo fatiado. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril o sedimento do tubo foi filtrado em filtro de nylon de 100 µm. O filtro foi lavado várias vezes com MCO para retirada dos CCOs que permaneceram retidos no mesmo. O material filtrado foi transferido para uma placa de Petri, e foi realizada a busca dos oócitos com auxílio de um estereomicroscópio para avaliação e classificação dos mesmos. Os critérios considerados para a seleção dos CCOs foram baseados na presença, no número de camadas e no grau de compactação das células do cumulus, bem como no aspecto do

citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade (LEIBFRIED e FIRST, 1979). Foram considerados viáveis e utilizados para os pré-experimentos somente os CCOs classificados como grau I e II contendo três ou mais camadas de células do cumulus compactas e citoplasma homogêneo (AMORIM, et al. 2008). Os oócitos grau III e IV foram descartados. Os CCOs selecionados foram lavados em placa em Meio de Pré-Maturação [TCM-199 HEPES contendo 3 mg/mL de BSA – Livre de ácidos graxos, 50 µg/mL de gentamicina e 0,2 mM de piruvato de sódio].

3.4.2 DILUIÇÃO DO IGF-I

A solução estoque de 250 µg/mL do fator de crescimento semelhante à insulina-I recombinante humano (IGF-I, Up State 01-208) foi preparado em 0,1 M de ácido acético (veículo) conforme recondação do fabricante. No momento do uso a solução estoque foi diluída para 200 ng/mL IGF-I (0,8 µL de IGF-I estoque em 1 mL de meio de maturação), seguida de diluições seriadas até atingir a concentração de 6,25 ng/mL de IGF-I.

3.4.3 MATURAÇÃO *IN VITRO*

Grupos de 10 CCOs foram transferidos para gotas de 50 µL de meio de maturação [TCM-199 bicarbonato suplementado com macromoléculas (10% (v/v) de SFB ou 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos dependendo do pré-experimento), 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 1 µg/mL de estradiol, 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) e 10 µg/mL de hormônio luteinizante (LH)] sob óleo mineral em atmosfera de 5% de CO₂ em ar por 22-24 h.

3.4.4 FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Os meios de cultura TALP (***Tyrode's albumin-lactate-pyruvate***) utilizados para purificação do sêmen e fecundação foram preparados segundo Parrish e colaboradores (1988). Após as 22-24 h de maturação, os CCOs foram lavados uma vez em uma placa pequena contendo meio Pré FIV (solução TALP contendo 6 mg/mL de BSA livre de ácido graxo, 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio). Em seguida, grupos de 10 CCOs foram transferidos para gotas de 90 µL de

meio de fecundação *in vitro* (FIV) composto pela solução TALP com 6 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 50 µg/mL de gentamicina e 0,2 mM de piruvato de sódio, 17.500 USP/mL de heparina e 0,044 µL/mL de PHE (penicilamina 2 µM, hipotaurina 1 µM, epinefrina 0,25 µM). Em cada réplica, duas palhetas de sêmen foram descongeladas durante 30 segundos à 37 °C e o sêmen centrifugado em gradiente de Percoll (Percoll 90% e Percoll 45%) a 9.000 g por 5 minutos, a fim de separar de espermatozoides viáveis e inviáveis. O sedimento foi centrifugado à 9.000 g por 2,5 minutos em meio FIV. Os espermatozoides viáveis obtidos do sedimento após a centrifugação foram submetidos à avaliação de motilidade (lâmina e lamínula aquecidas) e a concentração foi estabelecida em câmara de Neubauer. Os oócitos foram fecundados com 1×10^6 espermatozóides/mL por 8 h.

3.4.5 CULTIVO *IN VITRO*

Passadas as oito horas destinadas à fecundação, grupos de 30 possíveis zigotos foram transferidos para gotas de 50 µL de meio de cultura para embrião (KSOM contendo 10% de SFB, 10 mg/mL de gentamicina e 5 µL/mL de aminoácidos não essenciais 100x) sob óleo mineral a 38,5 °C em 5% de CO₂. A porcentagem de clivagem foi determinada no dia 3 e a porcentagem de embriões que desenvolveram até o estágio de blastocisto foi determinada nos dias 7, 8 e 9 após a fecundação.

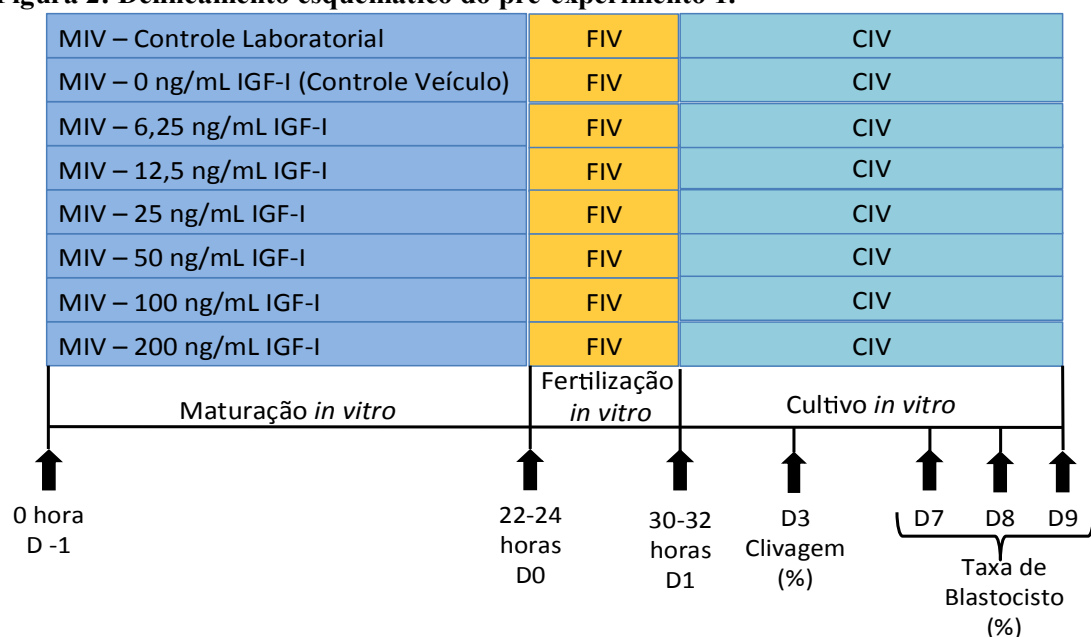
3.4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.4.6.1 PRÉ-EXPERIMENTO 1: EFEITO DOSE RESPOSTA DO IGF-I DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* EM MEIO NÃO DEFINIDO NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS

Este experimento avaliou o efeito dose resposta de diferentes concentrações de IGF-I no meio padrão de maturação *in vitro* contendo 10% de SFB. Grupo de 10 CCOs foram aleatoriamente distribuídos em gotas de 50 µL de meio MIV padrão suplementado com 0 (controle veículo: 0,1M de ácido acético); 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ou 200 ng/mL de IGF-I por 22-24 h (Figura 2). A concentração de 0 ng/mL de IGF-I representa o meio suplementado com 0,1 M de ácido acético (veículo

do IGF-I). Foi realizado também o controle laboratorial em meio MIV padrão sem a presença do veículo (Figura 2). Em seguida os oócitos foram fecundados *in vitro* (FIV) por 8 h e cultivados *in vitro* (CIV) como previamente descrito. A porcentagem de oócitos clivados e que se desenvolveram ao estágio de blastocisto foram avaliados nos dias 3 e 7, 8 e 9 após fecundação, respectivamente. Neste experimento foram realizadas 5 replicatas, utilizando 140-163 oócitos por tratamento.

Figura 2: Delineamento esquemático do pré-experimento 1.

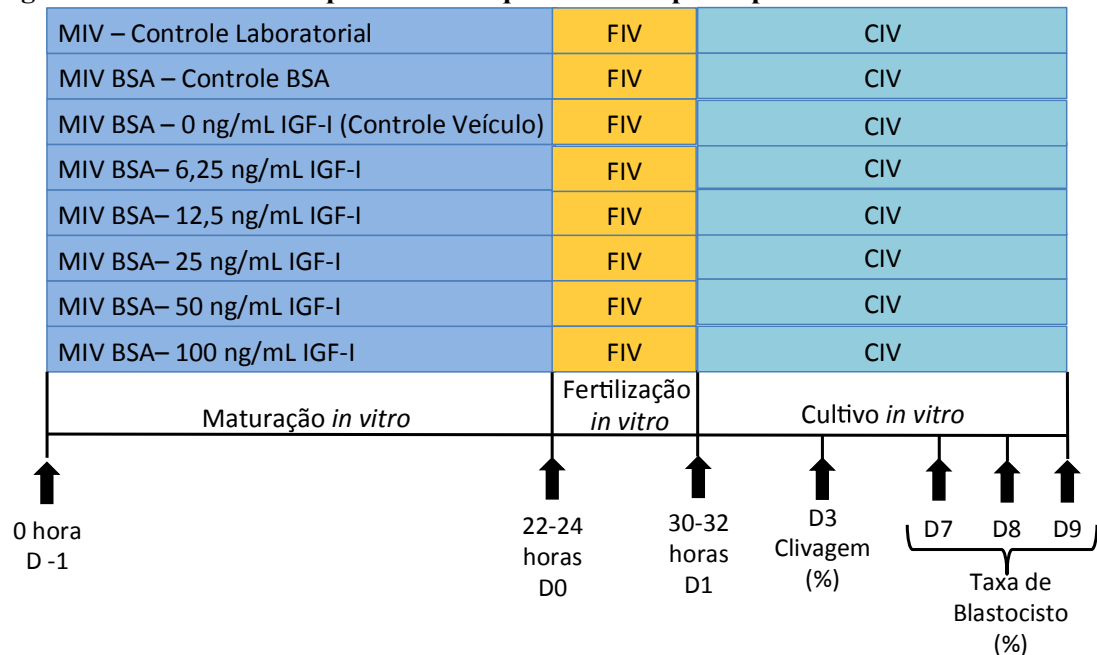


3.4.6.2 PRÉ-EXPERIMENTO 2: EFEITO DOSE RESPOSTA DO IGF-I DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* EM MEIO MIV QUIMICAMENTE SEMIDEFINIDO NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS

Este experimento avaliou o efeito dose resposta do IGF-I durante a MIV em meio MIV quimicamente semidefinido (6 mg/mL de BSA – livre de ácidos graxos) na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos. Os CCOSs foram maturados em meio MIV semidefinido contendo 0 (veículo: 0,1M de ácido acético); 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ng/mL de IGF-I por 22-24 h (Figura 3). A concentração de 0 ng/mL de IGF-I representa o controle veículo cujo meio suplementado com 0,1 M de ácido acético (veículo do IGF-I). Foram realizados dois controles adicionais: controle laboratorial (Meio MIV padrão contendo 10% SFB) e controle BSA (meio MIV contendo 6 mg/mL de BSA). Os oócitos foram fecundados e cultivados *in vitro* como

previamente descrito. A porcentagem de oócitos clivados e que se desenvolveram ao estágio de blastocisto foram avaliados nos dias 3 e 7, 8 e 9 após fecundação, respectivamente. Neste experimento foram realizadas 3 replicatas, utilizando 78-94 oócitos por tratamento.

Figura 3: Delineamento experimental esquemático do pré-experimento 2.



3.4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram previamente avaliados quanto às premissas para análise de variância (homogeneidade das variáveis e normalidade dos resíduos) utilizando o pacote estatístico SAS (SAS, 1989). Quando necessário os dados foram submetidos às transformações estatísticas logaritmo e raiz quadrada. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo método dos quadrados mínimos utilizando os procedimentos PROC GLM e PROC MIXED do pacote estatístico SAS. As variáveis dependentes foram porcentagem de oócitos clivados e porcentagem de blastocisto calculada pela quantidade de oócitos totais e pela quantidade de embriões clivados. As variáveis independentes foram replicata e IGF-I. O modelo estatístico usado para cada experimento considerou os efeitos principais sendo utilizado o procedimento pdiff para estabelecer as comparações significativas entre médias.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 PRÉ-EXPERIMENTO 1: EFEITO DOSE RESPOSTA DO IGF-I DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* EM MEIO NÃO DEFINIDO NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS

Este experimento avaliou o efeito dose resposta do IGF-I no meio padrão de maturação *in vitro* na competência oocitária. As concentrações 12,5 e 25 ng/mL de IGF-I aumentaram ($p < 0,05$) a taxa de clivagem em relação controle veículo (0 ng/mL de IGF-I; Figura 4). A adição do veículo (0,1 M de ácido acético) no meio padrão reduziu ($p < 0,05$) a taxa de clivagem em relação ao controle laboratorial (Figura 4). De maneira similar a concentração de 25 ng/mL de IGF-I aumentou ($p < 0,05$) a porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto nos dias 7 (Figura 5) e 8 (Figura 6) após a fecundação em relação ao controle laboratorial e ao controle veículo. No entanto, não houve efeito do IGF-I na porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto em relação ao controle veículo (Figuras 7 e 8).

Figura 4: Efeito dose resposta do IGF-I durante maturação *in vitro* em meio não definido na porcentagem de oócitos clivados no dia 3 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM de 5 replicatas usando 144-163 oócitos por tratamento. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).

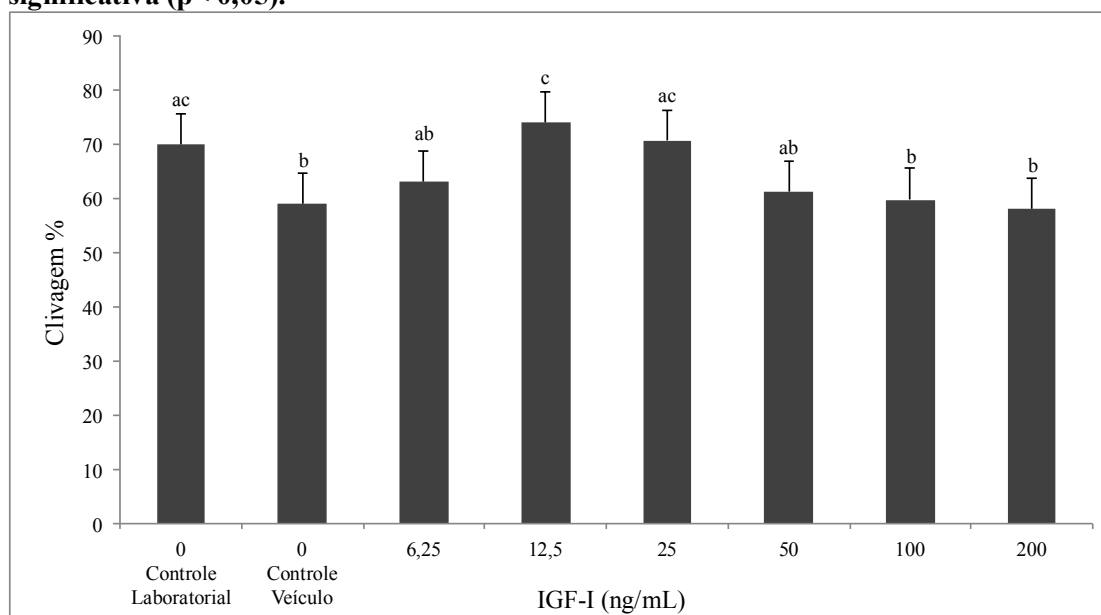


Figura 5: Efeito dose resposta do IGF-I durante maturação *in vitro* em meio não definido na porcentagem de óocitos que atingiram o estágio de blastocisto no dia 7 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM de 5 replicatas usando 144-163 óocitos por tratamento. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).

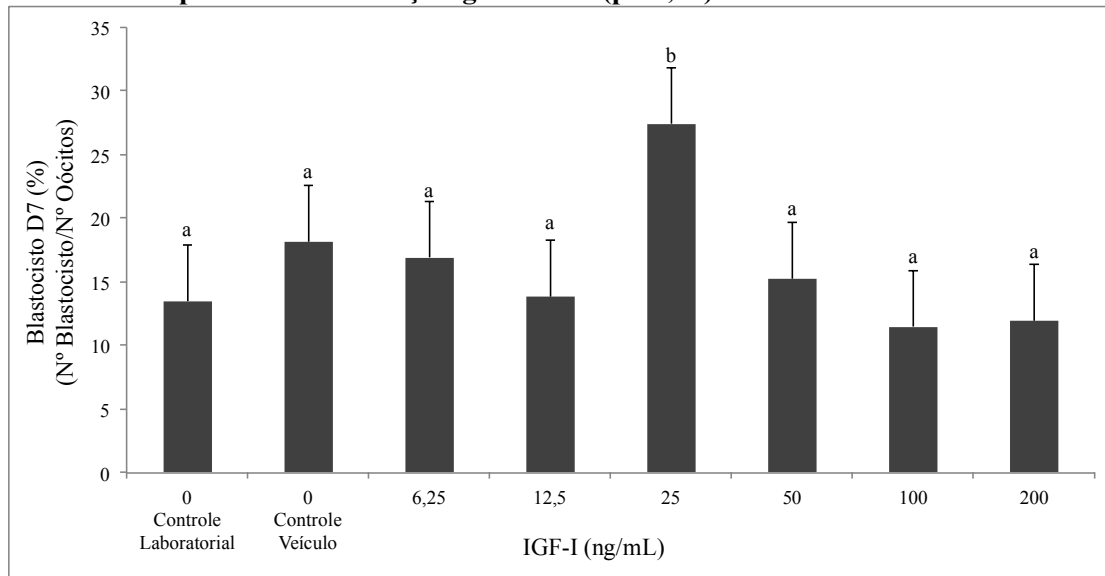


Figura 6: Efeito dose resposta do IGF-I durante maturação *in vitro* em meio não definido na porcentagem de óocitos que atingiram o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM de 5 replicatas usando 144-163 óocitos por tratamento. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).

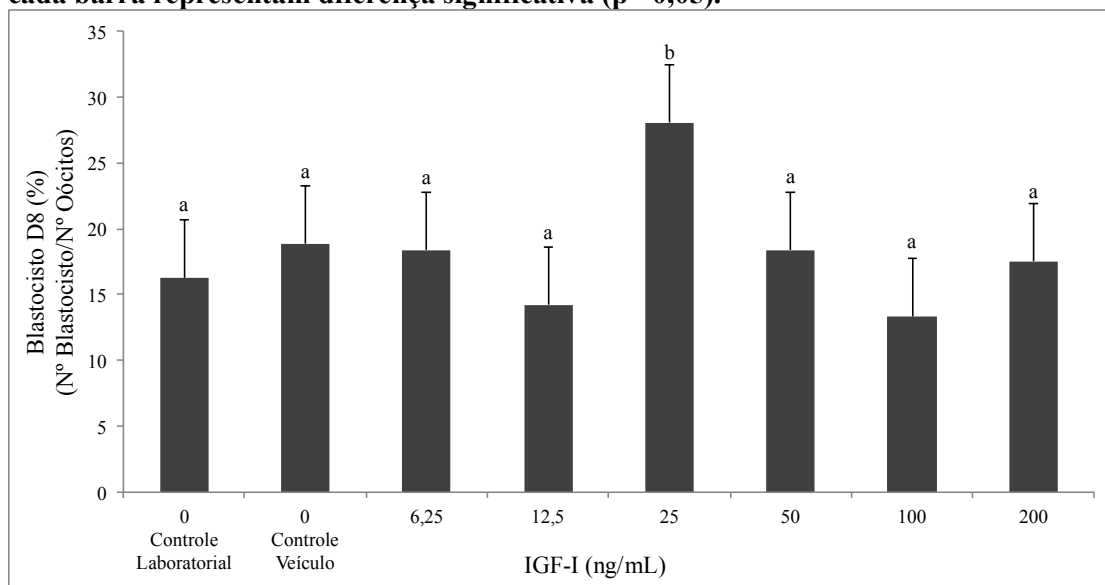


Figura 7: Efeito dose resposta do IGF-I durante maturação *in vitro* em meio não definido na porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto no dia 7 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM de 5 replicatas usando 144-163 oócitos por tratamento. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).

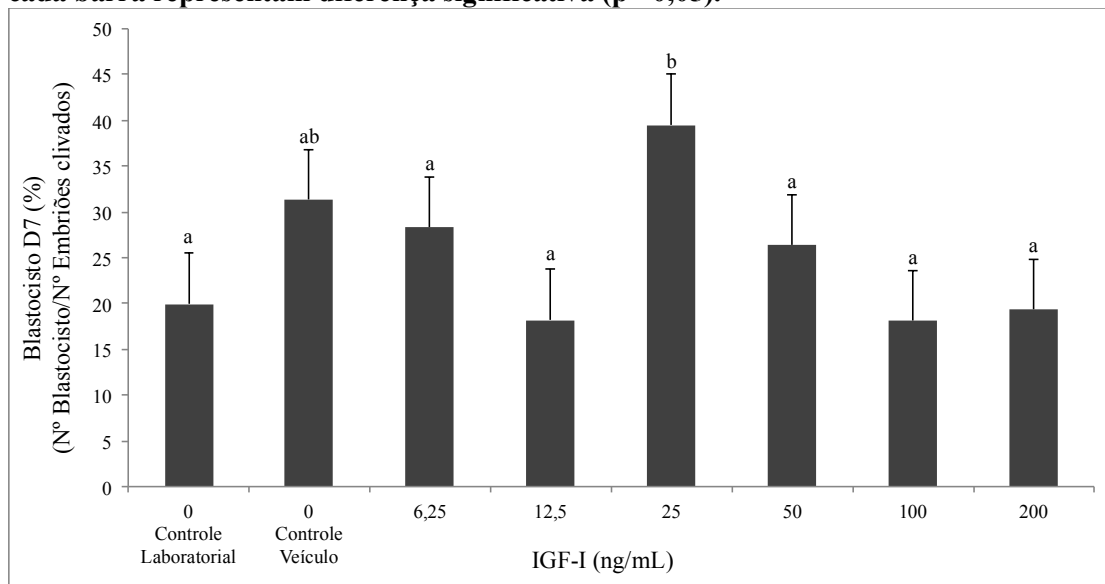
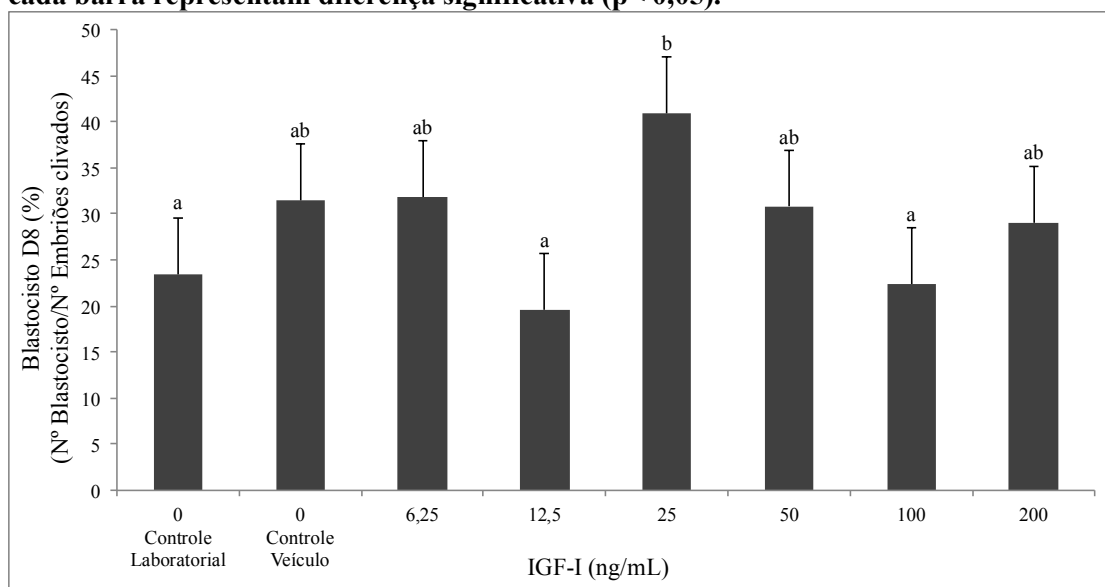


Figura 8: Efeito dose resposta do IGF-I durante maturação *in vitro* em meio não definido na porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM de 5 replicatas usando 144-163 oócitos por tratamento. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).



3.5.2 PRÉ-EXPERIMENTO 2: EFEITO DOSE RESPOSTA DO IGF-I DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* EM MEIO MIV QUIMICAMENTE SEMIDEFINIDO NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS

Este experimento avaliou o efeito dose resposta do IGF-I no meio de maturação *in vitro* semidefinido (6 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos) na competência oocitária. A concentração de 25 ng/mL de IGF-I aumentou ($p < 0,05$) a taxa de clivagem em relação ao controle veículo (0 ng/mL de IGF-I), controle laboratorial e controle BSA (Figura 9). Não houve diferença na taxa de clivagem entre os diferentes controles. A dose mais alta de 50 ng/mL de IGF-I exerceu efeito negativo reduzindo ($p < 0,05$) a taxa de clivagem em relação a todos os controles. A porcentagem de blastocisto no dia 7 após a fecundação não foi afetada pelas diferentes doses de IGF-I durante a MIV (Figura 10). No entanto, a concentração de 25 ng/mL de IGF-I aumentou ($p < 0,05$) a porcentagem de oócitos que atingiu o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação quando comparado ao controle BSA (Figura 11). Quando observado a porcentagem de embriões clivados que atingiu o estágio de blastocisto nos dias 7 e 8 não houve efeito do IGF-I (Figuras 12 e 13).

Figura 9: Efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação *in vitro* em meio MIV quimicamente semidefinido na porcentagem de oócitos clivados no dia 3 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM de 3 replicatas usando 78-94 oócitos por tratamento. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).

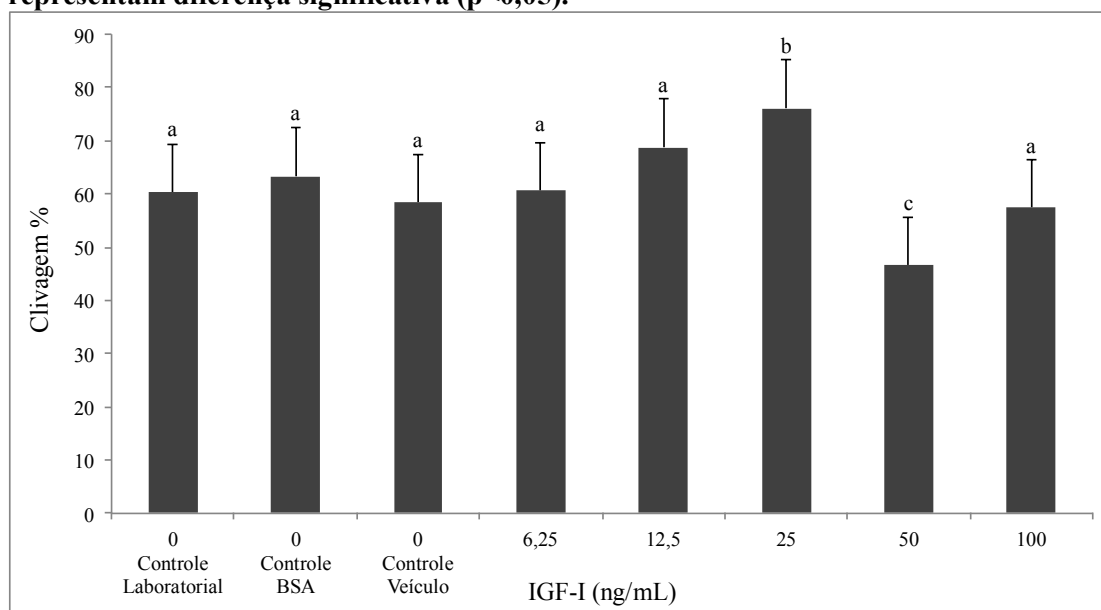


Figura 10: Efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação *in vitro* em meio MIV quimicamente semidefinido na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto no dia 7 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM 3 replicatas usando 78-94 oócitos por tratamento. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).

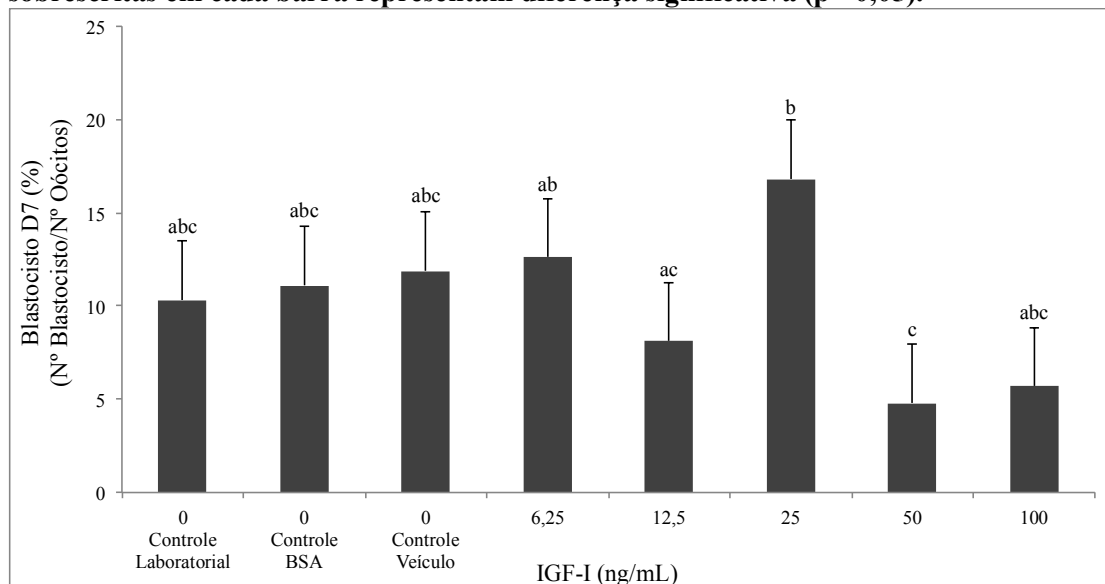


Figura 11: Efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação *in vitro* em meio MIV quimicamente semidefinido na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM 3 replicatas usando 78-94 oócitos por tratamento. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).

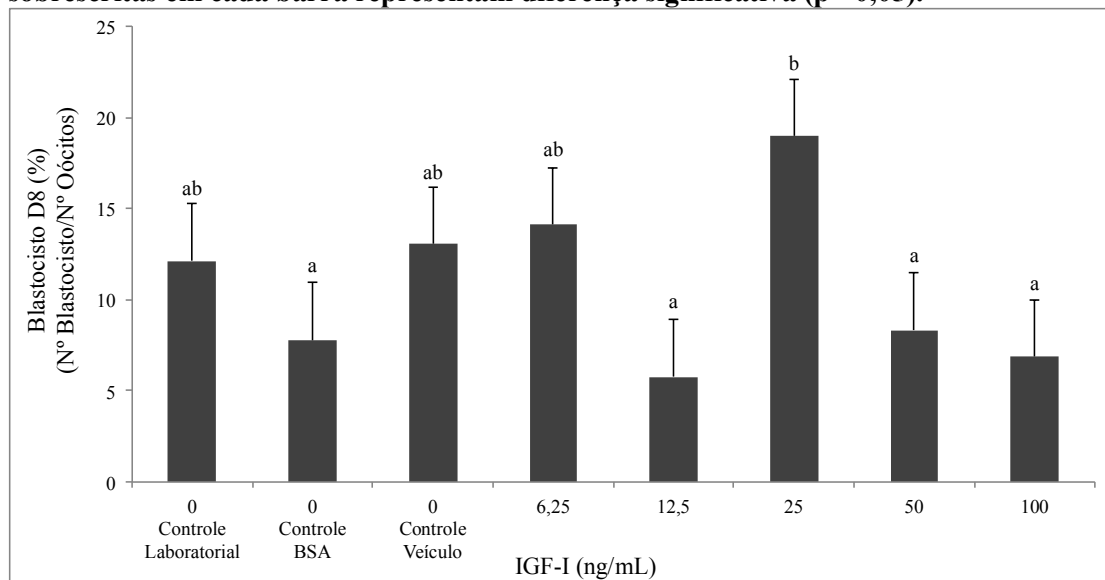


Figura 12: Efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação *in vitro* em meio MIV quimicamente semidefinido na porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto no dia 7 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM 3 replicatas usando 78-94 oócitos por tratamento. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

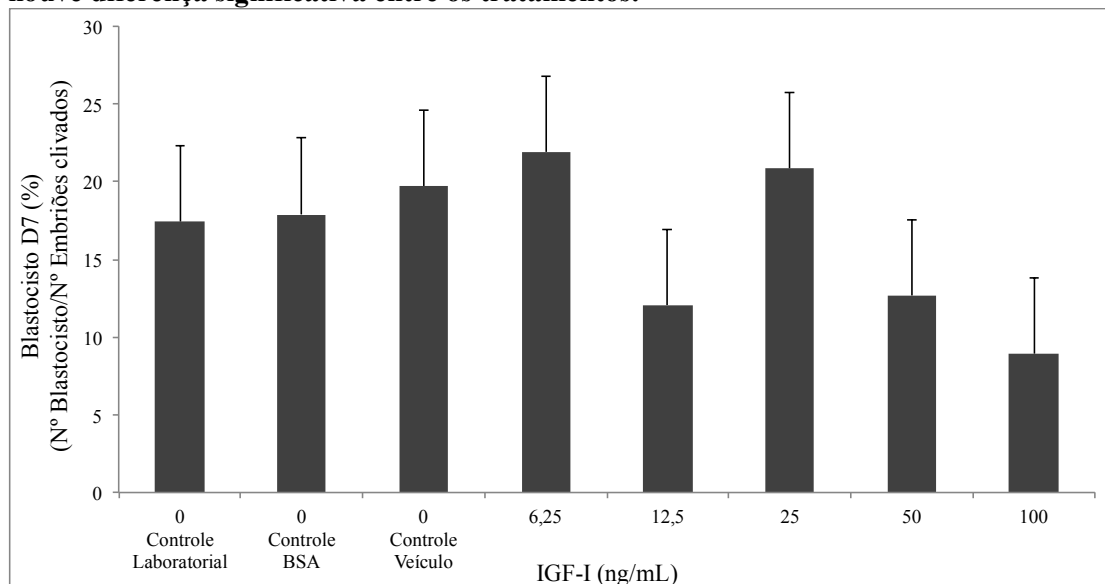
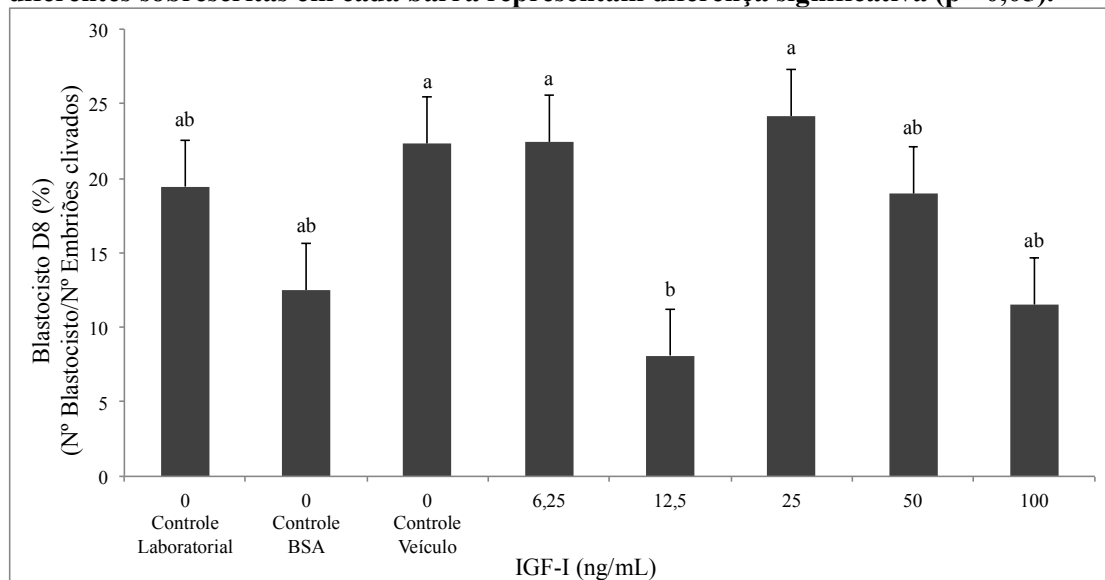


Figura 13: Efeito dose resposta do IGF-I durante a maturação *in vitro* em meio MIV quimicamente semidefinido na porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM 3 replicatas usando 78-94 oócitos por tratamento. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).



3.6 DISCUSSÃO

O papel do IGF-I na competência oocitária foi investigado em estudos dose resposta com diferentes concentrações de IGF-I em meio de maturação contendo SFB ou BSA. Assim como outros fatores de crescimento, a resposta celular ao IGF-I pode ser modulada pela concentração (YOSHIMURA et al, 1996; CUI e ALMAZAN, 2007) bem como pela composição do meio (ROSE e BAVISTER, 1992; PAULA-LOPES et al. 2007; MINGOTI, 2009). A presença do IGF-I endógeno no soro (BARNES e SATO, 1980; LAMBERT e BIRCH, 1985; STEIN, 2007) levou a hipótese de que a resposta oocitária a suplementação com IGF-I seria mais acentuada em meio semidefinido contendo apenas BSA. No entanto, a adição de 25 ng/mL de IGF-I durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos aumentou as taxas de clivagem e blastocisto independente do tipo de meio. A adição do veículo (0,1 M de ácido acético) no meio MIV padrão reduziu a taxa de clivagem em relação ao controle laboratorial. Estes resultados sugerem que o veículo poderia ter causado efeito negativo, porém como não foi observado este mesmo padrão no experimento 2 (meio MIV quimicamente semidefinido), supõe-se que este efeito negativo seja devido a interação do veículo com o SFB. O efeito estimulatório da dose de 25 ng/mL de IGF-I pode ser fisiológico visto que as doses de IGF-I livre no líquido folicular de bovinos variam entre 12-17 ng/mL (GINTHER et al., 2002). Já em éguas, o IGF-I livre no fluido folicular de folículos pequenos e médios variou em torno de 1,6-1,9 ng/mL, respectivamente, na fase folicular, enquanto o folículo dominante apresentou concentração média 25,1 ng/mL (SPICER et al., 2005). Esta concentração de IGF-I é uma concentração próxima daquela encontrada livre em folículos pré ovulatório e ovulatório variando de 10 à 13 ng/mL (BEG, et al. 2002).

A expressão de RNAm que codifica o receptor de IGF-I (IGF-IR) (YOSHIDA et al., 1998; NUTTINCK et al., 2004) e a presença deste e do IGF-IIR (WANG et al, 2009) em oócitos e células do cumulus desde o folículo antral, maturação até a implantação (YOSHIDA et al., 1998; NUTTINCK et al., 2004), indicam a importância deste fator no processo de crescimento e maturação do oócito. A ativação do IGF-IR no oócito desencadeia a cascata de sinalização da proteína quinase ativadora de mitose (MAPK) (LEROITH, 1995; FUKUDA et al., 2002; JOUSAN e HANSEN, 2007) promovendo proliferação celular, transcrição gênica,

inibição da cascata de apoptose (GALLAGHER e LEROITH, et al. 2011) e maturação nuclear (SAKAGUCHI, et al. 2002).

Fan e colaboradores (2002) demonstraram que o excesso de atividade da MAPK nas primeiras 20 horas da maturação oocitária em suínos resulta em uma queda de atividade desta, culminando com a desorganização dos microtúbulos. Desta maneira é possível especular que uma concentração de IGF-I mais elevada do que a encontrada fisiologicamente pode acelerar a maturação, promovendo o excesso da atividade da MAPK, o que acarretaria na queda significativa de sua atividade antes da fecundação, levando a desorganização dos microtúbulos. Estes relatos podem justificar o efeito observado na dose de 50 ng/mL de IGF-I do experimento, onde a adição deste ao meio MIV semidefinido provocou redução na taxa de clivagem, embora este efeito negativo não tenha se mantido e a dose não apresentou efeito negativo no desenvolvimento a blastocistos. Tais resultados poderiam ser melhor compreendidos utilizando número maior de CCOs, aumentando a quantidade de replicatas e, podendo assim, reduzir o erro amostral. O desbalanço da quantidade de IGF-I no meio pode aumentar ou diminuir o tempo de maturação nuclear, a maturação inadequada do oócito, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumentando a ocorrência de polispermia, partenogênese e do bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU e BRACKET, 1988).

O desenvolvimento embrionário pré-implantacional até o estágio de blastocisto foi estimulado pela concentração de 25 ng/mL de IGF-I sendo 10% mais elevada em oócitos maturados em meio MIV padrão contendo SFB quando comparado ao meio semidefinido com BSA. Esta diferença pode estar associada a presença de diferentes hormônios e fatores de crescimento no soro (PALMA et al., 1997; SINGH e ARMSTRONG, 1997).) Estima-se que são encontrados no SFB, em média, 10 µU/mL de insulina, 39,0 ng/mL de hormônio do crescimento, 95 pg/mL de FSH, 400 pg/mL de testosterona, 80 pg/mL de progesterona, 176 pg/mL de hormônio luteotrópico, 8 pg/mL de LH entre muitos outros componentes (LINDL, 2002). Todos esses hormônios podem interagir com o IGF-I e/ou potencializar o seu efeito intracelular, promovendo assim uma melhora significativa no desenvolvimento embrionário de oócitos maturados em meio contendo SFB o que estimula a competência do oócito.

Na literatura recente, o uso do IGF-I é mais difundido durante a CIV e na concentração de 100 ng/mL, apresentando efeitos positivos sobre o desenvolvimento

a blastocisto e sobrevivência a exposição ao estresse térmico *in vitro* (HANSEN et al., 2008, 2011; BLOCK e HANSEN, 2007), porém não há relatos do uso da contração de 25 ng/mL de IGF-I no meio de maturação. Já foi demonstrado que, em bovinos, esta suplementação estimula o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (MOREIRA et al., 2002), tende a aumentar a sobrevivência de 26,1% para 43,2% após a transferência embrionária (BLOCK et al., 2007) e alteração de transcritos relacionados a sobrevivência celular (BLOCK et al., 2008). Em oócitos, a dose de 100 ng/mL apresentou efeito negativo durante a MIV, reduzindo o desenvolvimento de blastocisto em oócitos expostos ao estresse térmico (Zhandi, 2009; Risolia, 2011).

Não há relatos do uso da contração de 25 ng/mL de IGF-I no meio de maturação na taxa de desenvolvimento embrionário. Entretanto, já foi demonstrado que a adição de 12,5 ng/mL de IGF-I reduziu os efeitos do estresse térmico no oócito (Lima, 2012), corroborando a hipótese de que, durante a MIV, o uso de menores concentrações de IGF-I (12,5 ou 25 ng/mL) apresentam efeitos positivos, enquanto que para o cultivo embrionário doses mais elevadas (100 ng/nL) promovem aumento no desenvolvimento de blastocistos.

3.7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e sob as condições impostas para estes experimento pode-se concluir que:

I – A dose de 25 ng/mL de IGF-I estimulou a clivagem e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto independente da presença de SFB ou BSA no meio MIV.

II – O efeito estimulatório do IGF-I na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos não foi mais acentuado em oócitos maturados em meio semidefinido em relação ao meio não definido.

EXPERIMENTO

**O EFEITO DO IGF-I EM OÓCITOS COLETADOS DE VACAS *BOS INDICUS*
E *BOS TAURUS* EXPOSTAS AO ESTRESSE TÉRMICO *IN VIVO***

4 EXPERIMENTO

4.1 HIPÓTESES

- I. A exposição de vacas ***Bos taurus*** e ***Bos indicus*** a temperatura ambiente e umidade relativa do ar elevada induz ao estresse térmico;
- II. O aumento da temperatura ambiente e umidade relativa do ar afeta de forma mais acentuada os parâmetros fisiológicos das vacas ***Bos taurus*** em relação as ***Bos indicus***;
- III. O efeito deletério do estresse térmico sobre a função oocitária é mais acentuado em oócitos de vacas ***Bos taurus*** do que em oócitos de vacas ***Bos indicus***;
- IV. O IGF-I exerce papel termoprotetor em oócitos bovinos. O papel termoprotetor do IGF-I é mais acentuado em oócitos de vacas ***Bos taurus*** do que em oócitos de vacas ***Bos indicus*** submetidos ao estresse térmico.

4.2 OBJETIVOS

- I. Caracterizar o estresse térmico induzido em vacas ***Bos taurus*** e ***Bos indicus*** submetidas a temperatura ambiente e umidade relativa do ar elevada;
- II. Avaliar o efeito do estresse térmico na frequência respiratória, frequência cardíaca, temperaturas retal e cutânea;
- III. Avaliar as diferenças de termotolerância em oócitos de vacas ***Bos indicus*** e ***Bos taurus*** expostas ao estresse térmico;
- IV. Determinar o papel do IGF-I na competência de oócitos de vacas ***Bos indicus*** e ***Bos taurus*** expostas ao estresse térmico.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Campus da Universidade de São Paulo (USP), no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (VRA – FMVZ), localizado no município de Pirassununga. A localização geográfica do campus é 21°59' de latitude sul e 47°26' de longitude oeste (W.Gr) e altitude média de 635 metros.

4.3.2 ANIMAIS – DOADORAS DE OÓCITOS

Para este experimento, foram inicialmente utilizadas 6 vacas Holandesas PO (puras de origem) de alta produção leiteira e 9 vacas Nelores. As vacas Holandesas foram selecionadas na Fazenda Santa Maria localizada em Pouso Alegre-MG. As vacas desta fazenda são classificadas oficialmente para tipo leiteiro produzindo 7.800 litros de leite por dia. As vacas Holandesas e Nelores foram temporariamente doadas pela Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga. As vacas Nelores foram selecionadas com base nos seguintes critérios: escore de condição corporal (ECC), peso, presença de copo lúteo (CL), número de partos, idade e docilidade (Tabela 1).

Durante todo período experimental os animais tiveram acesso a cama de bagaço de cana no chão a fim de garantir o conforto e menor desgastes de articulações. O bagaço de cana foi doado pela Baldin Bioenergia S/A.

Tabela 1 – Critérios de seleção das vacas Holandesas e Nelore.

Raça	ECC Médio	Produção na lactação Anterior	Peso Médio	# Partos Média	Média de Idade
Holandesa	4	7.250 Kg/305d	615 Kg	1,6	5A2M
Nelore	6,1	-	525 Kg	4,5	7A5M

ECC = Escore corporal Holandesa (1-5), Nelore (1-9) # Partos = Número de partos

4.3.3 ALIMENTAÇÃO

Durante o período pré-experimental (Fase I) ou período de adaptação dos animais ao manejo, todas as vacas receberam coletivamente concentrado (Sal proteinado) e volumoso (Silagem) a pasto, sendo a alimentação uma média por vaca de acordo com o **Nutrient Requirements of Cattle** (NRC), que estabelece as necessidades nutricionais de gados em diferentes condições fisiológicas (720 Kg/dia - 40 Kg de silagem/animal e 36 Kg/dia - 2 Kg de concentrado/animal este fornecido uma vez ao dia) (Tabelas 2 e 3) e água **ad libitum**. Durante o período experimental (Fase 2), os animais mantidos em sistema de **tie stall**, receberam alimentação de maneira individual, balanceada de acordo com os requerimentos do NRC (40 Kg de silagem/animal e 2 Kg de concentrado/animal este fornecido uma vez ao dia) e água **ad libitum**.

Tabela 2 – Alimentação balanceada de acordo com NRC apresentada em % total na matéria seca.

Ingredientes	Total na MS %
Silagem de milho	80,00
Milho moído	11,00
Farelo de soja	6,00
Uréia	1,00
Minerthal 80 S	1,60
Sal comum	0,40
Total	100,00

Tabela 3 – Formulação do concentrado com porcentagens em relação a dieta total e ao concentrado.

Ingredientes	Dieta %	Concentrado %
Milho moído	11,00	55,00
Farelo de soja	6,00	30,00
Uréia	1,00	5,00
Minerthal 80S	1,60	8,00
Sal comum	0,40	2,00
Total	20,00	100,00

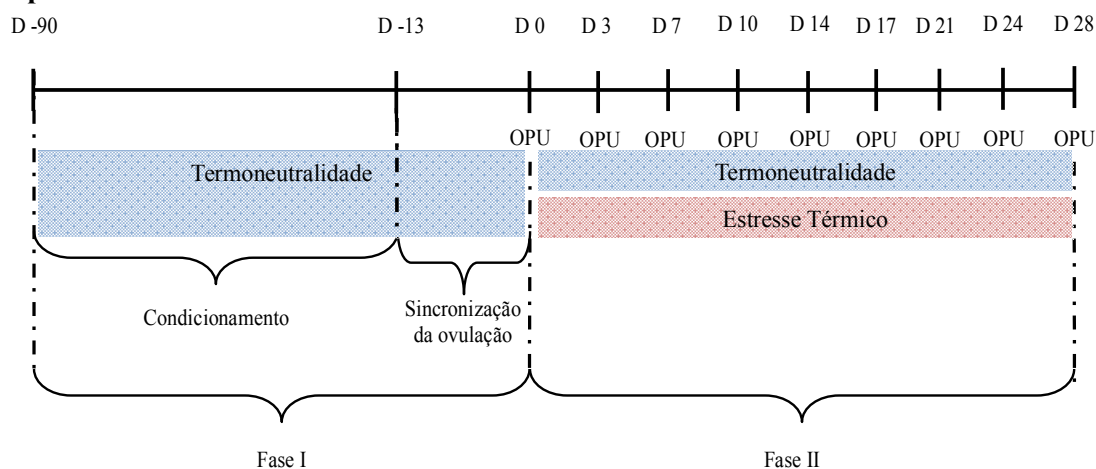
4.3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente experimento teve delineamento fatorial 2 x 2 x 2, visando avaliar os efeitos de 2 sub-espécies (**Bos taurus** e **Bos indicus**), 2 temperaturas

(termoneutralidade e estresse térmico) e 2 tratamentos de IGF-I (0 e 25 ng/mL de IGF-I) por 28 dias.

O experimento foi dividido em 2 fases. A fase I ou período pré-experimental teve duração de 90 dias e consistiu na adaptação e condicionamento dos animais ao curral de manejo (D -90 ao D 0), sincronização da ovulação e definição da temperatura a ser utilizada na câmara climática durante a fase II. Durante a fase I os animais foram mantidos a pasto com acesso a sombra. Na fase II ou período experimental (D 0 ao D 28) os animais das raças Holandesa (N= 6) e Nelore (N=6) previamente sincronizados foram aleatoriamente distribuídos nos tratamentos Termoneutralidade (TN: 3 Holandesas e 3 Nelores) e Estresse Térmico (ET: 3 Holandesas e 3 Nelores) no dia 4 do ciclo estral por um período de 28 dias. Durante este período as fêmeas foram submetidas a 9 sessões de aspiração folicular (OPU) com intervalos de 3 e 4 dias (Figura 14), resultando em 9 réplicas de produção de embriões *in vitro* (PIV).

Figura 14 – Diagrama esquemático das sessões de aspiração folicular nas fases I e II do experimento.



4.3.5 TRATAMENTOS DA FASE II

Os animais das diferentes sub espécies *Bos taurus* e *Bos indicus* foram divididos de maneira aleatória nos grupos Termoneutralidade (TN: controle) e Estresse Térmico (ET) em câmara climática. Os animais foram mantidos em regime de *tie stall* sob as mesmas condições de manejo alimentar, água *ad libitum* tendo somente como variação o tratamento de temperatura e UR.

O grupo TN permaneceu em normotermia, sob sombra, em ambiente aberto e arejado durante todo o período experimental. O grupo ET permaneceu

durante os primeiros 14 dias do período experimental (Fase II) a 37 °C e 70% de umidade relativa (UR) durante o dia e 30 °C e 90% UR durante a noite. Nos últimos 14 dias, visando proporcionar um incremento no estresse térmico diurno, as condições de temperatura e UR aplicadas durante o dia foram 38 °C e 75%. O controle de luz da câmara climática foi realizado em um regime de 12 h de luz incandescente (7:00 às 19:00) e 12 h de escuro (19:00 às 7:00).

4.3.6 CONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS

O condicionamento dos animais consistiu em 3 etapas:

- 1- Passagem livre pelo curral de manejo 2 vezes ao dia associada ao oferecimento de silagem, sendo soltos ao pasto no final do procedimento. Esta etapa teve duração de 4 semanas.
- 2- Nesta etapa as vacas foram presas no tronco de contenção, molhadas e palpadas para acostumarem com contato. Este procedimento durou 4 semanas. Além disso, os animais foram mantidos com cabrestos por 2 semana para se adaptarem ao mesmo.
- 3- Os animais foram amarrados com cordas no curral por períodos crescentes, variando de 15 minutos até 3 h por 3 semanas.

4.3.7 SINCRONIZAÇÃO DAS ONDAS FOLICULARES

Os ciclos estrais foram sincronizados utilizando implantes auriculares de progesterona (P₄: 3 mg de norgestomet - Crestar®, Intervet, Holanda) aplicados no dia D -13 concomitantemente com aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE - Estrogin®). O implante foi retirado no dia D -5 concomitantemente a aplicação de 25 mg de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) (Crestar®, Intervet, Holanda). No dia D -4 foi administrado 1,0 mg de BE e foi observado o cio 2 vezes ao dia (7:00 e 18:00 h) por 30 minutos nos dias D -3, D -2 e D -1. No D 0 foi realizada o primeiro procedimento de aspiração folicular, a fim de sincronizar as ondas foliculares.

4.3.8 PARÂMETROS CLIMÁTICOS

Na fase I do experimento os parâmetros climáticos [temperatura de bulbo seco (TBS) e UR] dos últimos quatro anos (2008 à 2012 – Anexo 3) da estação meteorológica do campus da USP em Pirassununga foram analisados por ano, mês e estação do ano. A estação localiza-se a aproximadamente 1 Km das instalações experimentais. Foram inicialmente calculadas as médias das temperaturas e UR, estes valores foram aplicados para o cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU). O ITU foi utilizado como base na definição das condições de temperatura e UR características de estresse térmico severo (MCDOWELL et al., 1976) a serem mimetizados na câmara climática.

Os parâmetros climáticos TBS e UR foram também coletados da estação meteorológica do campus da USP durante toda fase II do experimento. Além disso foram instalados no interior da câmara climática e no curral de manejo, psicômetros (Datalogger Digital modelo HT-500 - Instrutherm) visando obter parâmetros climáticos referentes ao microclima nestes ambientes. Os psicômetros foram programados para mensurar a TBS e UR a cada 30 minutos e gerar automaticamente os ITU para cada momento.

4.3.9 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Durante as fases I e II do experimento os parâmetros fisiológicos foram avaliados em todos os animais. Na fase I foram aferidas temperaturas retal (TR) e cutânea (TC) em 14 dias aleatórios, sendo sete no período da manhã e sete no período da tarde, aproximadamente às 7:00 e 15:00 h respectivamente, a fim de evitar o estresse excessivo dos animais. A TR foi mesurada com auxílio de termômetro digital clínico inserido via retal e mantendo contato com a mucosa do animal e a TC com auxílio de um termômetro infravermelho digital portátil, da marca Incoterm®, modelo Mult Temp Portátil, com mira a laser.

Na fase II a frequência cardíaca (FC) e TR foram mensurados diariamente às 15:00 h. A FC foi aferida com auxílio de Estetoscópio Veterinário Littmann® Master Classic da 3M® por 15 segundos e o resultado multiplicado por 4. A TR foi aferida com auxílio de termômetro digital clínico inserido via retal e mantendo contato com a mucosa do animal. Estes parâmetros foram aferidos no tronco de

manejo do CBRA, pois devido as limitações de espaço não foi possível realizar a aferição dentro da câmara climática. A frequência respiratória (FR) e TC foram mensurados duas vezes ao dia aproximadamente às 7:00 e 15:00 h. A FR foi aferida pela contagem de movimentos respiratórios no flanco por 15 segundos e o resultado multiplicado por 4. A TC foi mensurada com auxílio de um termômetro infravermelho digital portátil, da marca Incoterm®, modelo Mult Temp Portátil, com mira a laser. A TC final foi resultado da média das medidas aferidas de cada animal em pontos distintos como cabeça, cernelha, virilha e jarretes (TORRES-JÚNIOR et al., 2008).

4.3.10 COLETA DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRASSOM

As aspirações foliculares (OPU) foram realizadas pelo médico veterinário e mestre Marcio Leão Ferraz.

4.3.10.1 MONTAGEM DOS EQUIPAMENTOS E PREPARO DOS MEIOS DE ASPIRAÇÃO

As sessões de OPU foram realizadas com aparelho portátil de ultrassom (Aloka® SSD 500 – Aloka Co., LTD, Tóquio, Japão) equipado com transdutor endocavitário microconvexo de 5,0 MHz. Este aparelho foi adaptado a uma guia de biópsia para aspiração folicular conectado a agulha descartável de 18G e linha de aspiração de teflon de 1,7 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento (WTA Ltda, Cravinhos, São Paulo, Brasil) conectadas a um tubo cônico de 50 mL para coleta dos oócitos. O sistema de aspiração foi acoplado à bomba de vácuo (V-MAR 5000 – Cook Austrália, Queensland, Austrália) portátil, calibrada e regulada com pressão negativa de 68 mmHg (12 a 15 mL de água/minuto; KRUIP et al., 1994).

A montagem do transdutor foi realizada segundo instruções do fabricante e a agulha inserida no mandril de forma asséptica para evitar contaminação. Na montagem dos equipamentos envolvidos na OPU, manteve-se rigorosa assepsia, principalmente com as partes que entravam em contato direto com o material aspirado ou com as mucosas das doadoras.

O meio de aspiração utilizado para lubrificação e lavagem do sistema de OPU e para o recebimento dos oócitos no tubo de coleta foi preparado com 1,0 L de

solução salina 0,9%, acrescido de 5000 UI de heparina sódica (5,0 UI/mL), 100 unidades/mL de penicilina-G, 100 µg/mL de estreptomicina e 1% de soro fetal bovino (SFB), mantidos a aproximadamente 37 °C.

4.3.11 PREPARO DOS ANIMAIS

4.3.11.1 CONTENÇÃO FÍSICA

Os animais dos grupos experimentais foram soltos um a um, formando grupos de 3 animais separados segundo o tratamento e a subespécie. As vacas foram levadas pelo cabresto até a seringa do brete, onde foram tocadas calmamente, respeitando o manejo racional para evitar estresses adicionais. Para a aspiração foi realizado o revezamento entre os grupos de 3 animais evitando que o mesmo grupo sempre começasse a sessão de aspiração.

4.3.11.2 ANESTESIA

Após a contenção física do animal no tronco de manejo do CBRA, foi realizada anestesia epidural baixa entre a última vértebra coccígea e a primeira vértebra caudal, com 2,0 a 5,0 mL de cloridrato de lidocaína 2%, sem vasoconstritor (KRUIP et al., 1994). Esta dosagem variou conforme a subespécie, o tamanho, a sensibilidade individual e estado geral de cada vaca.

4.3.11.3 HIGIENIZAÇÃO DA DOADORA

Durante a contenção física dos animais, uma mangueira de água foi passada por cima do tronco, facilitando o acesso a água e evitando que esta entrasse em contato com o chão e com fezes. Após a perda dos reflexos caudais, a cauda da vaca foi amarrada e procedeu-se a remoção manual de fezes da ampola retal e higienização mecânica da região perineal, com água. A vulva e o vestíbulo vaginal também foram cuidadosamente higienizados, tomando-se o cuidado de não jogar água dentro da vagina.

4.3.11.4 ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Após anestesia e higienização da doadora, o braço esquerdo do operador foi mantido posicionado no reto do animal evitando assim a entrada de ar na ampola retal, o que dificultaria a realização da OPU. Pela técnica de manipulação transretal, o ovário foi escaneado pelo transdutor na face abdominal da parede da vagina, de forma que os folículos a serem aspirados ficassem no percurso da agulha, indicado na tela do ultrassom pela linha de biópsia ou linha de punção (*punction line*).

Antes do início da OPU, foi realizado o mapeamento do ovário evitando perfurações desnecessárias, otimizando o procedimento e preservando os ovários da doadora. Seguiu-se a aspiração transpassando-se a agulha através da parede do fundo de saco vaginal ao mesmo tempo em que foi acionada a pressão negativa de vácuo por um pedal e o folículo foi aspirado (NIBART et al., 1995). Desta forma, foram aspirados todos os folículos visíveis (com diâmetro $\geq 1,0$ mm) e acessíveis de cada ovário.

Ao término da OPU de cada animal o tubo contendo o líquido aspirado foi trocado, identificado com a ordem da aspiração e o número da doadora. Em seguida o material coletado foi levado até o Laboratório de Tecnologia de Embriões do VRA - USP, onde foi realizado a lavagem do conteúdo aspirado, seguido da seleção e lavagem dos complexos cumulus-oócito (CCOs). Em seguida os CCOs foram transferidos para microtubos contendo 250 μ L de meio MIV modificado submerso em 50 μ L de óleo mineral estéril.

4.3.12 MANIPULAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS OÓCITOS ASPIRADOS

O tubo com o conteúdo aspirado foi transferido para filtro de coleta de embriões (WTA – Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, São Paulo, Brasil) e lavado com meio de aspiração (solução salina 0,9%, acrescido de 5,0 UI/mL de heparina sódica, 100 unidades/mL de penicilina-G, 100 μ g/mL de estreptomicina e 1% de SFB) até se obter um líquido translúcido com cerca de 1,0 cm de altura e com um sedimento contendo os CCOs recuperados. Em seguida, o conteúdo do filtro foi vertido em placas de Petri e lavado com meio de aspiração aquecido a 38,5 °C para recuperação dos CCOs que foram classificados sob esteriomicroscópio.

4.3.121 AVALIAÇÃO DOS CCOS

Os critérios considerados para a avaliação morfológica dos CCOs foram a presença, o número de camadas e o grau de expansão das células do cumulus, bem como o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade como descrito por De Loos e colaboradores (1991), sendo assim CCOs grau I: três camadas ou mais de células do cumulus compactas e o citoplasma do oócito escuro e homogêneo; CCOs grau II: três camadas ou mais de células do cumulus compactas e o citoplasma do oócito podendo ter pequenas irregularidade, porém na sua maioria permanecendo escuro e homogêneo; CCOs grau III: menos de três camadas de células do cumulus compactas, e o citoplasma do oócito podendo ter irregularidades, porém mais da metade permanecendo escuro e homogêneo; CCOs grau IV: ausência parcial ou total da camada de células do cumulus, zona pelúcida rompida ou não, os oócitos apresentando na maior parte citoplasma ou em sua totalidade vacúolos ou sua desintegração, apresentando sinais evidentes de degeneração.

Os CCOs grau I a IV foram utilizados e aproveitados para FIV. Os CCOs grau III e IV não foram descartados a fim de não mascarar o efeito experimental de temperatura aplicado nos animais.

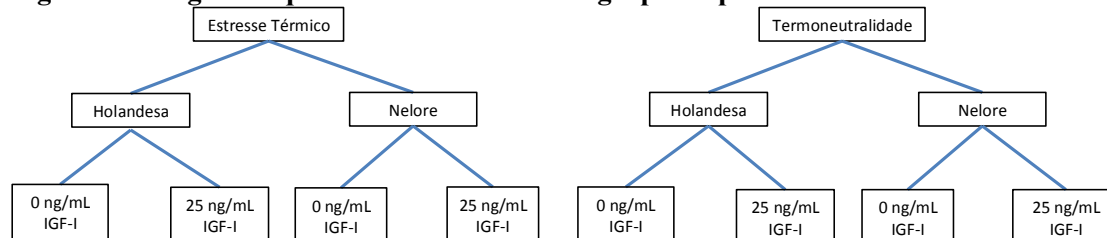
4.3.12.2 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Os CCOs aspirados em cada sessão de OPU foram agrupados de acordo com os tratamentos específicos, lavado 3 vezes em gotas de 70 µL de Meio Pré-MIV (TCM-199 HEPES contendo 3 mg/mL de BSA – livre de ácidos graxos, 50 µg/mL de gentamicina e 0,2 mM de piruvato de sódio), lavados 2 vezes em gota de 70 µL de Meio MIV (TCM-199 bicarbonato suplementado com 6 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 1 µg/mL de estradiol, 10 µg/mL de FSH e 10 µg/mL de LH) e transferidos para microtubos contendo 250 µL de meio MIV na presença (25 ng/mL IGF-I) ou ausência (0 ng/mL IGF-I) de IGF-I (Figura 15) coberto com óleo mineral estéril.

A produção **in vitro** (PIV) de embriões foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da UNIFESP no município de Diadema, localizada a aproximadamente 3 h de Pirassununga. Desta maneira foi utilizada uma estufa de transporte de embriões da

Minitube®, na qual os CCOs foram transportados nos microtubos contendo meio MIV coberto com óleo mineral à 38,5 °C. Foram realizadas nove sessões de PIV, entretanto as réplicas 1, 2 e 7 foram descartadas do experimento devido a problemas relacionados ao baixo desenvolvimento a blastocisto ou contaminação experimental.

Figura 15 – Figura esquemática dos diferentes grupos experimentais durante a MIV.



4.3.12.3 MATURAÇÃO *IN VITRO*

O tempo de maturação *in vitro* teve início durante o transporte dos CCOs de Pirassununga para Diadema (231 Km, aproximadamente 2 à 3 horas) . No Laboratório de Biologia eular da UNIFESP grupos de 3 a 5 CCOs foram transferidos para gotas de 25 µL de Meio MIV quimicamente semidefinido (TCM-199 bicarbonato suplementado com 6 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 1 µg/mL de estradiol, 10 µg/mL de FSH e 10 µg/mL de LH) contendo 0 ou 25 ng/ml IGF-I sob óleo mineral em atmosfera de alta umidade, com 5% de CO₂ e 38,5 °C por 22-24 h.

4.3.12.4 FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Os meios de cultura TALP (*Tyrodéâs albumin-lactate-pyruvate*) utilizados para purificação do sêmen e fecundação foram preparados segundo PARRISH e colaboradores (1988). Após as 22-24 h de maturação, os CCOs foram lavados uma vez em meio Pré FIV (solução TALP contendo 6 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio). Em seguida, grupos de 5 CCOs foram transferidos para gotas de 90 µL de meio de fecundação FIV (solução TALP com 6 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 17.500 USP/mL de heparina e 0,044 µL/mL de PHE (penicilamina 2 µM, hipotaurina 1 µM, epinefrina 0,25 µM). Uma palheta de sêmen de cada sub espécie (*Bos taurus* e *Bos indicus*) foi descongelada

durante 30 segundos à 37 °C e purificados em gradiente de Percoll (Percoll 90% e Percoll 45%) pela centrifugação a 9.000 g por 5 minutos. Em seguida, o **pellet** contendo os espermatozoides viáveis foi lavado por centrifugação em meio FIV à 9.000 g por 2,5 minutos. Os espermatozoides viáveis obtidos do sedimento após a centrifugação foram submetidos à avaliação de motilidade (lâmina e lamínula aquecidas) e a concentração foi estabelecida em câmara de Neubauer. Os oócitos foram fecundados com 1×10^6 espermatozoides/mL de maneira espécie específica por 18 h.

4.3.2.5 CULTIVO IN VITRO

Passadas as oito horas destinadas à fecundação, grupos de 5 possíveis zigotos foram transferidos para gotas de 15 µL de meio de cultura para embrião (KSOM contendo 10% de SFB, 10 mg/mL de gentamicina e 5 µL/mL de aminoácidos não essenciais 100x) sob óleo mineral, a 38,5 °C em 5% de CO₂. A porcentagem de clivagem foi determinada no dia 3 e a porcentagem de embriões que desenvolveram até o estágio de blastocisto foi determinada nos dias 7, 8 e 9 após a fecundação.

4.3.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram previamente avaliados quanto às premissas para análise de variância (homogeneidade das variáveis e normalidade dos resíduos) utilizando o aplicativo GUIDED DATA ANALYSIS do pacote estatístico SAS® (SAS, 1989). As variáveis que não atenderam às premissas da análise de variância foram inicialmente submetidas às transformações estatísticas (logaritmo na base 10 – Log₁₀ X; Raiz quadrada – RQ X; e arco-seno). Os dados não paramétricos (oócito grau III) foram avaliados pelos testes Kruskal-Wallis e Wilcoxon. As medianas foram obtidas utilizando o procedimento PROC MEANS do pacote estatístico SAS. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância pelo método dos quadrados mínimos para medidas repetidas no tempo utilizando o procedimento PROC GLM e PROC MIXED do pacote estatístico SAS. O efeito de vaca incluso dentro de raça (**nested**) foi considerado como fator aleatório e os demais efeitos principais foram considerados fixos. As variáveis dependentes foram TR, TC, FR e FC, número total de oócitos, porcentagem de oócitos aspirados grau I a IV, porcentagem de clivagem, porcentagem de blastocisto total. Para os parâmetros climáticos, parâmetros

fisiológicos e dados de oócitos as variáveis independentes foram tratamento (TN e ET), vaca, e raça (Nelore e Holandesa). Para os dados de clivagem e blastocisto as variáveis independentes foram tratamento (TN e ET), raça (Nelore e Holandesa), e IGF-I (0 e 25 ng/mL) não sendo possível avaliar como medidas repetidas no tempo. O modelo estatístico considerou os efeitos principais e todas as interações. Foi utilizado o procedimento pdiff para estabelecer as comparações significativas entre médias. O nível de significância de 5% ou menor que 0,05 foi indicativo de diferenças estatísticas entre as variáveis independente para uma determinada variável resposta. Para nível de significância entre 0,05 e 0,1 considerou-se tendência estatística entre as variáveis comparadas.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 FASE I

Durante a Fase I ou período pré-experimental todos os animais foram mantidos em termoneutralidade. Os parâmetros climáticos e fisiológicos foram aferidos para caracterização desta condição ambiental.

4.4.1.1 PARÂMETROS CLIMÁTICOS – FASE I

Durante a fase I a TBS variou entre $15 \pm 0,43$ °C à $25 \pm 0,43$ °C, sendo $22 \pm 0,30$ °C a média do período (Figura 16). A UR manteve-se entre $55 \pm 1,43\%$ à $90 \pm 1,00\%$, sendo $69 \pm 0,30\%$ a média do período (Figura 17). A partir dos dados obtidos de TBS e UR, calculou-se o ITU que variou de $57 \pm 0,50$ à $76 \pm 0,50$, sendo $68 \pm 0,44$ a média do período (Figura 18). Segundo a classificação de ARMSTRONG (1994) estes ITUs indicam que os animais permaneceram na de ausência de estresse térmico ao longo da fase I, alterando esta condição para estresse ameno somente dos dias 70 à 79.

Figura 16: Temperatura do bulbo seco das condições ambientais de Termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.

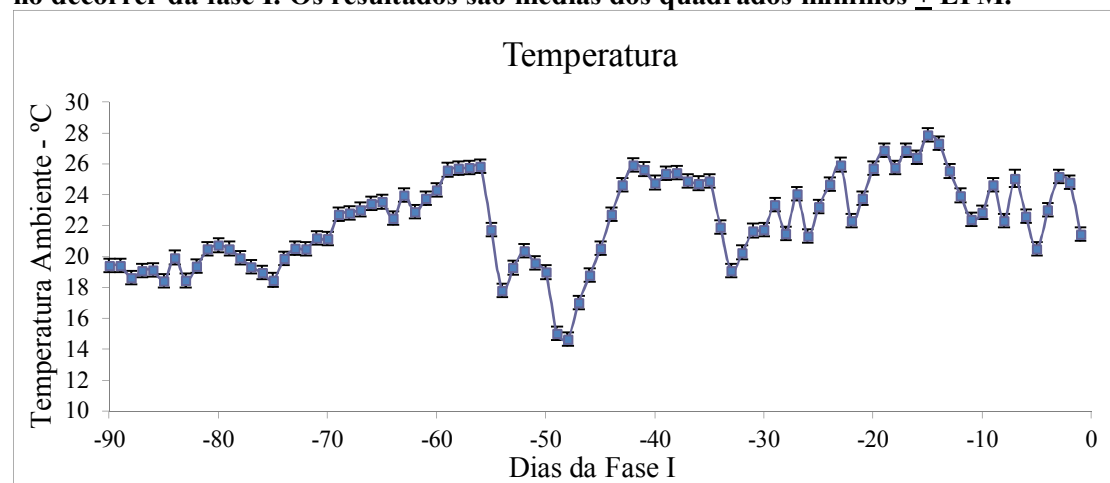


Figura 17: Umidade relativa do ar das condições ambientais de Termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.

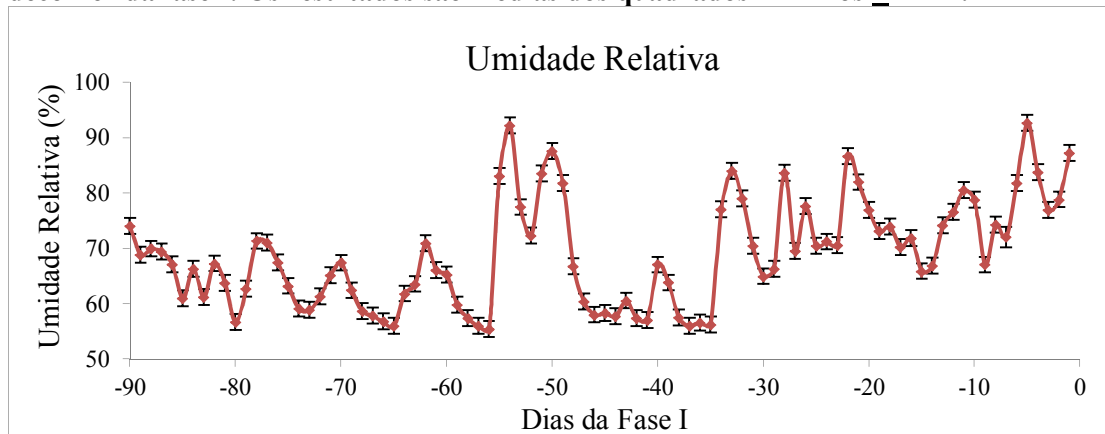
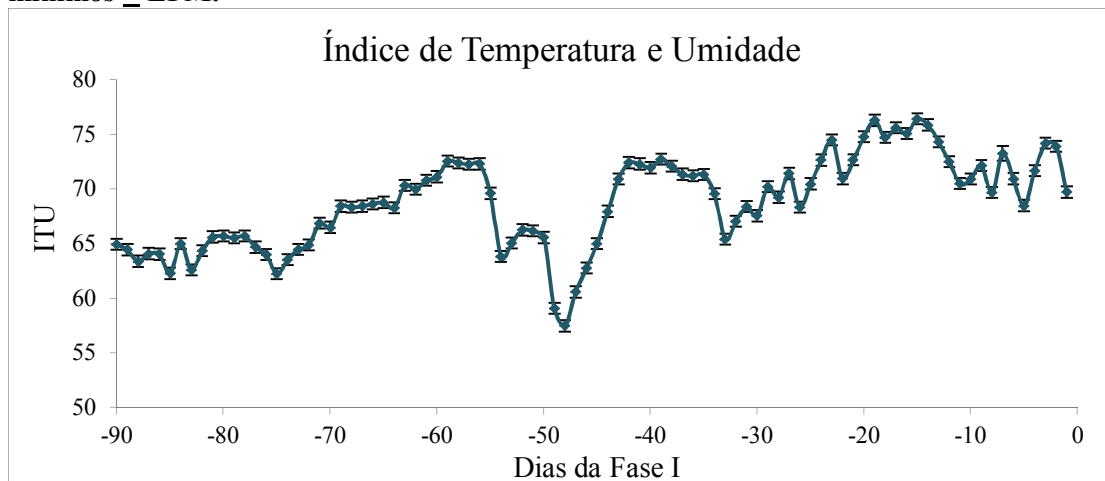


Figura 18: Índice de temperatura e umidade das condições ambientais de Termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.



4.4.1.2 TEMPERATURA RETAL – FASE I

A TR ($38,72 \pm 0,043$ e $38,81 \pm 0,042$ °C para as vacas Holandesas e Nelores, respectivamente) não diferiu entre raças durante a fase I. No entanto a TR das vacas Nelores foi mais elevada nas mensurações 2 e 5 e das vacas Holandesas somente na mensuração 1 como demonstrado na Figura 19. A TR foi mais elevada ($p < 0,05$) no período da tarde, independente da raça ($38,59 \pm 0,036$ e $38,94 \pm 0,035$ °C para manhã e tarde respectivamente - Figura 20).

Figura 19: Temperatura retal em vacas Holandesas e Nelores expostas a condição ambiental de Termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

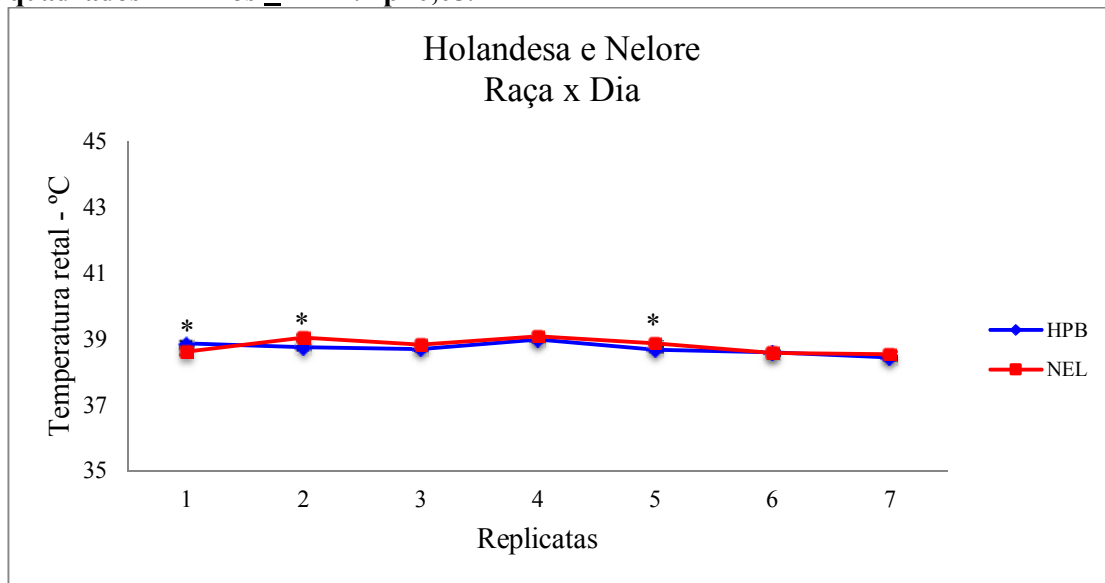
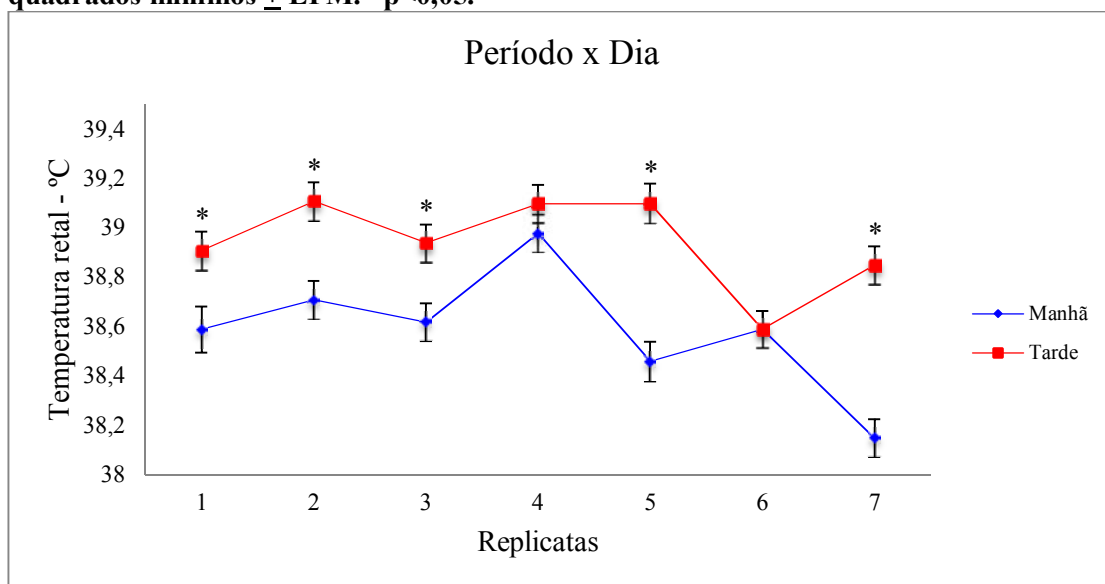


Figura 20: Temperatura retal em vacas Holandesas e Nelores expostas a condição ambiental de Termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.



4.4.1.3 TEMPERATURA CUTÂNEA – FASE I

A TC aumentou ($p < 0,05$) de $31,20 \pm 0,12$ °C nas vacas Nelores para $31,93 \pm 0,12$ °C nas vacas Holandesas (Figura 21). Foi também observado efeito de período na TC, sendo esta mais elevada no período da tarde ($29,81 \pm 0,11$ e $33,32 \pm 0,10$ °C para os períodos da manhã e da tarde respectivamente; Figura 22).

Figura 21: Temperatura cutânea em vacas Holandesas e Nelores expostas a condição ambiental de Termoneutralidade no decorrer da fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

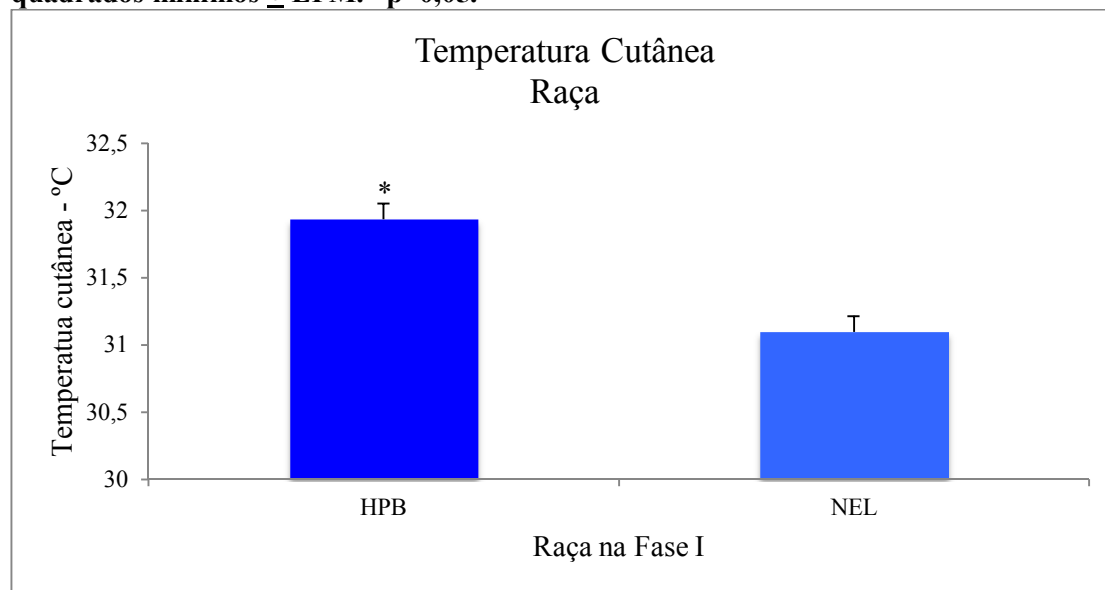
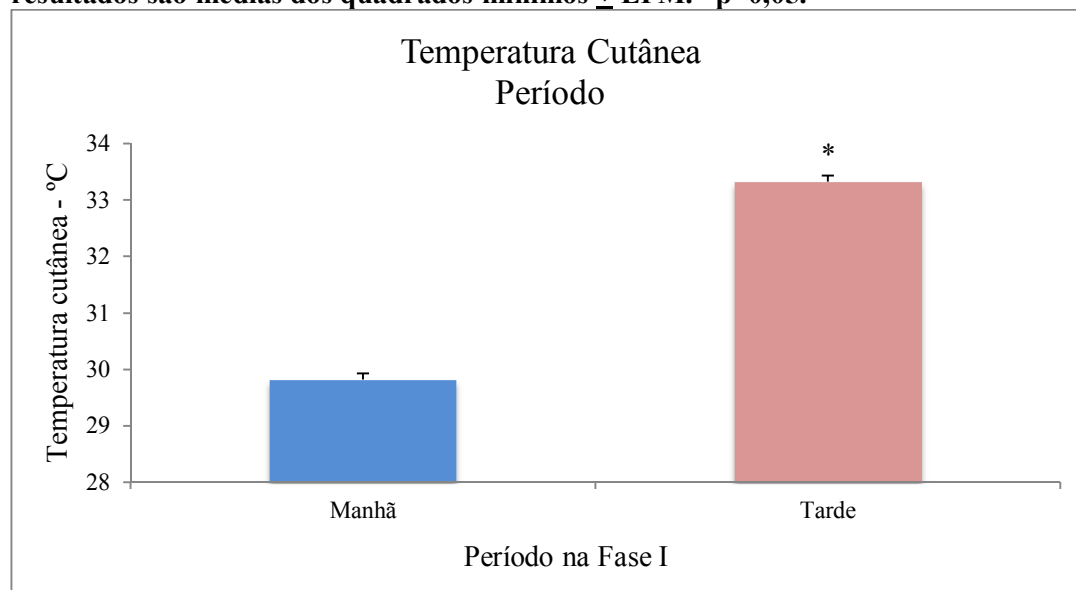


Figura 22: Temperatura cutânea em vacas Holandesas e Nelores expostas a condição ambiental de Termoneutralidade nos períodos da manhã e da tarde na fase I. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.



4.4.2 FASE II

4.4.2.1 PARÂMETROS CLIMÁTICOS

Os parâmetros climáticos TBS (Figura 23) e UR (Figura 24) foram mensurados com psicômetros digitais durante a Fase II do experimento e utilizados para o cálculo do ITU (Figura 25) no ambiente TN e ET da câmara climática. A TBS no grupo TN manteve-se entre $21,87 \pm 1,19$ °C e $29,21 \pm 0,72$ °C, sendo $25,68 \pm 0,39$ °C a média do período (Figura 23); no grupo ET a TBS variou de $26,05 \pm 0,29$ °C à $31,11 \pm 0,29$ °C, sendo $28,50 \pm 0,24$ °C a média do período (Figura 23). A UR no grupo TN manteve-se entre $54,52 \pm 2,25\%$ e $82,79 \pm 2,25\%$, sendo $69,36 \pm 1,44\%$ a média do período (Figura 24); no grupo ET a UR manteve-se entre $84,43 \pm 0,84\%$ e $96,97 \pm 0,84\%$, sendo $93,96 \pm 0,49\%$ a média do período (Figura 24). O ITU no grupo TN variou de $69,09 \pm 0,8$ à $79,29 \pm 0,8$, sendo $74,00 \pm 0,53$ a média do período (Figura 25); no grupo ET o ITU manteve-se entre $78,27 \pm 0,46$ e $87,05 \pm 0,46$, sendo $82,39 \pm 0,42$ a média do período (Figura 25). Segundo a classificação de ARMSTRONG (1994) os animais do grupo TN permaneceram a maior parte do período experimental sob uma condição que variou de ausência de estresse a estresse ameno, enquanto que os animais do grupo ET permaneceram em condições de estresse térmico durante todo o período.

Figura 23: Temperatura do bulbo seco das condições ambientais de Termoneutralidade e de Estresse Térmico no decorrer dos dias da fase II. Os resultados são médias dos quadrados mínimos + EPM.

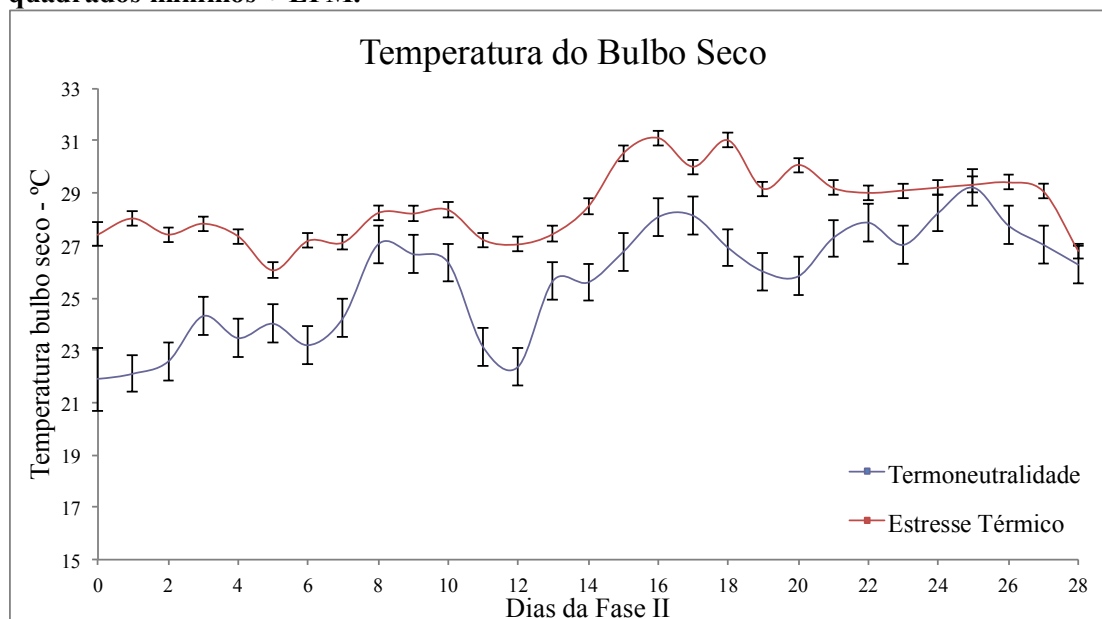


Figura 24: Umidade Relativa das condições ambientais de Termoneutralidade e de Estresse Térmico no decorrer dos dias da fase II. Os resultados são médias dos quadrados mínimos + EPM.

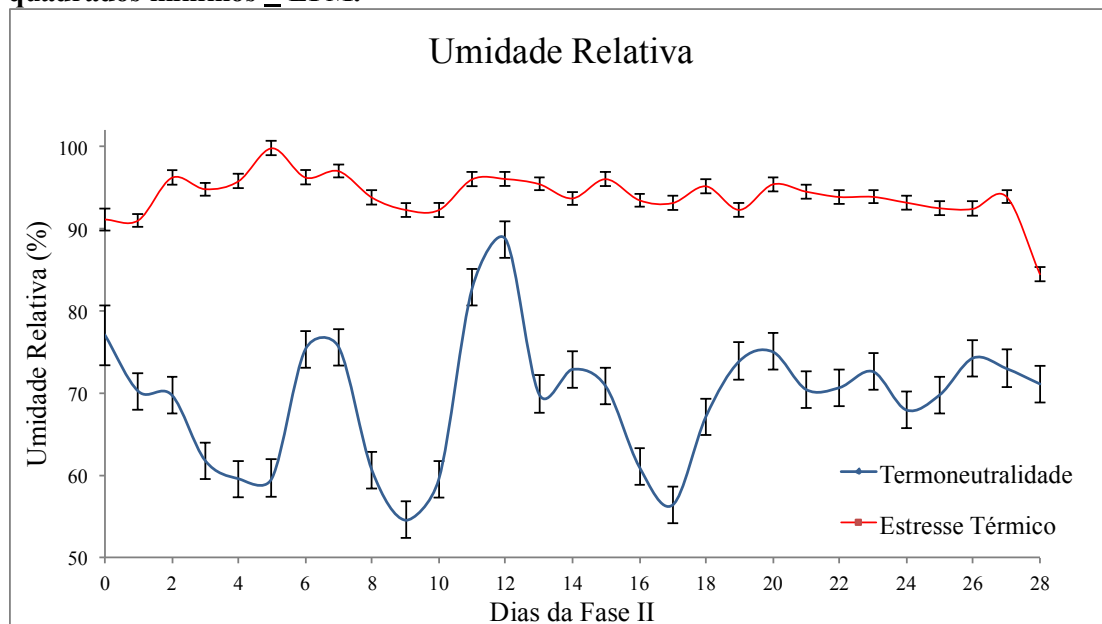
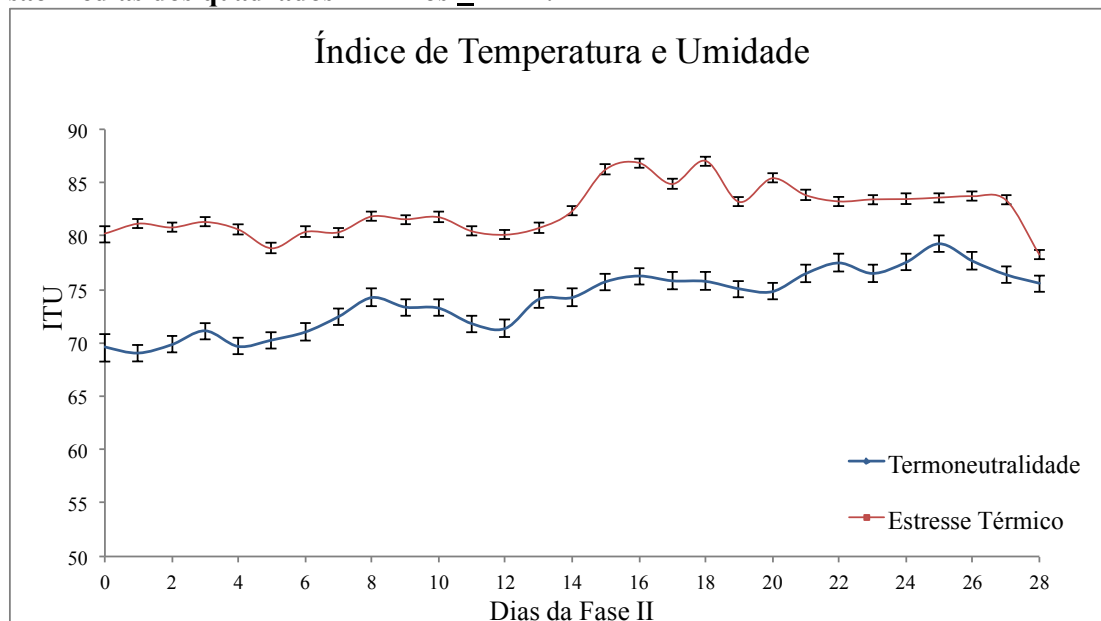


Figura 25: Índice de temperatura e umidade das condições ambientais de Termoneutralidade e de Estresse Térmico no decorrer dos dias da fase II. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.



4.4.2.2 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

A Tabela 4 apresenta o nível de significância referente aos parâmetros fisiológicos temperatura cutânea (TC) e frequência respiratória (FR) medidos nos períodos da manhã (M) e tarde (T), temperatura retal (TR) e frequência cardíaca (FC) medidos no período da tarde (T) nos animais das raças Holandesa e Nelore expostos aos tratamentos TN e ET durante a Fase II do experimento.

Tabela 4 – Nível de significância para os parâmetros fisiológicos (valores de p).

	TR	FR M	FR T	TC M	TC T	FC
Raça	0,0413	<0,0001	<0,0001	0,4949	0,1887	0,0327
Tratamento (Trat)	0,0018	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0007
Vaca (raça)	0,0261	>1	>1	0,1761	0,0291	>1
Dia	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0116	<0,0001
Raça x Trat	0,0287	<0,0001	0,0064	0,0027	0,5338	0,7992
Raça x Dia	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,4426	0,0006
Trat x Dia	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0018	<0,0001
Raça x Trat x Dia	0,0012	<0,0001	0,062	<0,0001	0,317	0,201

4.4.2.2.1 TEMPERATURA RETAL

O estresse térmico animal pode ser caracterizado pelo aumento da TR, sendo este parâmetro o principal indicador de que o animal está em hipertermia.

A exposição de vacas Holandesas ao estresse térmico controlado em câmara climática por 28 dias aumentou ($p < 0,05$; Tabela 4) a TR de $39,05 \pm 0,10$ °C no grupo TN para $39,52 \pm 0,10$ °C no grupo ET. O aumento de TR em vacas Holandesas submetidas ao tratamento de ET foi primeiramente observado no dia 10 ($p < 0,05$) após o início do tratamento e permaneceu de forma consistente do dia 14 até o dia 27 do período experimental ($p < 0,05$; Figura 26 e 28). Em contraste, não houve diferença de TR (Tabela 4) em vacas da raça Nelore submetidas as mesmas condições de tratamento ($39,04 \pm 0,14$ e $39,18 \pm 0,18$ °C para os tratamentos TN e ET, respectivamente) (Figura 27). A TR das Nelores não foi afetada pela variável dia.

Figura 26: Temperatura retal em vacas Holandesas expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

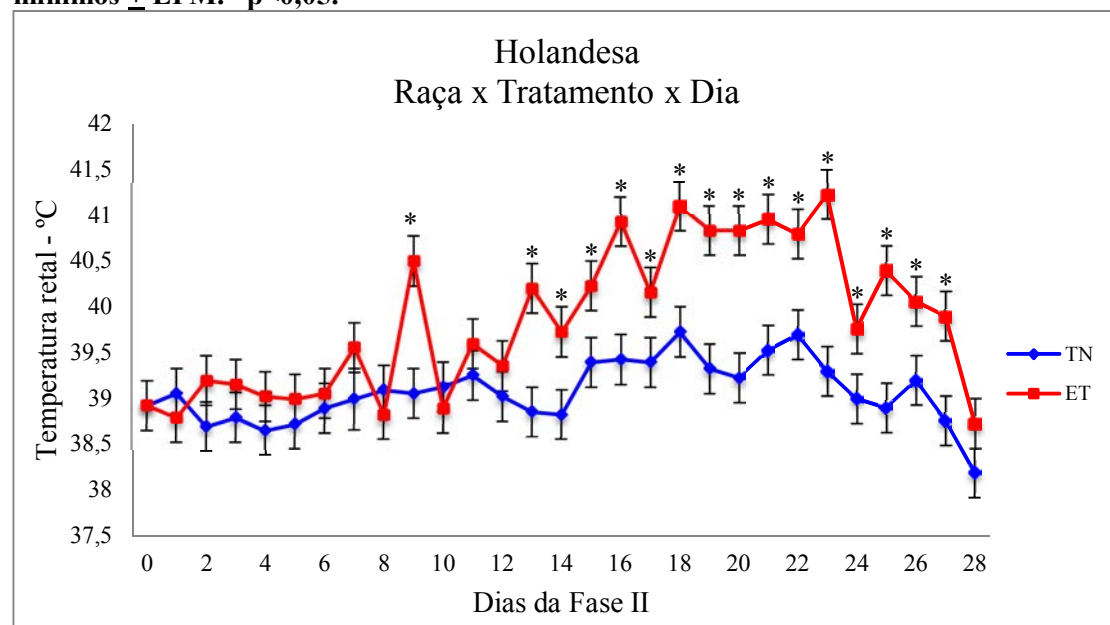


Figura 27: Temperatura retal em vacas Nelores expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos.

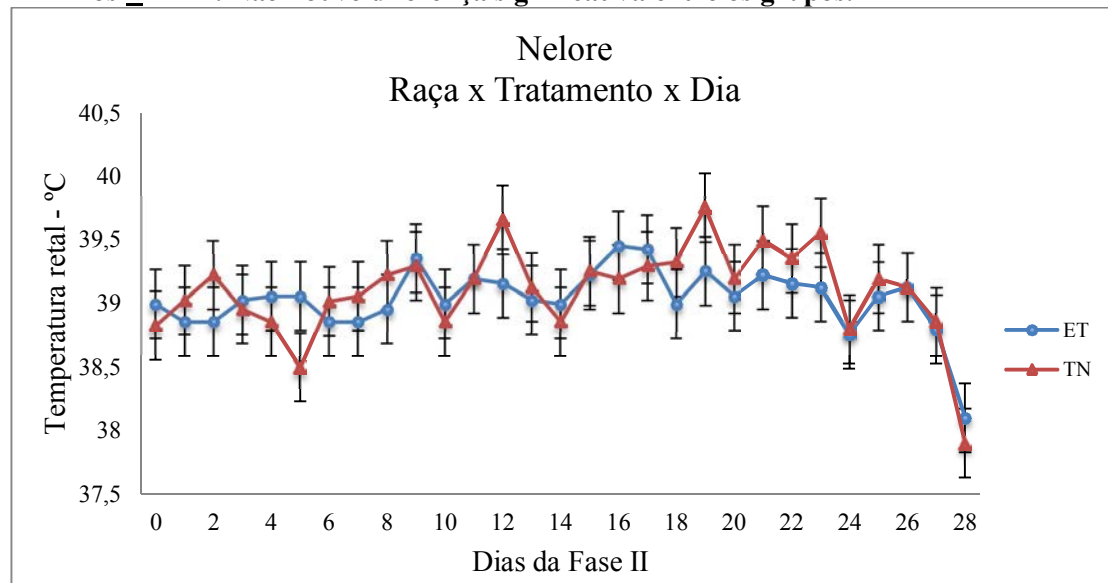
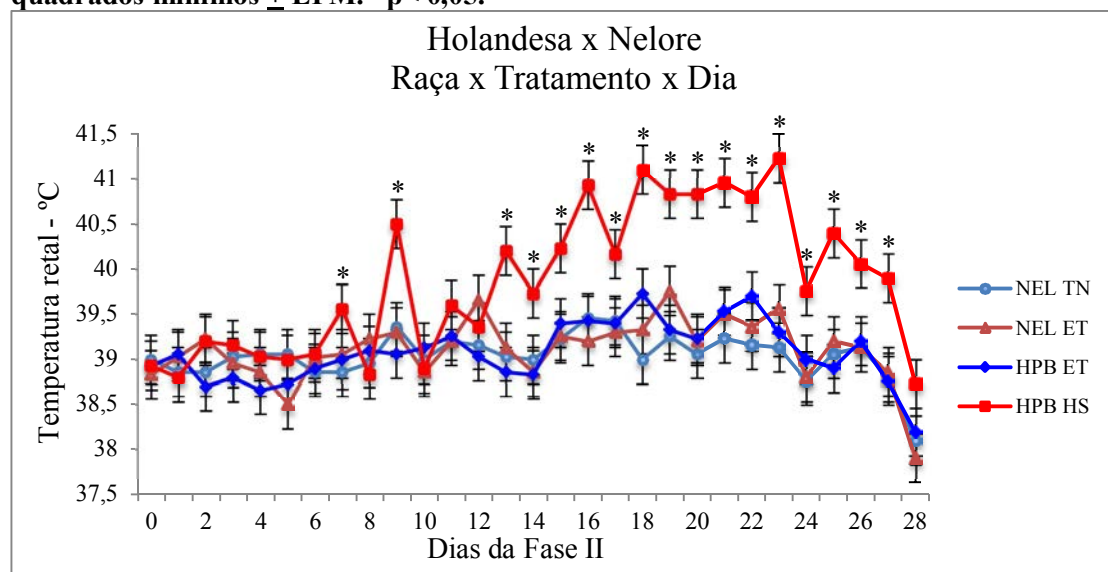


Figura 28: Temperatura retal em vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.



4.4.2.2 FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA

O aumento da FR representa um importante mecanismo de termoregulação ativado pelo animal a fim de manter a temperatura corporal constante. O padrão de aumento da FR nos diferentes tratamentos foi similar entre os períodos da manhã e tarde, sendo apresentado apenas os dados referentes ao período da manhã.

A exposição de vacas Holandesas ao ET controlado em câmara climática por 28 dias aumentou ($p < 0,0001$; Tabela 4) a FR de $27,66 \pm 1,04$ mpm no grupo TN para $62,24 \pm 1,04$ mpm no grupo ET. O aumento da FR em vacas Holandesas submetidas ao tratamento de ET foi observado do dia 1 até o dia 28 do período experimental ($p < 0,0001$; Figura 29), sendo a FR das vacas Holandesas ET mais elevada do que a FR de todos os demais tratamentos (Figura 32). De maneira similar, a FR das vacas Nelores aumentou ($p < 0,05$; Tabela 4) de $21,23 \pm 1,47$ mpm no grupo TN para $37,38 \pm 1,47$ mpm no grupo ET. O aumento de FR em vacas Nelores submetidas ao tratamento de ET foi observado desde o dia 12 até o dia 28 do período experimental ($p < 0,05$; Figura 30). O grupo Nelore TN teve a FR consistentemente inferior ($p < 0,05$) aos demais tratamentos a partir do dia 14 do período experimental (Figura 31). Apesar do aumento da FR ter sido observado tanto nas vacas Holandesa e Nelores submetidas ao ET em câmara climática, a magnitude deste aumento ($62,24 \pm 1,47$ e $37,38 \pm 1,47$ mpm) foi mais acentuado para vacas Holandesas do que Nelores respectivamente.

Figura 29: Frequência respiratória mensurada no período da manhã em vacas Holandesas expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

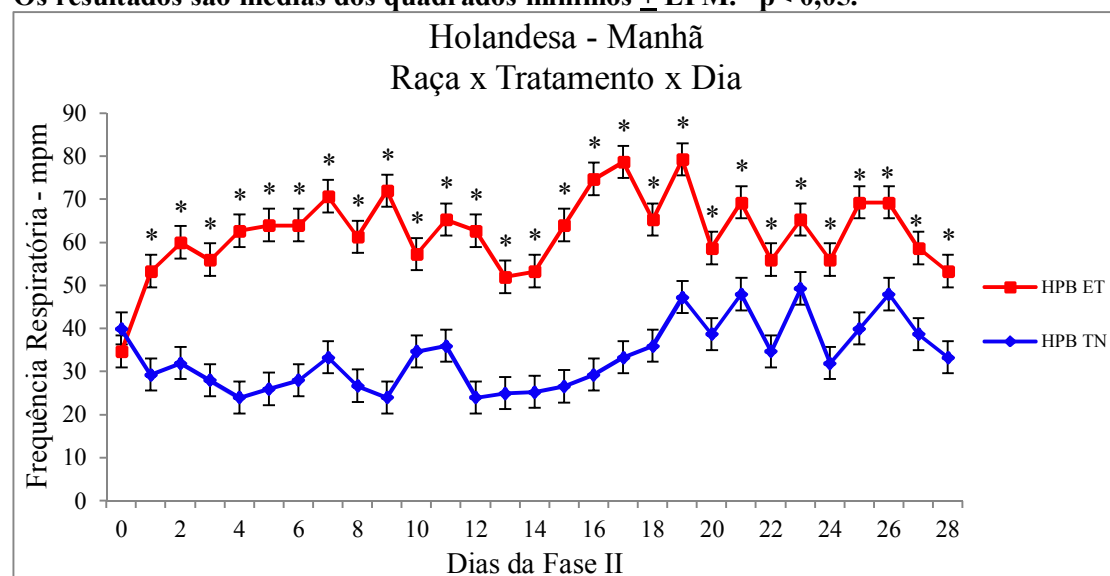


Figura 30: Frequência respiratória mensurada no período da manhã em vacas Nelore expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

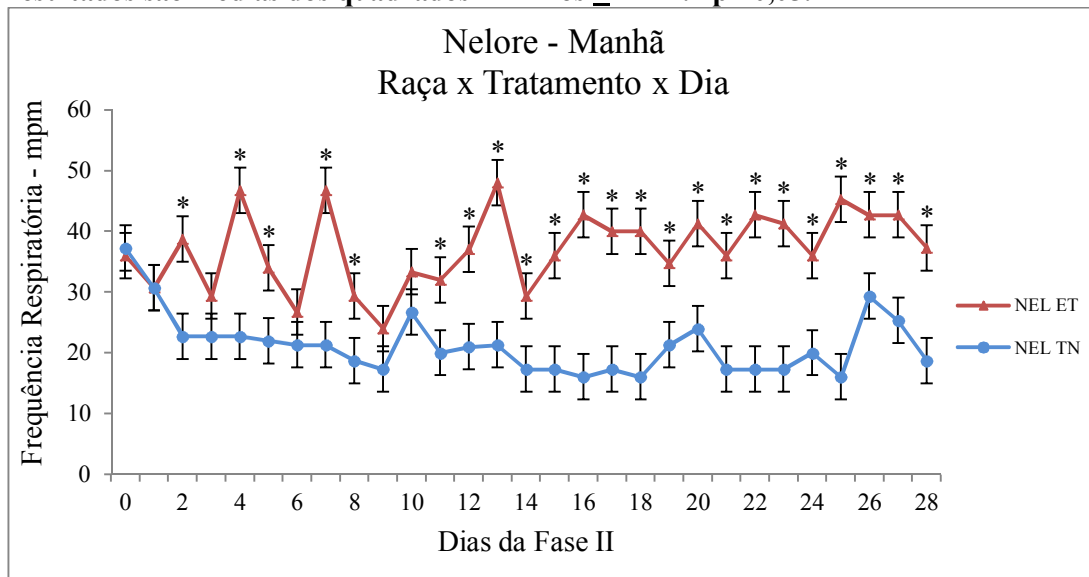
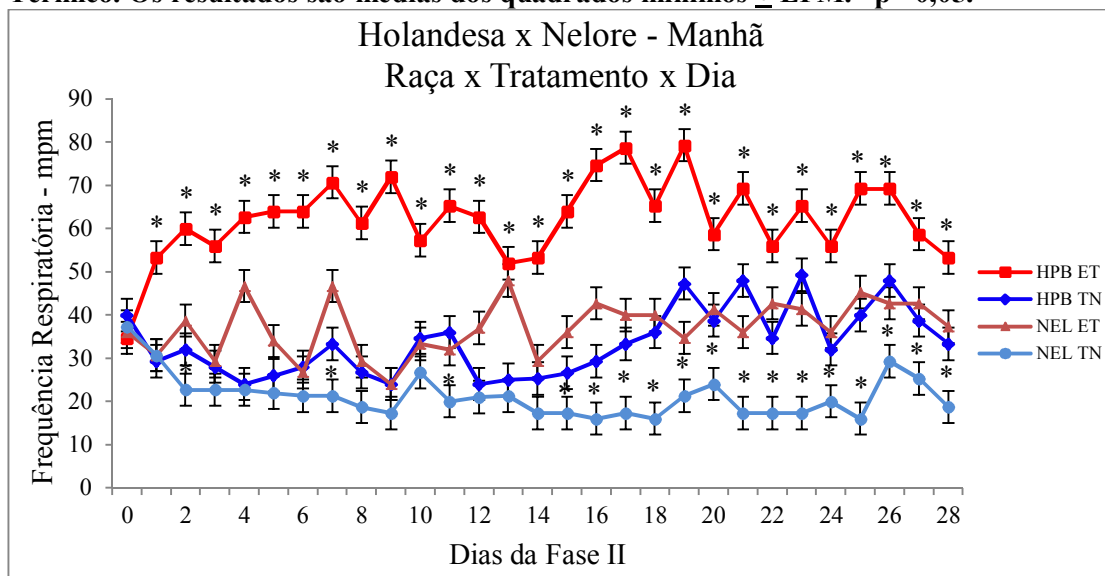


Figura 31: Frequência respiratória mensurada no período da manhã em vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.



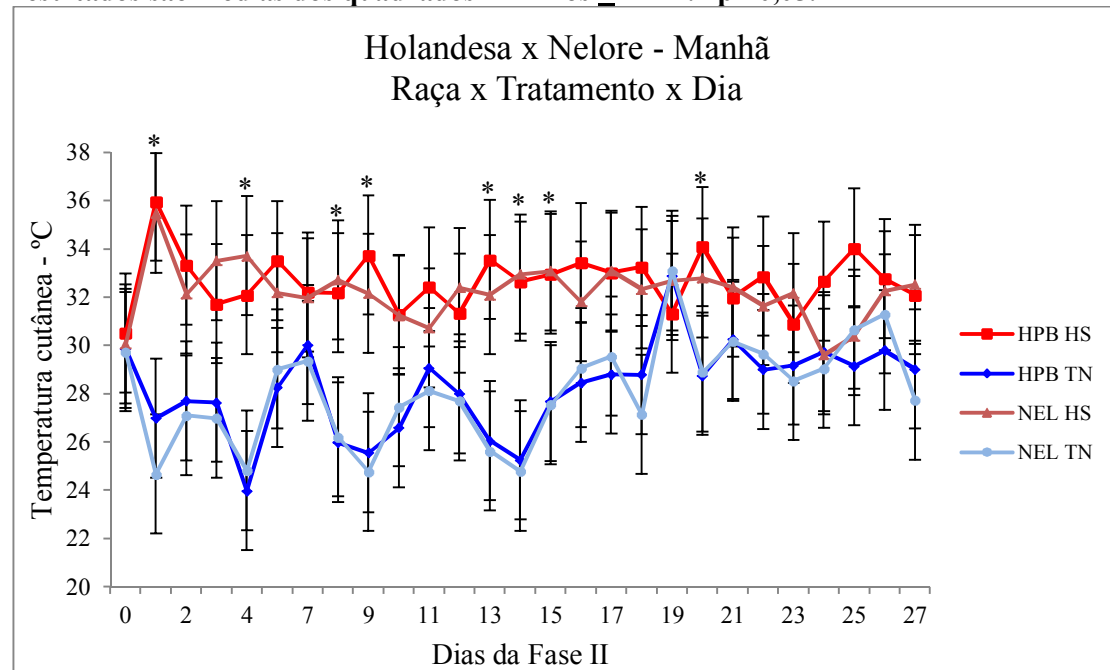
4.4.2.2.3 TEMPERATURA CUTÂNEA

A pele em bovinos tem papel importante na termorregulação corporal quando o animal é exposto a altas temperaturas.

A exposição de vacas Holandesas ao ET controlado em câmara climática por 28 dias aumentou ($p < 0,05$; Tabela 4) a TC M de $29,20 \pm 0,53$ °C no grupo TN para $32,67 \pm 0,53$ °C no grupo ET. O aumento da TC M em vacas Holandesas

submetidas ao tratamento de ET foi observado desde o dia 1 até o dia 28 do período experimental ($p < 0,05$; Figura 32), sendo a TC das vacas de ambas raças submetidas ET mais elevada do que a TC do tratamento TN (Figura 32). Já no período da tarde a TC dos animais do grupo TN foi semelhante aos animais do grupo ET.

Figura 32: Temperatura cutânea mensurada no período da manhã em vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. $*p < 0,05$.



4.4.2.2.4 FREQUÊNCIA CARDÍACA

A FC aumentou ($p < 0,05$; Tabela 4) de $62,74 \pm 2,38$ bpm no grupo TN para $74,36 \pm 2,38$ bpm no grupo ET. De maneira similar, a FC aumentou ($p < 0,05$; Tabela 4) de $64,20 \pm 2,38$ bpm nas vacas Holandesas para $72,90 \pm 2,38$ bpm nas vacas Nelores. O aumento de FC em vacas Holandesas submetidas ao tratamento de ET foi observado desde o dia 11 até o dia 20 do período experimental ($p < 0,05$; Figura 33). O aumento de FC em vacas Nelores submetidas ao tratamento de ET foi observado desde o dia 11 até o dia 16 do período experimental ($p < 0,05$; Figura 34).

Figura 33: Frequência cardíaca em vacas Holandesas expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

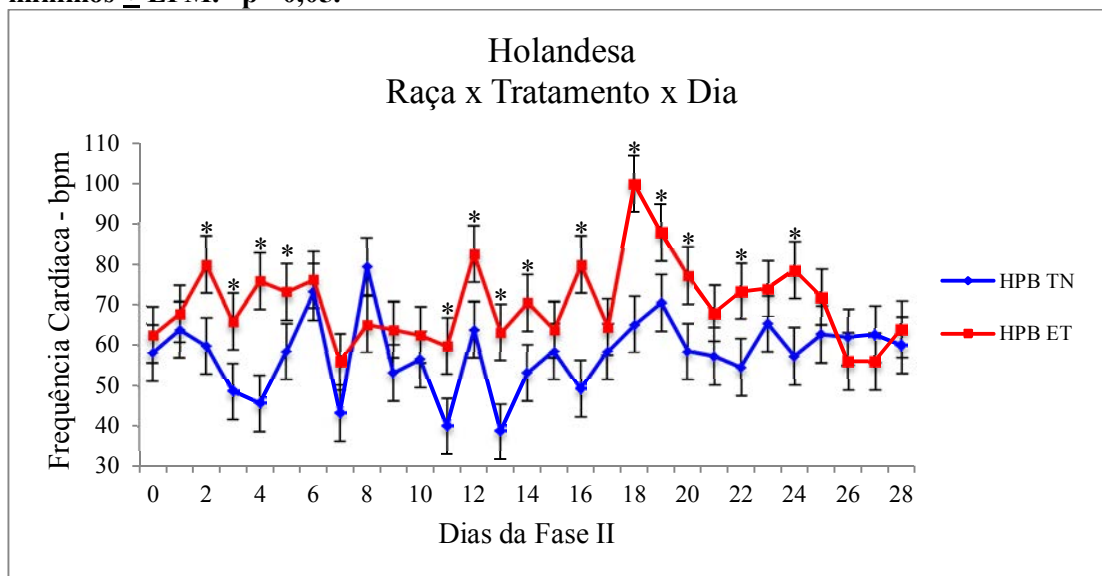
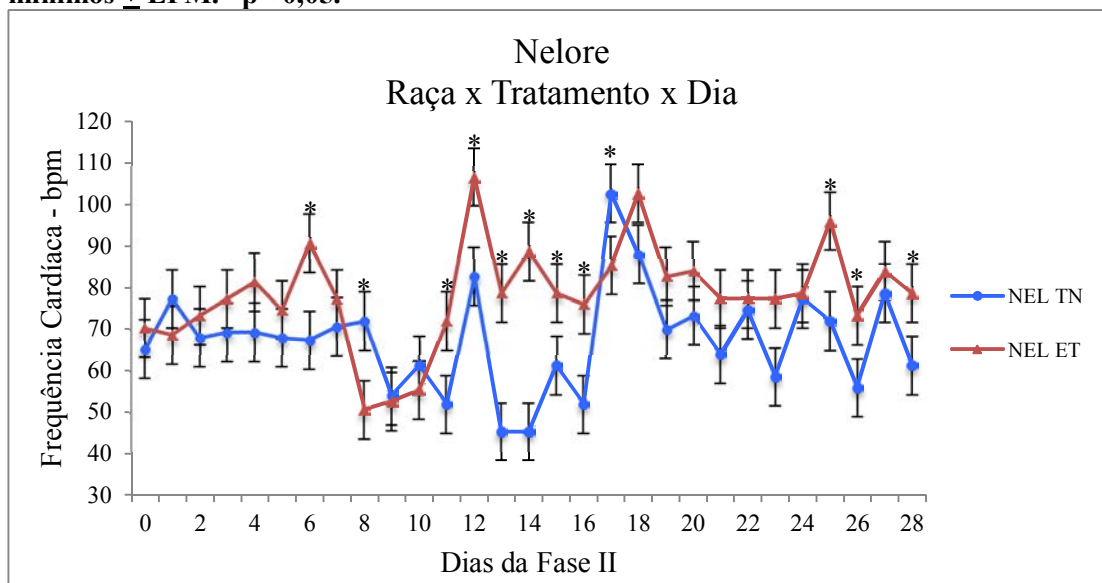


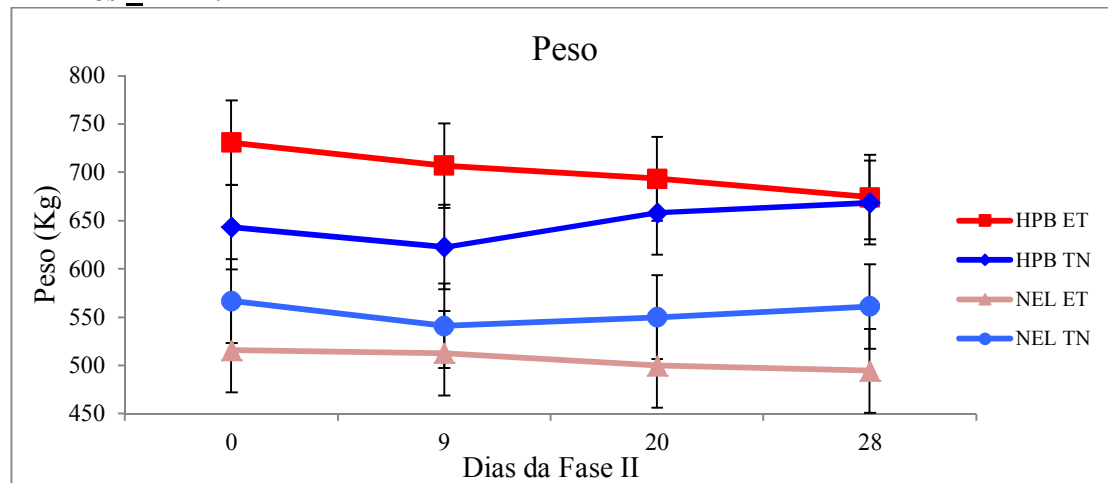
Figura 34: Frequência cardíaca em vacas Nelores expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.



4.4.2.2.5 PESO

Foram avaliados os pesos dos animais uma vez por semana durante o período experimental (Fase II). Não houve interação de raça x tratamento ($p = 0,1792$), porém pode-se notar uma perda de aproximadamente 100 Kg das Holandesas ET e uma perda menos acentuada das Nelores expostas ao ET (Figura 35).

Figura 35: Peso das vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.



4.4.2.2.6 COMPLEXOS CUMULUS OÓCITOS

A exposição das vacas Nelore ao ET reduziu (Tabela 5; $p < 0,05$) o número total de CCOs aspirados por vaca em relação ao grupo Nelore TN. De maneira similar houve uma tendência do ET reduzir ($p = 0,07$) o número total de CCOs aspirados por vaca Holandesa em relação às vacas Holandesas sob TN (Figura 36).

A porcentagem de CCOs grau I não foi afetada pela interação tratamento x raça, portanto os dados foram agrupados (Tabela 5). A exposição de vacas Holandesas e Nelores ao ET em câmara climática reduziu (Tabela 5; $p < 0,05$) a porcentagem de CCOs grau I independente de raça (Figura 37). O ET reduziu ($p < 0,05$) a porcentagem de CCOs grau II aspirados das vacas Holandesas em relação as Nelores (Figura 38). Não houve diferença entre Nelore TN e ET na porcentagem de CCOs grau II, entretanto, houve uma tendência ($p = 0,07$) da taxa de CCOs Grau II ser reduzida no grupo Holandesa ET em relação a Holandesa TN (Figura 38). O ET aumentou ($p < 0,05$) a porcentagem de CCOs grau III em vacas Nelore em relação ao grupo TN. Não houve diferença na taxa de CCOs grau III entre os grupos Holandesa ET e TN (Figura 39). A porcentagem de CCOs grau IV não foi afetada por nenhuma das variáveis avaliadas (Figura 40). Nesta etapa do estudo foram realizadas 9 réplicas utilizando 143-312 oócitos por tratamento.

Tabela 5 - Nível de significância referente ao número total de CCOs aspirados e a porcentagem de CCOs grau I a IV (valores de p).

	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV	Total
Tratamento (Trat)	0,0497	0,6152	-	0,2929	0,0455
Raça	0,6292	0,3918	-	0,2946	<0,0001
Trat x Raça	0,7447	0,0453	-	0,7652	0,0455

Figura 36: Número total de CCOs aspirados de vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$). + Indica tendência ($p < 0,07$).

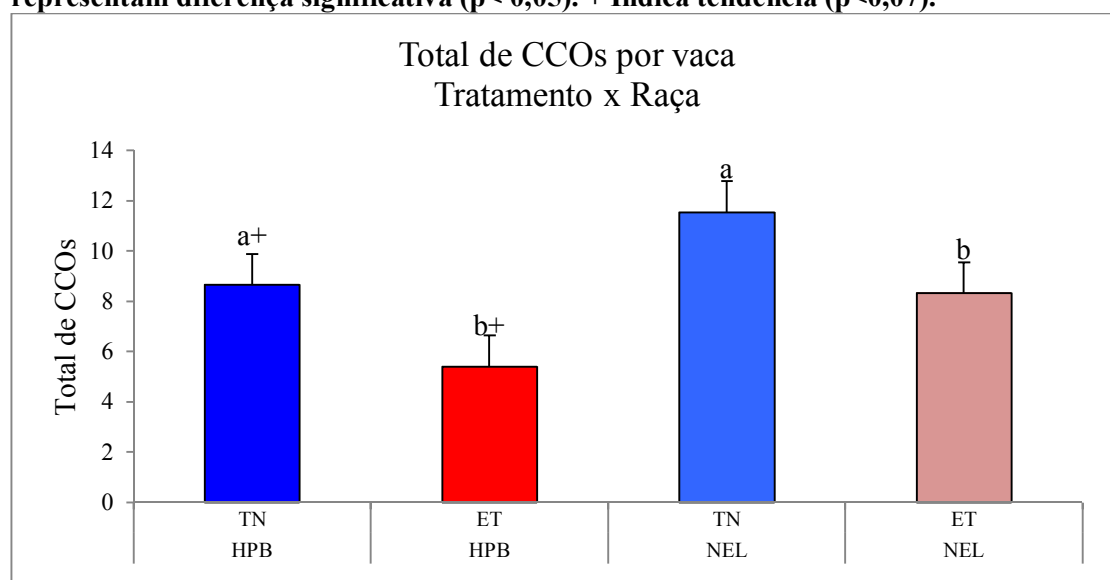


Figura 37: Porcentagem de CCOs grau I aspirados de vacas (Holandesas + Nelores) expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

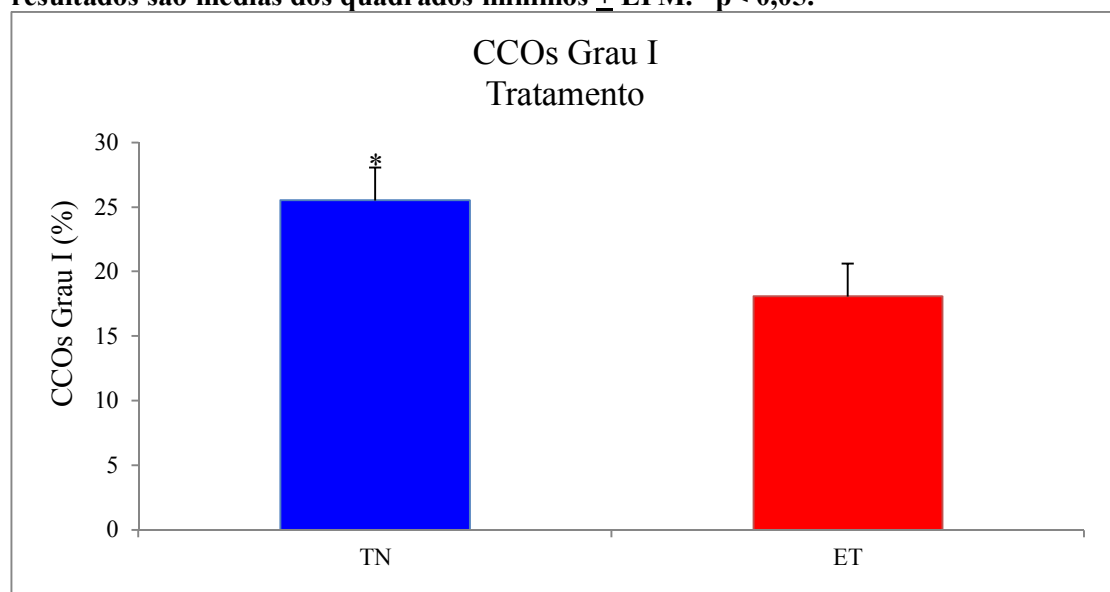


Figura 38: Porcentagem de CCOs grau II aspirados de vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$). + Indica tendência ($p < 0,07$).

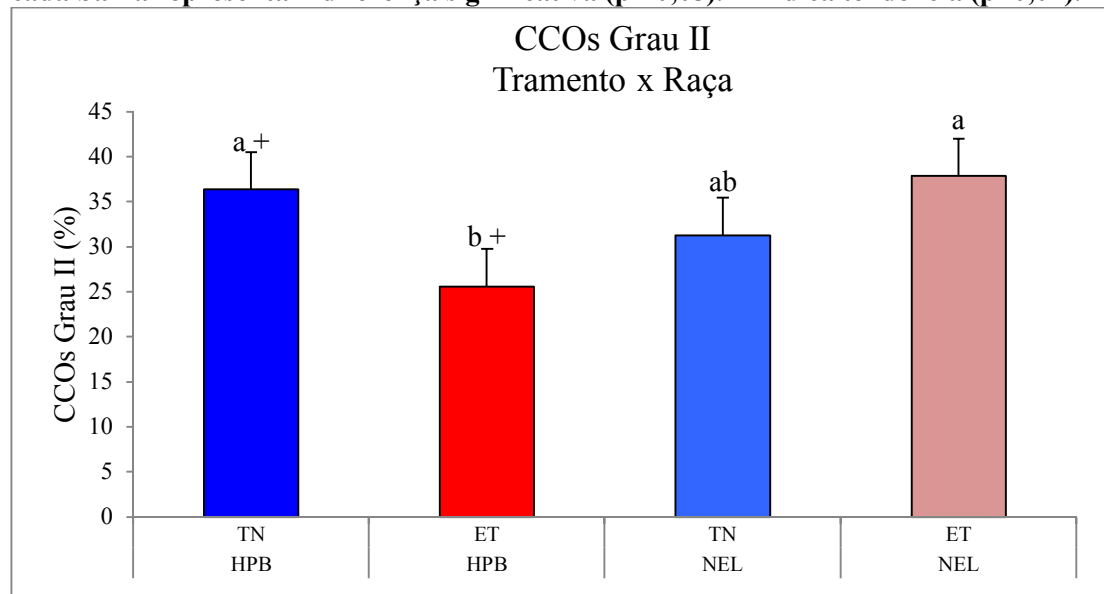


Figura 39: Porcentagem de CCOs grau III aspirados de vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).

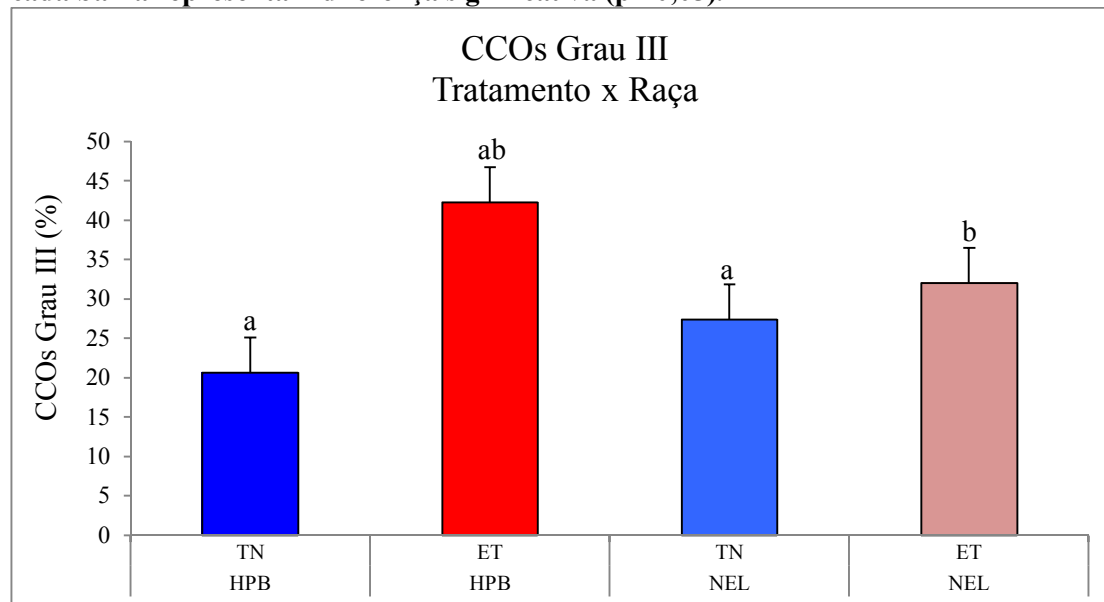
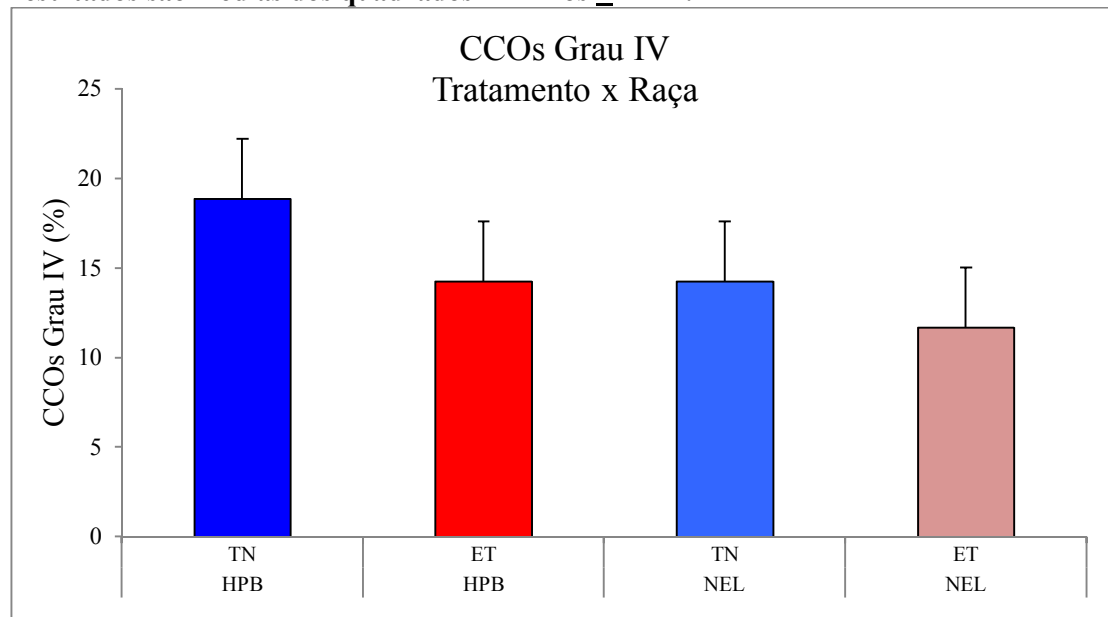


Figura 40: Porcentagem de CCOs grau IV aspirados de vacas Holandesas e Nelores expostas as condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.



4.4.2.2.7 BLASTOCISTOS

A Tabela 6 apresenta o nível de significância referente a porcentagem de oócitos clivados e a porcentagem de blastocisto quando os dados foram analisados utilizando o modelo estatístico completo incluindo todas as variáveis. A porcentagem de oócitos clivados foi reduzida ($p < 0,05$) de $70,91 \pm 3,55\%$ naqueles oócitos aspirados de vacas Holandesas para $51,34 \pm 3,45\%$ naqueles aspirados de Nelores (Figura 41). A exposição de vacas Nelores e Holandesas ao ET em câmara climática também provocou redução ($p < 0,05$) na porcentagem de clivagem ($67,79 \pm 3,35\%$ e $54,46 \pm 3,64\%$ para os grupos TN e ET, respectivamente; Figura 42), no entanto, esta redução foi independente da raça. A produção de blastocisto no dia 8 após a fecundação foi superior ($p < 0,05$) para os oócitos aspirados das vacas Holandesas quando comparada aqueles aspirados de Nelores ($11,09 \pm 2,01\%$ e $4,57 \pm 1,82\%$ para HPB e NEL, respectivamente; Figura 43).

Como a porcentagem de blastocisto não foi afetada por nenhuma outra variável principal do modelo estatístico ou pela interação entre estas variáveis, optou-se por realizar a análise estatística separadamente por raça. As Tabelas 7 e 8 demonstram os níveis de significância referente a porcentagem de blastocisto quando os dados foram analisados separadamente para cada raça.

A exposição de vacas Nelores ao ET e a suplementação do meio MIV com IGF-I não alterou a competência de desenvolvimento oocitária (Tabela 7; Figuras 44 e 45), visto que a porcentagem de blastocisto nos dias 8 e 9 após a fecundação foi similar entre os grupos. De mesma maneira a competência de desenvolvimento dos oócitos aspirados das vacas Holandesas submetidas ao ET não foi afetada pela temperatura, visto que a porcentagem de blastocisto nos dias 8 e 9 após a fecundação foi similar entre os grupos TN e ET. (Tabela 8; Figuras 44 e 45). No entanto, a resposta do oócito HPB ao aumento de temperatura foi modulada pelo IGF-I (interação tratamento x IGF, $p=0,07$). A adição de 25 ng/mL de IGF-I durante a MIV não afetou o desenvolvimento a blastocisto dos oócitos do grupo TN (Tabela 8; Figuras 44 e 45). No entanto, esta dose de IGF-I aumentou ($p<0,05$) a porcentagem de oócitos do grupo ET que se desenvolveu ao estágio de blastocisto (Figura 44) e a porcentagem de embriões clivados que atingiu o estágio de blastocisto no dia 9 após a fecundação (Figura 45). Neste estudo foram realizadas 4 réplicas utilizando 74-123 oócitos por tratamento.

Tabela 6 - Nível de significância referente a porcentagem de oócitos clivados e a porcentagem de blastocisto calculada a partir do número total de oócitos no dia 8 após a fecundação. Modelo estatístico incluindo todas as variáveis.

	Clivagem	Blastocisto Dia 8
Raça	0,0003	0,0266
Tratamento (Trat)	0,0102	0,3718
IGF	0,7399	0,1932
Dia	0,004	0,2422
Raça x Trat	0,8795	0,4307
Raça x IGF	0,6372	0,4125
Trat x IGF	0,3752	0,5224
Raça x Trat x Dia	0,7965	0,9476

Tabela 7 - Nível de significância referente a porcentagem de blastocisto Nelore calculada a partir do número total de oócitos (Pb8 e Pb9) e a partir do número de embriões clivados (PbCliv 8 e 9) nos dias 8 e 9 após a fecundação. (valores de p).

Nelore	Pb8	Pb9	PbCliv8	PbCliv9
Tratamento (Trat)	0,9195	0,5732	0,7470	0,5836
IGF	0,6478	0,9078	0,6801	0,6470
Dia	0,1986	0,3072	0,1716	0,1581
Dia x IGF	0,1863	0,4516	0,1255	0,2298
Trat x IGF	0,5285	0,9692	0,4699	0,9102
Dia x Trat	0,9203	0,8970	0,6218	0,8058

Tabela 8 - Nível de significância referente a porcentagem blastocisto Holandes calculada a partir do número total de oócitos (Pb8 e Pb9) e a partir do número de embriões clivados (PbCliv 8 e 9) nos dias 8 e 9 após a fecundação. (valores de p).

Holandesa	Pb8	Pb9	PbCliv8	PbCliv9
Tratamento (Trat)	0,7199	0,471	0,9078	0,7708
IGF	0,15	0,0159	0,1666	0,0192
Dia	0,0759	0,0247	0,1044	0,017
Dia x IGF	0,3836	0,0334	0,5686	0,0689
Trat x IGF	0,5021	0,1333	0,3647	0,0738

Figura 41: Porcentagem de clivagem de oócitos aspirados de vacas das raças Holandesa e Nelore. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

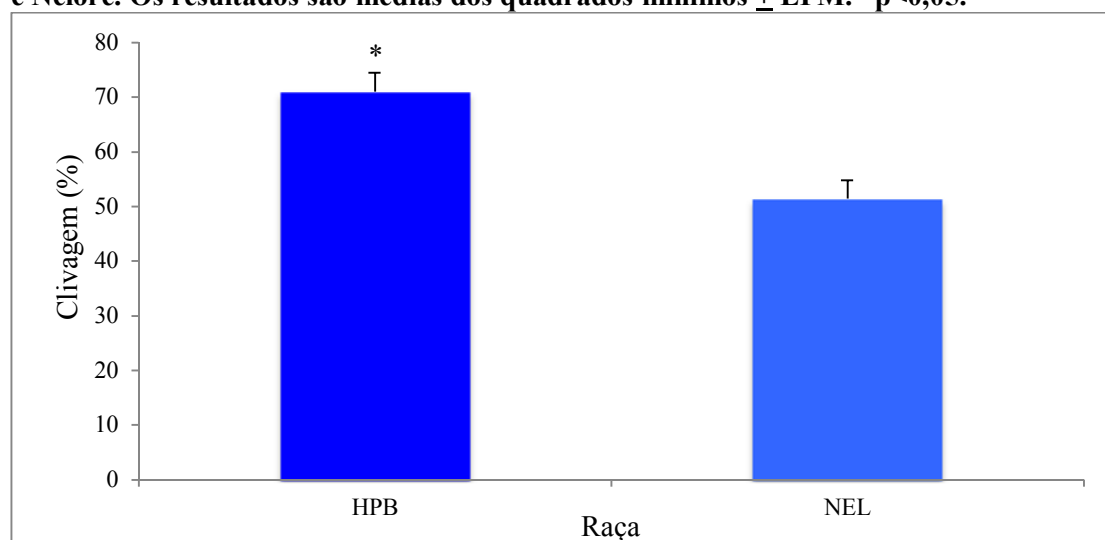


Figura 42: Porcentagem de clivagem de oócitos aspirados de vacas expostas às condições ambientais de Termoneutralidade e Estresse Térmico. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

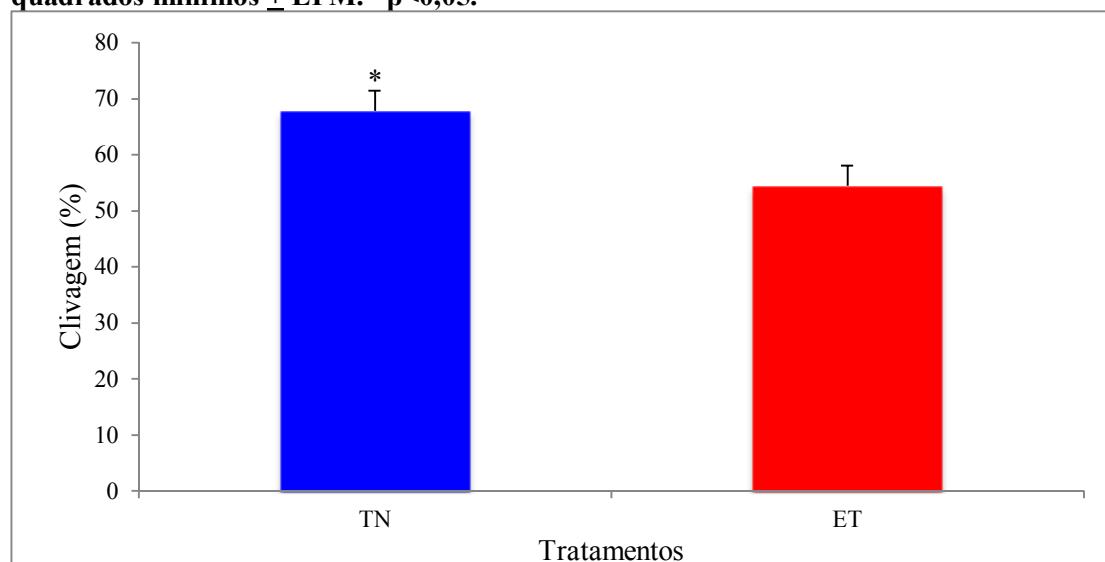


Figura 43: Porcentagem de oócitos aspirados de vacas das raças Holandesa e Nelore que atingiu o estágio de blastocisto no dia 8 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

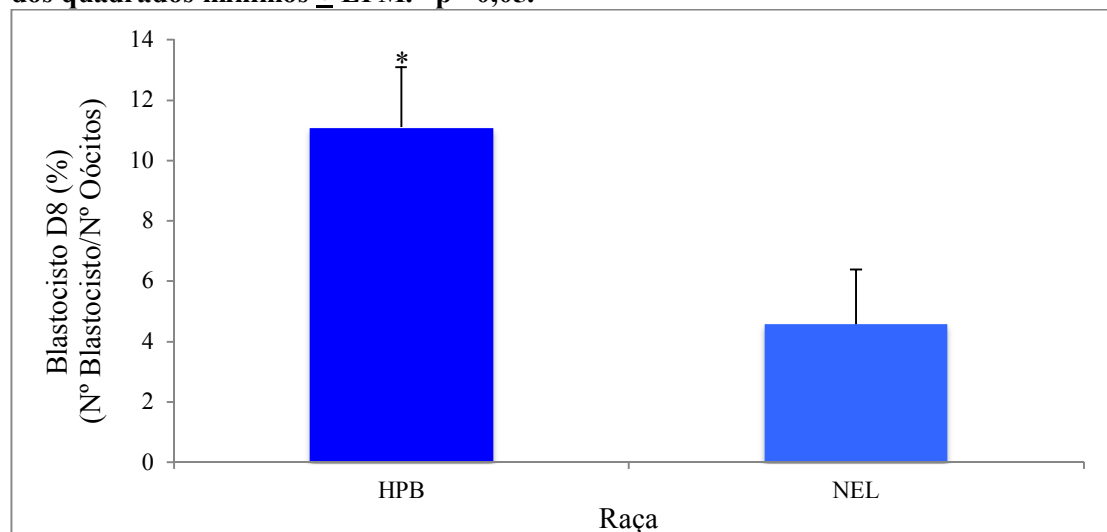


Figura 44: Efeito do estresse térmico e do IGF-I na porcentagem de oócitos aspirados de vacas Nelores e Holandesas que atingiu o estágio de blastocisto no dia 9 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).

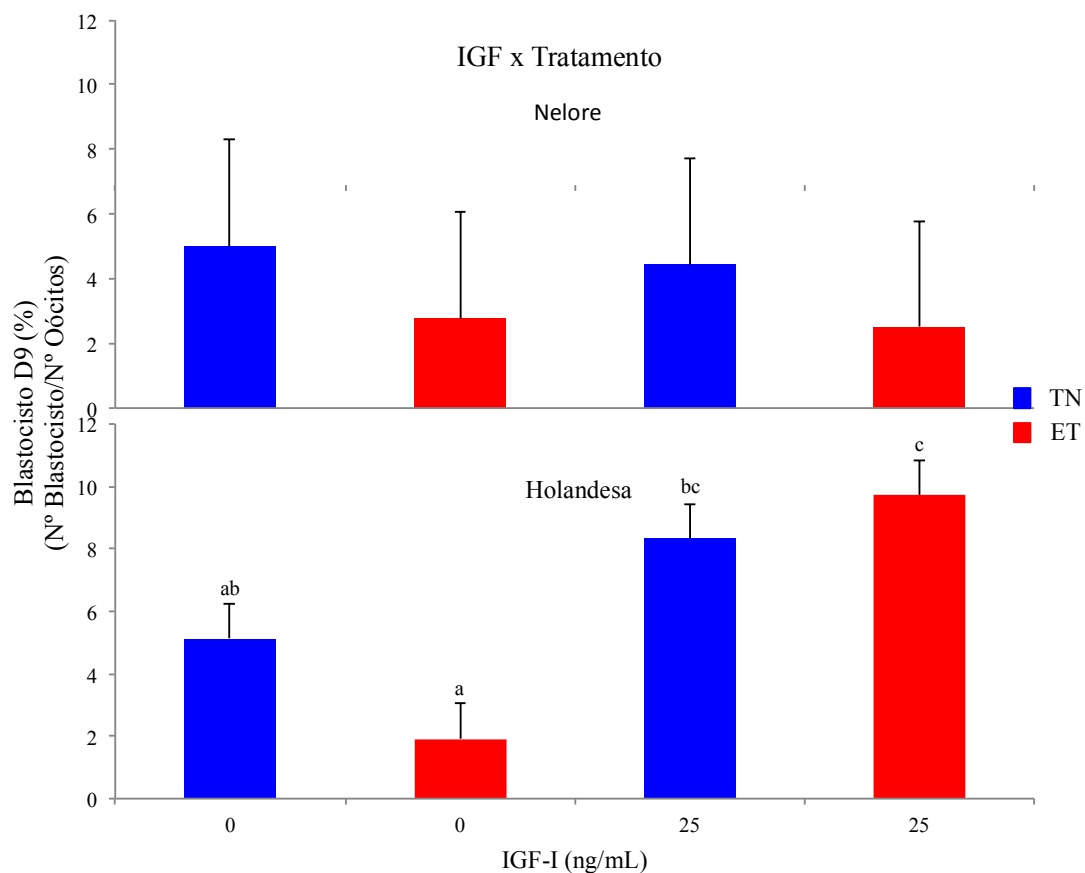
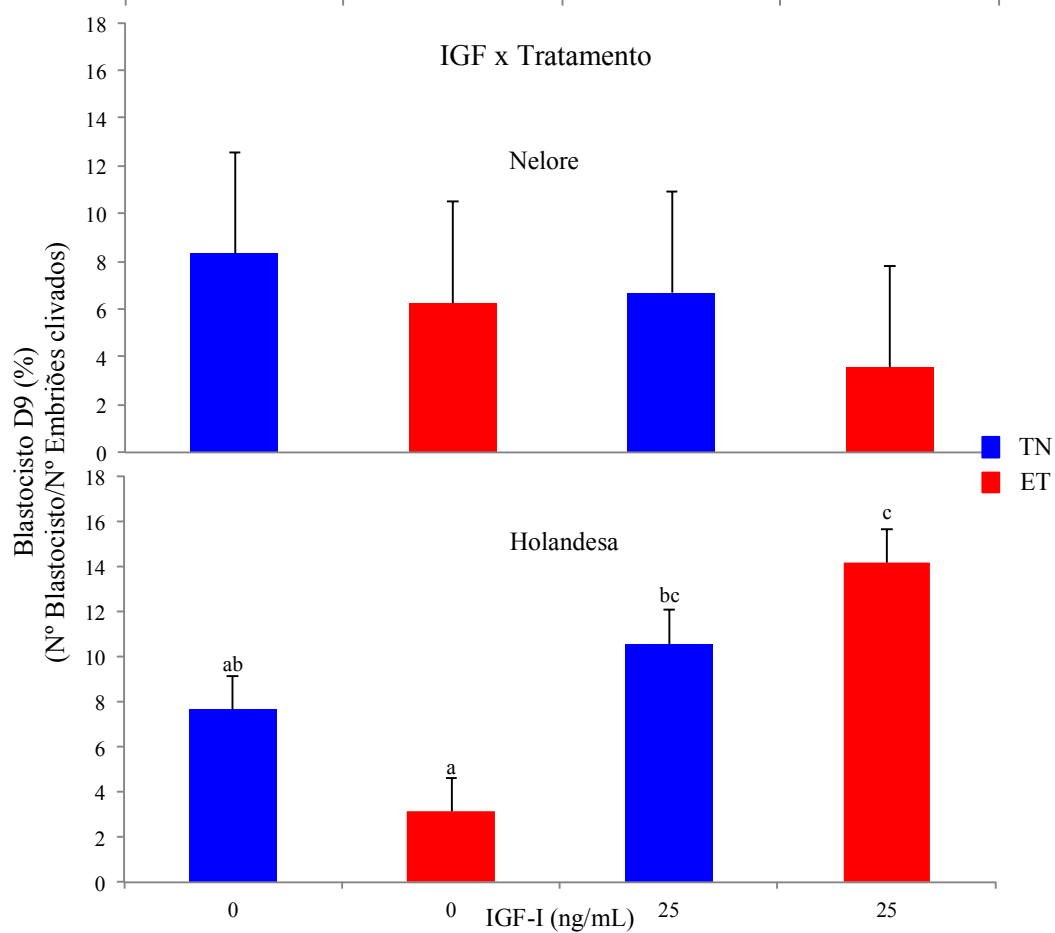


Figura 45: Efeito do estresse térmico e do IGF-I na porcentagem de embriões Nelore e Holandês que atingiu o estágio de blastocisto no dia 9 após a fecundação. Os resultados são as médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($p < 0,05$).



4.3 DISCUSSÃO

Dentre todos os parâmetros fisiológicos que podem ser observados para avaliação de estresse térmico em bovinos, a temperatura retal é o mais importante e indicativa de estresse (HANSEN, 2005), pois seu acréscimo indica falha ou esgotamento dos mecanismos de termoregulação (MOTA, 1997). No decorrer da fase I a temperatura retal variou entre o período da manhã e da tarde, variação esta que, segundo Feitosa (2008), esta adequada aos padrões de normalidade da temperatura retal de bovinos, entre 37,8 e 39,2 °C.

O ITU é o índice mais comumente usado para estimar a magnitude do estresse térmico em gado *Bos taurus* leiteiro (BIANCA, 1962; FUQUAY, 1981; ARMSTRONG, 1994; GARCÍA-ISPIERTO, et al., 2007). O valores críticos ITU para considerar que uma fêmea *Bos taurus* em lactação está em estresse térmico é 72 (ARMSTRONG, 1994). Porém, é importante enfatizar que as fêmeas utilizadas neste experimento, Nelores ou Holandesas, não estavam em lactação, o que diminui a produção de calor endógeno por diminuição do metabolismo, favorecendo a termoregulação e por consequência a manutenção do conforto térmico (LOPEZ et al., 2004; SARTORI et al. 2004; WILTBANK et al., 2006). Quando calculado o ITU da fase I nota-se que o mesmo variou de 57 a 76 durante todo o período, indicando que os animais estavam na maior parte do tempo em uma condição ambiental de conforto térmico com períodos limítrofes de estresse moderado.

Durante a fase II do experimento foram mensurados a TBS e UR, e calculado o ITU da câmara climática e do ambiente no qual estavam os animais do grupo TN. A média calculada do ITU no grupo TN permaneceu limítrofe na tabela utilizada por Armstrong (1994), entre ausência de estresse e estresse ameno. Já no interior da câmara climática o ITU oscilou dentro da classificação de estresse térmico moderado, tendo alguns picos próximos à classificação de estresse térmico severo. A TBS e UR propostas para este experimento, segundo a tabela de Armstrong (1994), classificaria o ITU como estresse térmico severo. No entanto, no presente estudo, devido ao deslocamento diário dos animais dentro câmara, o psicômetro foi instalado em um local fora de alcance das vacas, próximo ao local onde estavam os umidificadores. Tal posição pode ter provocado uma redução na temperatura e aumento da UR local, causando resfriamento direto do psicômetro. A câmara climática possuía também um psicômetro próprio, porém sem a capacidade de

armazenamento de dados. Este aparelho fazia o controle da temperatura e UR num ponto central da câmara climática, demonstrando em tempo real que os parâmetros foram mantidos como estipulado.

A permanência dos animais por 28 dias na câmara climática em condições de estresse térmico aumentou a temperatura retal das vacas Holandesas no decorrer da fase II, enquanto que no grupo TN a temperatura retal de ambas raças não sofreu alteração. Este aumento não foi observado nas vacas Nelores, como descrito anteriormente (ADEYEMO et al., 1979; HAMMOND et al., 1996, 1998). Em experimento sazonal na Flórida, EUA, Hammond e colaboradores (1996, 1998) demonstraram diferença entre a temperatura retal de animais Brahman e Angus (40,9 e 40,0° C, respectivamente) durante o verão. Neste experimento, a temperatura retal das vacas Brahman não foi superior a 40 °C em nenhuma das estações. Al-Katanani e colaboradores (2002) realizaram outro experimento sazonal na Florida, EUA, com vacas Holandesas não lactantes e observaram aumento de 1,1 °C na temperatura retal das vacas durante o verão em relação ao inverno, próximo ao encontrado no presente estudo, durante a fase II de 1,3 °C na temperatura retal das vacas Holandesas ET em relação as TN. Durante o verão Srikandakumar e Johnson (2004) realizaram experimento em Omã (ITU de $93 \pm 3,1$; TBS 35,6 a 43,98 °C; UR 35 a 95%) no qual demonstraram que vacas **Bos indicus** lactantes apresentaram aumento da temperatura retal inferior aquele apresentado por vacas **Bos taurus** lactantes (0,38 °C e 0,7 °C respectivamente). Esses estudos demonstram que vacas **Bos taurus** são mais sensíveis ao incremento de temperatura ambiental do que vacas **Bos indicus**, corroborando com os resultados aqui apresentados.

Segundo Lemerle e Goddard (1986), a temperatura retal de vacas **Bos taurus** em lactação começa a aumentar de forma significativa quando o ITU ultrapassa 80. No decorrer da fase II observou-se que o valor mínimo do ITU correspondente a um aumento da temperatura retal foi acima de 81. Porém como as vacas Holandesas estavam vazias e não lactantes, pode-se supor que estas vacas conseguiram manter a termorregulação a temperaturas mais elevadas.

No presente experimento houve aumento da frequência respiratória nos animais termicamente estressados quando comparado ao controle TN. As Holandesas do grupo estresse térmico foram as que apresentaram maior incremento em relação a todos os outros grupos. O animal exposto a condição ambiental de estresse térmico sofre alterações fisiológicas visando aumentar a dissipação de calor para o ambiente e

manter a temperatura corporal constante. Ocorre primeiramente a vasodilatação periférica, seguida por sudção e aumento da frequência respiratória, que é o primeiro sinal visual do estresse térmico (MARTELLO, 2004).

O aumento da frequência respiratória nas Holandesas foi observado no primeiro dia, quando o ITU estava 10 pontos acima no grupo ET em relação ao grupo TN, confirmando o que foi observado com Lemerle e Goddard, 1986. O aumento da FR pelo estresse térmico já foi relatado por outros pesquisadores (WEST, 2002, COPPOCK et al., 1982) e ocorre juntamente com a queda da porcentagem do dióxido de carbono e do bicarbonato no sangue venoso (BEATTY et al. 2006). No animal exposto a temperaturas acima de 30 °C a troca de calor pela respiração é de aproximadamente 15% da perda total (MAIA et al., 2005). Normalmente, em termoneutralidade, bovinos apresentam uma frequência respiratória de 12 a 36 movimentos por minuto (SMITH, 1993), sendo uma média de 15 e 35 movimentos por minuto em *Bos indicus* e *Bos taurus* respectivamente (CARVALHO et al., 1995) e em estresse térmico de 80 (TORRES-JÚNIOR et al., 2008) a 126 movimentos por minuto (BEATTY et al., 2006). As FR mensuradas no presente estudo aproximaram-se do relatado na literatura. Foi observado também uma queda da média da FR ao final do experimento, observado na interação Tratamento x Raça x Dia, corroborando com outros autores (BEATTY et al., 2006; TORRES-JÚNIOR et al., 2008), no qual eles especulam uma possível adaptação das fêmeas ao estresse térmico.

A pele em bovinos tem papel importante também na termorregulação corporal quando o animal é exposto a altas temperaturas, uma vez que a perda de calor por evaporação cutânea é responsável por 20 a 30% da perda total de calor, podendo chegar a 85% (MAIA et al., 2005). Porém a perda através da pele depende não só de outras variáveis como a temperatura, mas também de umidade e vento ambiente (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008). Para que ocorra a troca de temperatura corporal com o ambiente de maneira efetiva, deve ocorrer uma rápida redistribuição do sangue (KAMIJO et al., 2005), aumentando o fluxo sanguíneo periférico, ou seja, na pele (CHOSHNIK et al., 1982). Os resultados obtidos no presente experimento corroboram com os supracitados, visto que as temperaturas cutâneas foram superiores nas fêmeas expostas ao estresse térmico, independente da raça, no período da manhã. Quando comparamos as raças e os tratamentos no período da tarde, não foram encontradas diferenças significativas ao longo do período do experimento. Este fato pode indicar que os animais em termoneutralidade, apesar de não apresentarem sinais

de hipertermia, ativaram mecanismos termoregulatórios durante a tarde. Assim, como observado nas frequências respiratórias, o aumento do ITU nos primeiros dias já aumentou a temperatura cutânea.

No presente estudo o aumento da frequência cardíaca observado nas vacas Holandesas expostas ao estresse térmico vai contra alguns relatos na literatura. Neste estudos o estresse térmico causou redução da FC devido à vasodilatação periférica associada à troca de calor para o ambiente (KIBLER e BRODY, 1951, SINGH e NEWTON, 1978, BEATTY et al., 2005). No entanto, Terui e colaboradores (1979) e KABUGA (1992) demonstraram um aumento da frequência cardíaca em animais submetidos ao estresse térmico. Segundo estes autores, o aumento na FC foi consequência de não haver um período de adaptação ao calor que os animais em experimento foram expostos subitamente à temperatura elevada de estresse. Assim pode-se concluir que o tempo de exposição à altas temperaturas é essencial para a adaptação dos animais ao calor, e que a mudança brusca de temperatura não permite ao animal se adaptar, levando ao aumento da frequência cardíaca.

Ao final deste experimento foram aspirados um total de 823 CCOs, sendo 312 CCOs do grupo Nelore TN, 143 CCOs de Holandesa TN, 225 CCOs de Nelore ET e 143 CCOs de Holandesas ET. O estresse térmico reduziu o número total de oócitos aspirados das vacas Nelores ($11,56 \pm 1,23$ para $8,33 \pm 1,23$ oócitos/sessão de OPU) e tendeu a reduzir nas vacas Holandesas ($8,66 \pm 1,23$ para $5,41 \pm 1,23$ oócitos/sessão de OPU). Estes dados também foram observados por outros autores. Ferreira e colaboradores (2011) relataram em experimento sazonal, a queda do número total de oócitos aspirados e total de oócitos viáveis de vacas Holandesas no pico da lactação durante verão. Surpreendentemente, vacas Nelore e Holandesas apresentaram o mesmo número de oócitos recuperados, resultado este que vai contra a relatos na literatura (BURATINI et al., 2000; ALVARES et al., 2000; BÓ et al., 2003; CARVALHO et al., 2008).

O estresse térmico reduziu a porcentagem de CCOs grau I independente de raça. Rocha e colaboradores (1997) observaram efeito próximo do estresse térmico sazonal na qualidade de oócitos de vacas **Bos taurus** reduzindo a porcentagem de oócitos graus I e II. A ausência de efeito de raça na porcentagem de CCOs grau I pode indicar que o estresse térmico provoca efeito deletério na foliculogenese independente da raça. Fato este ainda não encontrado na literatura referente à avaliação morfológica. Os relatos encontrados apontam efeito deletério do estresse térmico na recuperação de

oócitos pós OPU e na competência oocitária (ROTH et al., 2001; ROTH e HANSEN, 2005; ROTH, 2008; GENDELMAN et al., 2010).

Quando observado a porcentagem de CCOs grau II nota-se efeito do estresse térmico em CCOs do grupo de vacas Holandesas quando comparadas ao mesmo tratamento em vacas Nelores, não observado a mesma diferença no grupo TN.

Houve novamente efeito do estresse térmico, aumentando a porcentagem de CCOs grau III do grupo Nelore quando comparado aos grupos TN. Não houve efeito de raça ou do estresse térmico na porcentagem de CCOs grau IV.

Já foi demonstrado que o estresse térmico prejudica a competência do oócito desde os estágios iniciais da foliculogênese, promovendo a ovulação de oócitos com baixa qualidade (ROTH et al., 2001). Quando oócitos de vacas Holandesas foram colhidos durante o verão, mesmo depois de selecionados em viáveis e não viáveis, houve redução no desenvolvimento a blastocisto (FERREIRA et al, 2011) e consequentemente reduzindo o a taxa de implantação e desenvolvimento embrionário (FABIAN et al, 2005). Al-Katanani e colaboradores (2002) demonstraram o efeito do estresse térmico sazonal em oócitos de vacas Holandesas, reduzindo a competência oocitária.

No presente experimento quando analisado a porcentagem de oócitos aspirados que clivaram no dia 3 pós fecundação, pode-se notar efeito de raça, tendo as vacas da raça HPB uma porcentagem de oócitos clivados maior do que as vacas da raça NEL; este efeito pode ser associado ao fato das vacas HPB serem de alto padrão genético; fato este que será discutido com os resultados de blastocisto. O efeito negativo do estresse térmico na porcentagem de oócitos clivados esta de acordo com alguns autores (ROCHA et al., 1997; AL-KATANANI et al, 2002; Gendelman et al., 2010; Gendelman; Roth, 2011). Nestes estudo o estresse térmico reduziu a taxa de clivagem de 2 para 4 células e reduziu a proporção de embriões clivados que se desenvolveram até o estágio de blastocisto. Com estes resultados, os autores demonstraram que a exposição de oócitos em estágio de vesícula germinativa ao estresse térmico interfere na expressão de RNAm materno antes e depois da ativação do genoma embrionário.

No entanto, os efeitos do estresse térmico na clivagem é contraditório. Nos experimentos conduzidos por Rivera e colaboradores (1999) ao longo do ano com FIV de oócitos oriundos de vacas de abatedouro não foi observado efeito do estresse térmico nos meses de verão. Ferreira e colaboradores (2011) em experimento

com vacas Holandesas não obsevou efeito do estresse térmico sazonal na porcentagem de oócitos clivados. Rivera e colaboradores (2000) também relataram que não houve efeito do estresse térmico sazonal na clivagem de oócitos oriundos de abatedouro. Porém há relatos (Rocha, 1998; Roth, 2004; Roth, 2005; LIMA, 2012) de que efeito de temperaturas elevadas, seja no decorrer do período do verão ou durante a maturação *in vitro*, reduzem a porcentagem clivagem de oócitos.

As porcentagens de clivagem deste experimento estão próximas daqueles encontrados em experimentos com OPU. Em experimento realizado em vacas japonesas Wagyu (*Bos taurus*) a taxa de clivagem de oócitos aspirados pela técnica de OPU foi $56,5 \pm 3,8\%$ (TAKUMA et al., 2010). em experimento com vacas *Bos indicus*, Su (2012) demonstrou uma taxa de clivagem de oócitos aspirados de $63,3 \pm 2,6\%$, Ramos e colaboradores (2007) obtiveram taxas de 46,11% de clivagem de oócitos aspirados de vacas da raça Gir, Torres-Júnior (2006) nesta mesma raça conseguiu taxas de 71,3% em vacas termoneutras e 61,2% em vacas estressadas térmicamente. Roth e colaboradores (2001) submeteram vacas Holandesas a aspiração folicular ao longo do ano e durante o verão a taxa de clivagem foi aproximadamente 40% e 75% durante os meses de outono e inverno. A adição de 25 ng/mL de IGF-I durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos não alterou a taxa de clivagem. De maneira similar Lima (2012) demonstrou que a adição de 12,5 e 100 ng/mL de IGF durante a maturação de oócitos em vesícula germinativa não afetou a taxa de clivagem. Porém quando expostos ao choque térmico, houve redução da clivagem assim como achados no presente estudo. Zhandi e colaboradores (2009) também suplementaram o meio de maturação com 100 ng/mL de IGF-I e não obseveram efeito na taxa de clivagem.

A produção de blastocisto foi marcada por diferenças entre raças, sendo maior para os oócito de Holandesas do que de Nelores. Estes dados não corroboram com relatos na literatura que reportam menor produção de blastocistos em raças taurinas quando comparadas, temporalmente, às representantes zebuínas (GIMENES, 2010). Ireland e colaboradores (2008) relataram que a população de folículos antrais no ovário de vacas esta associado com uma variedade de medidas de fertilidade, entre elas a taxa de recuperação oocitária após OPU e consequente produção de embriões *in vitro*, independente da raça ou idade da fêmea bovina. Além disso, apesar da população antral ser altalmente variável entre indivíduos bovinos, ela é altamente hereditária (IRELAND et al., 2007), o que torna essa característica um fator de

seleção desejável. Como discutido anteriormente, a superioridade genética das vacas HPB podem ter superavaliado os resultados quando comparados aos resultados da raça NEL. Por essa razão, a fim de remover o efeito seleção genética do modelo, foram realizadas duas análises estatísticas, uma para cada raça.

A exposição das vacas Nelores ao estresse térmico ambiental não resultou em hipertermia destes animais e também não afetou a competência de desenvolvimento oocitária. Sabe-se que as vacas ***Bos indicus*** possuem maior termotolerância do que vacas ***Bos taurus*** e que os embriões são mais resistentes ao choque térmico em vacas ***Bos indicus*** do que aqueles de ***Bos taurus*** (PAULA-LOPES et al., 2003; SATRAPA, 2011). Não houve efeito do IGF-I na taxa de clivagem ou de blastocisto de oócitos aspirados da vacas NEL em ambos os tratamentos com temperatura. Considerando que oócitos de vacas da raça NEL apresentam maior expressão gênica de enzimas proteolíticas para IGFBPs e menor expressão gênica de receptores para IGF-I quando comparados a oócitos de vacas HPB (SATRAPA et al, 2013), pode-se aludir que a concentração de IGF-I no meio de maturação dos oócitos das vacas estaria aumentando muito a concentração ótima de IGF-I para estes oócitos. Além disso, a maior concentração de IGF-I disponível ao oócito de ***Bos indicus*** que pode lhe conferir a maior termotolerância quando comparadas a vacas ***Bos taurus***.

A exposição de vacas Holandesas a condição de estresse térmico resultou em hipertermia destes animais, porém não afetou a competência de desenvolvimento oocitária. Este resultado vai contra dados encontrados na literatura, nos quais demonstram que oócitos de vacas Holandesas tendem a ter um decréscimo no desenvolvimento a blastocisto durante o verão (AL-KARANANI et al., 2002; FERREIRA et al., 2011). Os resultados aqui expostos podem ser explanados devido a baixa quantidade de replicatas utilizadas, não sendo suficiente para gerar uma diferença estatística.

A concentração de 25 ng/mL de IGF-I na maturação dos CCOs aspirados das vacas HPB conseguiu reverter de maneira significativa os efeitos do ET no dia 9 pós fecundação. Já foi demonstrado que oócitos imaturos de vacas Holandesas possuem maior expressão gênica para receptores do IGF-I e IGF-II e menor expressão gênica das enzimas proteolíticas para IGFBPs quando comparados aos oócitos de vacas Nelore (SATRAPA, 2011). A concentração plasmática de IGF-I está intimamente ligada ao consumo alimentar, assim vacas produtoras de leite quando expostas ao ET reduzem o consumo de matéria seca, reduzindo os níveis circulantes

de glicose, insulina e consequentemente de IGF-I (DE RENSIS e SCARAMUZZI, 2003). Assim pode-se explicar o efeito do ET em vacas de alta produção, pois o aumento da temperatura e deslocamento de nutrientes como glicose para o leite reduzem a concentração de IGF-I disponível.

É sabido que taxas de blastocistos de oócitos oriundos de abatedouro são maiores que aquelas obtidos a partir de OPU (MERTON et al., 2003). Em experimentos com OPU de ***Bos taurus*** a taxa de blastocisto por oócitos aspirado em vacas japonesas Wagyu foi de $56,5 \pm 3,8\%$, Roth e colaboradores (2001) durante o verão obtiveram taxas de aproximadamente 3% de blastocistos de vacas HPB, Satrapa (2011) obteve taxas de 20,1% em oócitos TN e 15,5% em oócitos em ET. No presente estudo, as taxas de blastocistos foram próximas de 5%, este resultado deve-se provavelmente ao fato do uso de todos os CCOs para a PIV, sem seleção, uma vez que o tratamento temperatura era ***in vivo*** e a seleção poderia mascarar resultados de oócitos danificados.

4.4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e sob as condições impostas para este experimento pode-se concluir que:

I – Vacas ***Bos taurus*** foram mais susceptíveis ao ET induzido em câmara climática quando comparadas às vacas ***Bos indicus***;

II – O ET induzido em câmara climática provocou alterações fisiológicas em ambas as raças, porém de forma mais acentuada em animais ***Bos taurus***;

III – A temperatura cutânea assim como a frequência respiratória podem indicar a tentativa do animal de termorregular antes de entrar em estresse térmico;

IV – O ET induzido comprometeu o número de CCOs aspirados e reduziu a porcentagem de CCOs grau I em ambas as raças, também reduziu a porcentagem de CCOs grau II nas HPB e aumentou a porcentagem de CCOs grau III nas NEL;

V – O ET induzido em câmara climática reduziu a clivagem no dia 3 pós fecundação independente da raça;

VI – A dose de 25 ng/mL de IGF-I adicionado no meio MIV semidefinido apresentou melhor ação na maturação de oócitos de HPB termicamente estressados do que em aos oócitos de NEL sob as mesmas condições.

5 BIBLIOGRAFIA

ABCZ. Zebu de ponta a ponta. Uberaba, MG, 2013.

ADEYEMO, O.; HEATH, E.; ADADEVOH, B. K.; STEINBACH, J.; OLALOKU, E. A. Some physiological and behavioural responses in *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers acclimatized to the hot humid seasonal equatorial climate. **Int J Biometeorol**, v. 23(3), p. 231-241, 1979.

ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; D'ERCOLE, A.J.; SVOBODA, M.E.; VAN WYK, J.J. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. **Endocr. Rev.**, v. 6, p. 400-420, 1985.

AGUIAR, I. S.; BACCARI JR. F. Respostas fisiológicas e produção de leite de vacas holandesas mantidas ao sol e com acesso a sombra natural. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ed. 1, 2003.

ANUALPEC, 2007. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP, 2007

AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90 day non-return rate to first service in lactating Holstein cows in a hotclimate. **Journal Dairy Science**, v. 82, p. 2611- 2615, 1999.

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

ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE JR, C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus , Brahman , and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1291-1302, 2000.

ARAÚJO, M.C.C.; VALE FILHO, V.R.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; BARRETO FILHO, J.B.; CAMARGO, L.S.A.; SERAPIÃO, L.V.; SILVA, M.V.G.B. Secreção de Interferon tau em embriões bovinos produzidos in vitro frescos e congelados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 57, n. 6, p. 751-756, 2005.

ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG,C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Effect of Dietary Energy and Protein on Bovine Follicular Dynamics and Embryo Production In Vitro: Associations with the Ovarian Insulin-Like Growth Factor System. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1624–1632 , 2001.

ARMSTRONG, D.V. Symposium: Nutrition and heat stress. Heat Stress Interaction with Shade and Cooling. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2044- 2050, 1994.

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

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

BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; DIAZ, T.; DROST, M.; WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 39, p. 797-810, 1993.

BARNES, D.; SATO, G. Methods for growth of euhured cells in serum-free medium. **Analyt. Biochem.**, v. 102, p. 255-270, 1980.

BEATTY, D.T.; BARNES, A.; TAYLOR, E.; PETHICK, D.; MCCARTHY, M.; MALONEY, S.K. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. **J. Anim. Sci.**, v. 84, p. 972-985, 2006.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biol Reprod**, v. 66, p. 120-126. 2002.

BENJAMIN, M.M. Fluid and electrolytes. **Outline of Veterinary Clinical Pathology** - Iowa State Univ. Press, Ames, 1981.

BIANCA, W. Relative importance of dry and wetbulb temperatures in causing heat stress in cattle. **Nature**, v. 195, p 251-252, 1962.

BIANCHINI, E.; MCMANUS, C.; LUCCL, C.M.; FERNANDES, M.C.B.; PRESCOTT, E.; MARIANTE, A.S.; EGITO, A.A. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesq. agropec. bras.**, v.41, p.1443-1448, 2006.

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

BLOCK, J.; DROST, M.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J.; RIVERA, R.M.; PAULA-LOPES, F.F.; ONCON, O.M.; KRININGER III, C.E.; LIU, J.; HANSEN, P.J. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase preagnancy rates following the transfer of *in vitro*-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 1590-1602, 2003.

BLOCK, J.; HANSEN, P.J. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 67, p. 1518-1529, 2007.

BLOCK, J.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; HERRMANN, D.; HANSEN, P.J. Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 on Cellular and Molecular Characteristics of Bovine Blastocysts Produced In Vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 895-903, 2008.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, out. 2003.

BROKER, L.E.; KRUYT, F.A.E.; GIACCONE, G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. **Clinical Cancer Research**, v.11(9), p.3155-3162, 2005.

BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 269-290, 1999.

BURATINI, J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of Dominant Follicle Aspiration and Treatment with Recombinant Bovine Somatotropin (BST) on ovarian Follicular Development in Nelore (*Bos indicus*) Heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.

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

BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 2938-2951, 2006.

BYRNE, A. T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Regulation of apoptosis in the bovineblastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 489-495, 2002.

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

CARTWRIGHT, T.C. Responses of beef cattle to high ambient temperatures. **J. Anim. Sci.**, v. 14, p. 350–362, 1955.

CARVALHO, F.A.; LAMMOGLIA, M.A.; SIMÕES, M.J.; RANDEL R.D. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 12, p. 3570- 3573, 1995.

CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167-175, 2008.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – ESALQ-USP. **Boletim do Leite**. Dez-2010

CHOSHNIAK, I.; MCEWAN-JENKINSON, D.; BLATCHFORD, D.R.; PEAKER, M. Blood flow and catecholamine concentration in bovine and caprine skin during thermal sweating. **Comp Biochem Physiol C**, v. 71, p.37-42, 1982.

CLEMMONS, D.R. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 140, p. 19-24, 1998.

COLLIER, R.J.; DOELGER, S.G.; HEAD, H.H.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Effects of heat stress during pregnancy on maternal hormone concentrations, calf birth weight and postpartum milk yield of Holstein cows. **J Anim Sci.**, v. 54, p. 309-319, 1982.

COPPOCK, C.E.; GRANT, P.A.; PORTZER, S.J.; CHARLES, D.A.; ESCOBOSA, A. Lactating dairy cow responses to dietary sodium, chloride, and bicarbonate during hot weather. **J. Dairy Sci.**, v. 65, p. 566 – 576, 1982.

- CUI, Q.; ALMAZAN, G. IGF-I induced oligodendrocyte progenitor proliferation requires PI3K/Akt, MEK/ERK, and Src-like tyrosine kinases. **Journal of Neurochemistry**, v. 100 p. 1480-1493, 2007.
- CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. Tratado de fisiologia veterinária. 4ª edição. Saunders - Elsevier, 2008. 728 p.
- CURTIS, S.E. Environmental Management in Animal Agriculture. Iowa State University Press, Ames, IA, 1981
- DE CASTRO, L.A.; HANSEN, P.J. Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, p. 763-770, 2007.
- DE LOOS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIP, T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.28, p.255-259, 1991.
- DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow- a review. **Theriogenology**, v. 60, p. 1139-1151, 2003.
- DE SOUSA, P.A.; MARTINS DA SILVA, S.J.; ANDERSON, R.A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular toti-potency. **Cloning and Stem Cells**, v. 6, n. 4, p. 375-385, 2004.
- DELL, K.R.; SEVERSON, D.L. Effect of cis-unsaturated fatty acids on aortic protein kinase C activity. **Biochemistry Journal**, v. 258, p. 171-175, 1989.
- DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell Press**, v. 102, p. 33-42, 2000.
- EALY, A.D.; DROST, M.; HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal Dairy science**, v. 76, p. 2899-2905, 1993.
- EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biol Reprod**, v. 55, p. 340-346, 1996.
- EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol Reprod Dev**, v. 46, p. 138- 145, 1997.
- EDWARDS, J.L.; KING, W.A.; KAWARSKY, S.J.; EALY, A.D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 209-223, 2001.
- ELVINGER, F.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. Interactions of heat stress and bovine somatotropin affecting physiology and immunology of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 449-462, 1992.
- ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAGATA, S. A caspase- activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v. 391, p. 43-50, 1998.

- ERICKSON, B.H. Developmental and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 10, p. 97-105, 1966.
- FABIAN, D.; IL'KOVÁ, G.; REHÁK, P.; CZIKKOVÁ, S.; BARAN, V.; KOPPEL, J. Inhibitory effect of IGF-1 on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 61, p. 745-755, 2004.
- FABIAN, D.; KOPPEL, J.; MADDOX-HYTTEL, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, v. 64, p. 221-231, 2005.
- FAN, H.Y.; TONG, C.; CHEN, D.Y.; SUN, Q.Y. Protein kinases involved in the meiotic maturation and fertilization of oocyte. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* (Shanghai), v.34, p.259-65. 2002.
- FAIR, T.; HITTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 503-512, 1996.
- FAS/USDA. **Foreign Agricultural Service - United States Department of Agriculture**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov>>. Acesso em: 20 Jan 2013.
- FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária - A Arte do Diagnóstico**. 2ed, Ed Roca, p. 754 , 2008.
- FERRAZ, M.L.; WATANABE, Y.F.; SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L.; BARUSELLI, P.S. Influência dos meses do ano no número, na qualidade oocitária e na produção in vitro de embriões em vacas Nelore (*Bos indicus*). **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, Goiania-GO. CBRA, 16, 1-1, 2005.
- FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M.R.; FERRAZ, M.L.; ARAÚJO, A.B.; RODRIGUES, C.A.; WATANABE, Y.F.; VIREQUE, A.A.; JOAQUIM, D.C.; SMITH, L.C.; MEIRELLES, F.V.; BARUSELLI, P.S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **J Dairy Sci.**, 94:2383-2392, 2011.
- FINCH, V.A.; WESTERN, D. Cattle colours in pastoral herds: natural selection or social preference. **Ecology**, v. 58, p. 1384, 1977.
- FINCH, V.A. Body temperature in cattle: Its control and relevance to production in the tropics. **J. Anim. Sci.**, v. 62, p. 531-542, 1986.
- FRISCH, J.E.; VERCOE, J.E. An analysis of growth of different cattle genotypes reared in different environments. **J. Agric. Sci.**, Cambridge, v.103, n.1, p.137-153, 1984.
- FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.
- FUKADA, R.; HIROTA, K.; FAN, F.; JUNG, Y.D.; ELLIS, L.M.; SEMENZA, G.L. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 38205-38211, 2002.

- FUQUAY, J.W. Heat stress as it affects animal production. **J. Anim. Sci.**, v. 52, p.164, 1981.
- FUQUAY, J.W.; FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Encyclopedia of dairy science**. 2ed, Elsevier Ltd, v. 4, p. 567- 574, 2011.
- GALLAGHER, E. J.; LEROITH, D. Minireview: IGF, Insulin, and Cancer. **Endocrinology**, v.152, p. 2546-2551. 2011.
- GAALAAS, R.F. Effect of atmospheric temperature on body temperature and respiration rate of Jersey cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 28, p. 555-563, 1945.
- GARCÍA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F.; BECH-SABAT, G.; SANTOLARIA, P.; YÁÑIZ, J.L.; NOGAREDA, C.; DE RENSIS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Climate factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain. **Theriogenology**, v. 67, p. 1379–1385, 2007.
- GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; BIGGERS, B.G. Effect of heat stress on conceptus and uterine secretion in the bovine. **Theriogenology**, v. 29, p. 1075-1082, 1988.
- GENDELMAN, M.; AROYO, A.; YAVIN, S.; ROTH, Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v.140, p. 73–82, 2010.
- GERSHON, E.; PLAKS, V.; DEKEL, N. Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 282, p. 18-25, 2008.
- GIMENES, L.U. Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular. São Paulo, Brasil: USP. **Tese** 2010
- GINTER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K. Activin A, Estradiol, and Free Insulin-Like Growth Factor I in Follicular Fluid Preceding the Experimental Assumption of Follicle Dominance in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 14– 19, 2002.
- GONSALVES, P.B.D; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M.M.; DA COSTA, L.F.S. **Produção in vitro de embriões. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1º edição. Livraria Varela, p. 195-226, 2002.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; OTER, M.; MARTÍNEZ-MADRID, B.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Differential expression of two genes located on the x chromosome between male and female in vitro produced bovine embryos at the blastocyst stage. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 55, p. 146-151, 2000.
- 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, p. 873-877, 1973.
- GWAZDAUSKAS, F.C.; THATCHER, W.W.; KIDDY, C.A.; PAAPE, M.J.; WILCOX, C.J. Hormonal patterns during heat stress following PGF2 α - tam salt induced luteal regression in heifers. **Theriogenology**, v.16, p. 271–285, 1981.
- HALES, J.R.S. Interactions between respiratory and thermoregulatory systems of domestic animals in hot environments. **Anim. Biometeorol.**, v. 1, p. 123–131, 1976.
- HALES, J.R.S.; FINDLAY, J. D. The oxygen cost of thermally induced and CO₂-induced hyperventilation in the ox. **Respir. Physiol.**, v. 4, p. 353–362, 1968.

HAMMOND, A.C.; CHASE JR, C.C.; BOWERS, E.J.; OLSON, T.A.; RANDEL, R.D. Heat tolerance in Tuli-, Senepol-, and Brahman-sired F1 Angus heifers in Florida. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 1568-1577, 1998.

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

HANSEN, P.J.; THATCHER, W.W.; EALY, A.D. **Methods for reducing effects of heat stress on pregnancy. Large Dairy Herd Management.** H. H. Van Horn and C. J. Wilcox. Champaign: p. 116-125, 1992.

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

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim Reprod Sci** v. 82-83, p. 349-360, 2004.

HANSEN, P.J. Managing the Heat-Stressed Cow to Improve Reproduction. **Proceedings of the 7 th Western Dairy Management Conference.** Reno, NV. March 9- 11, 2005.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Review of Reproduction**, v. 4, p. 125-134, 1999.

HEAD, H.H. The strategic use of the physiological potential of the dairy cow. **Simpósio leite nos trópicos: novas estratégias de produção**, Botucatu. Anais, p. 38-89, 1989.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HERNÁNDEZ-CÉRON, J.; CHASE JR, C.C.; HANSEN, P.J. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 53-58, 2004.

HERRLER, A.; KRUSCHE, C.A.; BEIER, H.M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biol Reprod**, v. 59, p. 1302-1310, 1998.

HICKMAN, C.F.; CLINTON, M.; AINSLIE, A.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A. HEAT Shock Induces Interferon-TAU Gene Expression by In Vitro- Produced Bovine Blastocysts. **Am J of Reprod Immunol.** 2013

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International review of cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

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

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

IBGE, 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, **Censo 2010**.

- INGRAHAM, R.H.; STANLEY, R.W.; WAGNER, W.C. Seasonal effects of tropical climate on shaded and nonshaded cows as measured by rectal temperature, adrenal cortex hormones, thyroid hormone, and milk production. **Am. J. Vet. Res.**, v. 40, p. 1792–1797, 1979.
- ISPADA, J.; LIMA, R.S.; RISOLIA, P.H.B.; ANDRADE, E.S.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A.; PAULA-LOPES, F.F. The role of insulin-like growth factor-I on inhibition of heat-induced apoptosis in bovine oocytes. **Anim. Reprod.**, v. 7, n. 3, p. 333, 2010.
- IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1687-1695, 2007.
- IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A.P.N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, dez. 2008.
- ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum- free medium. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1099-1105, 2002.
- JOHNSON, H.D. Depressed chemical thermogenesis and hormonal functions in heat. In: **Environmental Physiology: Aging, Heat, and Altitude**. Elsevier / North Holland, New York, pp. 3–9, 1980.
- JONES, J.I., CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr. Rev.**, v. 16, p. 3-34, 1995.
- JOUSAN, F.D.; HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biol Reprod.**, v. 71 (5), p. 1665-1670, 2004.
- JOUSAN, F.D.; HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. **Mol Reprod Dev.**, v. 74, p. 189-196, 2007.
- JU, J.C.; JIANG, S.; TSENG, J.K.; PARKS, J.E.; YANG, X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 64, p. 1677- 1689, 2005.
- JU, J.C. Celular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. *Animal Reproduction*, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 79-90, April/June, 2005.
- KABUGA, J.D. The influence of thermal conditions on rectal temperature, respiration rate and pulse rate of lactating Holstein-Friesian cows in the humid tropics. **Int J Biometeorol**, v. 36, n. 3, p.146-50,1992.
- KAMIJO, Y.I.; LEE, K.; MARCK, G.W. Active cutaneous vasodilation in resting humans during mild heat stress. **J. of Applied Phys.**, v. 98, n. 3, p. 829-837, 2005.
- KAMWANJA, L.A.; CHASE JR, C.C.; GUTIERREZ, J.A.; GUERRIERO, V.J.; OLSON, T. A.; HAMMOND, A.C.; HANSEN, P.J. Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. **J Anim Sci**, v. 72, p. 438-444, 1994.

- KIBLER, H.H.; BRODY, S. Environmental physiology with special reference to domestic animals. XVIII. Influence of increasing temperature on heat production and cardiorespiratory activities in Brown Swiss and Brahman cows and heifers. **Univ. Missouri Agric. Exp. Stat. Res. Bull.** No. 475, 1951.
- 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.
- KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, v. 68(5), p. 1584-1589, 2003.
- KRUIP, T.A.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 675-84, 1994.
- KURZAWA, R.; GLABOWSKI, W.; BACZKOWSKI, T.; WISZNIEWSKA, B.; MARCHLEWICZ, M. Growth factors protect *in vitro* cultured embryos from the consequences of oxidative stress. **Zygote**, v. 12, p. 231-240, 2004.
- LAMBERT, K.J.; BIRCH, J.R. **Animal Cell Biotechnology** (Spier, R.E. and Griffiths, J.B., eds.), Academic Press, New York, p. 85-122, 1985.
- LAWSON, K.A.; HAGE, W.J. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. **Ciba Foundation Symposium** 182, p. 68-84, 1994.
- LEE J.A.; ROUSSEL, J.D.; BEATTY, J.F. Effect of temperature season on bovine adrenal cortical function, blood cell profile, and milk production. **J Dairy Sci**, v. 59, p. 104-108, 1974.
- LEIBFRIED L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **J. Anim. Sci.**, v. 48 (1), p. 76-86, 1979.
- LEROITH, D.; WERNER, H.; BEITNER-JOHNSON, D.; ROBERTS, C.T.JR. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. **Endocr Rev.**, v. 16, p. 143-163, 1995.
- LEMERLE, C.; GODDARD, M.E. Assessment of heat stress in dairy cattle in Papua New Guinea. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 18, p. 232-242, 1986.
- LEW, B.J.; MEIDAN, R.E.; WOLFENSON, D. Concentrações hormonais e desenvolvimento folicular de vacas leiteiras em hipertermia sazonal e aguda. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 816-822, 2006.
- LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHARDJO, I.; SRINIVASULA, S. M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E. S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-Dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell Press**, v. 91, p. 479-489, 1997.
- LIMA, R.S. O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em óócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa. Botucatu, Brasil: UNESP. **Tese** 2012.
- LINDL, T. "Zell- und Gewebekultur"; 4. Auflage; Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2000

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.

Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 146-152, 2000.

LOPEZ, H.; SATTER, L.D.; WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Anim Reprod Sci.**, v. 81, p. 209-223, 2004

LOUHIO, H.; HOVATTA, O.; SJOBERG, J.; TUURI, T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, p. 694-698, 2000.

LUCY, M.C.; BECK, J.; STAPLES, C.R.; HEAD, H.H.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor I (IGF-I) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. **Reprod Nutr Dev**, v. 32, p. 331-341, 1992.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 657-665, 1998.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J.J. Growth rates of follicles in the ovary of cow. **Reproduction & Fertility**, v. 81, p. 301-307, 1974.

MACHADO, P.F. Efeitos da alta temperatura sobre a produção, reprodução e sanidade de bovinos leiteiros. **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AMBIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE LEITE**, Piracicaba: FEALQ. Anais. p. 179-188, 1998.

MAIA, A.S.C.; DASILVA, R.G.; BATTISTON LOUREIRO, C.M. Sensible and latent heat loss from the body surface of Holstein cow in a tropical environment. **Int. J. of Biomet.**, v. 50, n. 1, p. 17-22, 2005.

MAKAREVICH, A.V.; MARKKULA M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 386-92, 2002.

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

MALAYER, J.R.; HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in heat-shock induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. **J Anim Sci**, v. 68, p. 266-280, 1990.

MARAIA, I.F.M.; HAEDEBB, A.A.M. Buffalo's biological functions as affected by heat stress — a review. **Livest. Sci.**, v. 127, p. 89-109, 2010.

Marcheto, F.G.; Nãas, I.A.; Salgado, D.D.A.; Souza, S.R.L. Efeito das temperaturas do bulbo seco e do globo negro e do índice de temperatura e umidade, em vacas em produção alojadas em sistema de free stall. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 6, p. 1-8, 2002.

MARTELLO L.S.; JÚNIOR H.S.; LUZ E SILVA S.; TITTO E.A.L. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 33, p. 181-191, 2004.

MARTELLO, L.S. Interação animal ambiente: efeito do ambiente climáticos sobre as respostas fisiológicas e produtivas de vacas Holandesas em free stall. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, **Tese Doutorado** 2006.

MARTIN, S. J.; REUTELINGSPERGER, C. P. M.; MCGAHON, A. J.; RADER, J. A.; VAN SCHIE, R. C. A. A.; LAFACE, D. M.; GREEN, D. R. J. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p. 1545-1556, 1995.

MARTINELLI JR, C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. Fisiologia do eixo GH-sistema IGF. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, p. 717-725, 2008.

MAYES, M.; SIRARD, M.A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 911-920, 2001.

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

MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse. **Developmental Biology**, v. 262, p. 1-15, 2003.

MCGUIRE, M.A.; BEEDE, D.K.; DELORENZO, M.A.; WILCOX, C.J.; HUNTINGTON, G.B.; REYNOLDS, C.K.; COLLIER, R.J. Effects of thermal stress and level of feed intake on portal plasma flow and net fluxes of metabolites in lactating cows. **J. Anim. Sci.**, v. 67, n. 4, p. 1050-1060, 1989.

MENDONÇA, F.; DANNI-OLIVEIRA, I.M. **Climatologia: noções básicas e climas do Brasil**. São Paulo: oficina de texto, 2007.

MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

MINGOTI, G.Z.; CAIADO CASTRO, V.S.D.; MELO, S.C.; BARRETTO, L.S.S.; GARCIA, J.M. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured *in vitro*. **Zygote**, v. 17, p. 321-328, 2009.

MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J.; BADINGA, L.; THATCHER, W.W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 895-907, 2002.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Dev Biol**, v. 213, p. 1-17, 1999.

MOTA, L.S. Adaptação e interação genótipo-ambiente em vacas leiteiras. 1997. 69f. **Tese** (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

- MOTLIK, J.; KOEFOED-JOHNSSEN, H.H.; FULKA, J. Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated In vitro. **Journal of Experimental Zoology**, v. 205, p. 377-384, 1978.
- MOTYL, T. Regulation of apoptosis: Involvement of Bcl-2-related proteins. **Reproduction Nutrition Development**, v. 39(1), p. 49-59, 1999.
- NÃÃS, I.A. **Princípios de Conforto Térmico na Produção Animal**. São Paulo: SP. (ed.) Editora Ícone, 340p.,1989.
- NEBEL, R.L.; JOBST, S.M.; DRANSFIELD, M.B.G.; PANDOLFI, S.M.; BAILEY, T.L. Use of radio frequency data communication system, HeatWatch, to describe behavioral estrus in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 179, 1997.
- NEIVA, S.R. Produção de Bovinos Leiteiros. **Lavras: UFLA**, p. 534, 1998.
- NIBART, M.; SILVA PEIXER, M.; THUARD, J. M.; DURANT, M.; GUYADER-JOLY, C.; PONCHON, S.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: **RÉUNION A.E.T.E.**, 11; 1995, Hannover, Proceedings, p.216, 1995.
- NISHIZUKA, Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. **Nature**, v. 334, p. 661-665, 1988.
- NRC. A Guide to Environmental Research on Animals. **Natl. Acad. Sci.**, Washington, DC, 1971.
- NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMANB, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, p. 179-195, 2004.
- OLIVEIRA, J.C.; SIVIERO-MIACHON, A.A.; SPINOLA-CASTRO, A.M.; BELANGERO, V.M.S.; GUERRA-JUNIOR, GIL. Baixa estatura na doença renal crônica: fisiopatologia e tratamento com hormônio de crescimento. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, p. 783-791, 2008.
- PAIVA, F.P.; COSTA, D.S. Mortalidade embrionária Precoce: Fatores implicados e avaliação-ultrasonográfica. **Scientia**, v. 5, p. 105-121, 2004.
- PALMA, G. A.; MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced **in vitro**. **J Reprod Fertil**, v. 110, p. 347-353, 1997.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol Reprod**, v.38 p.1171-80. 1988
- PATTERSON, S.; SPAHR, C.S.; DAUGAS, E.; SUSIN, S.A.; IRINOPOULOS, T.; KOEHLER, C.; KROEMER, G. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. **Cell Death Differ**, v. 7, p. 137-144, 2000.
- PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Breed differences in resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock. International Embryo Transfer Society, Omaha (Nebraska). **Theriogenology**, v. 55, p. 436, 2001.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 295 (1), p. 37-42, 2002.

PAULA-LOPES, F.F.; CHASE, C.C.J.; AL-KATANANI, Y.M.; KRININGER, C.E.; RIVERA, R.M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A.C.; OCON, O.M.; OLSON, T.A.; HANSEN, P.J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 125, p. 285–294, 2003.

PAULA-LOPES, F.F.; 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.**, v. 76, p. 532-541, 2006.

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

PEREIRA, C.C.J. **Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005.

PEGORER, M.F.; VASCONCELOS, J.L.; TRINCA, L.A.; HANSEN, P.J.; BARROS, C.M. Influence of sire and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactating Holstein cows during summer heat stress. **Theriogenology**, v. 67, p. 692-697, 2007.

PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 62, p. 665–675, 1935.

PINARELLI, C. The effect of heat stress on milk yield. **Latte**, Milan, v. 28, n. 12, p. 36-38, 2003.

PIRES, M.F.A.; FERREIRA, A.M.; COELHO, S.G. Estresse calórico em Bovinos de Leite. **Caderno técnico de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 29, p. 23-37, 1999.

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

PUSHPAKUMARA, P.G.; ROBINSON, R.S.; DEMMERS, K.J.; MANN, G.E.; SINCLAIR, K.D.; WEBB, R.; WATHES, D.C. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrus and during early pregnancy. **Reproduction**, v. 123, p. 859–868, 2002.

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, p. 195-209, 1988.

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

- PUTNEY, D.J.; DROST, M.; THATCHER, W.W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenology**, v. 31, p. 765-778, 1989.
- RACOWSKY, C. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, p. 9-21, 1985.
- RAMOS, A.A.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; POLISSENI, J.; HENRY, M. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção in vitro de embriões em vacas Gir. **R. Bras. Zootec.**, v. 36, n. 2, 2007.
- RAVAGNOLO, O.; MISZTAL, I. Genetic component of heat stress in dairy cattle, parameter estimation. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 2126-2130, 2000.
- RAHMAN, A.N.M.A.; ABDULLAH, R.B.; WAN-KHADIJAH, W.E. Gametogenesis, fertilization and early embryogenesis in mammals with a special reference to goat: a review. **Journal of biological sciences**, v. 8, p. 1115-11128, 2008.
- RENSIS, F.D.; SCARAMUZZI, J.R. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. **Theriogenology**, v. 6, p. 1139-1151, 2003.
- RISOLIA, P.H.B.; LIMA, R.S.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A.; PAULA-LOPES, F.F. The role of insulin-like growth factor-I on developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock. **Biol Reprod**, v. 44 p. 79-79. 2011.
- RISOLIA, P.H.B.; LIMA, R.S.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A.; PAULA-LOPES, F.F. Dose-dependent effect of insulin-like growth factor-I on developmental competence of bovine oocytes. SBTE – **Encontro anual da sociedade brasileira de tecnologia de embrião**. 2012.
- RIVERA, R.M.; AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Short communication: Seasonal effects on development of bovine embryos produced by in vitro fertilization in a hot environment. **J. Dairy Sci.**, v.83, p. 305-307, 2000.
- RIVERA, R.M.; HANSEN, P.J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **J. Reproduction**, v. 121, p. 107-115, 2001.
- ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; GADD, T.S.; LAMMING, G.E.; WATHES, D.C. The expression of the IGF system in the bovine uterus through-out the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Endocrinology**, v. 165, p. 231-243, 2000.
- ROBINSON, N.E. Homeostase, Termorregulação. Cunningham, J G.; **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3. ed. p. 550-561. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2004.
- ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R.; LIM, J.M.; BLAIR, R.M.; ROUSSEL, J.D.; GODKE, R.A.; HANSEN, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in Bos taurus but not in Bos indicus cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 657-665, 1998.
- ROMAN-PONCE, H.; THATCHER, W.W.; CANTON, D.; BARRON, D.H.; WOLCOX, C.J. Thermal Stress Effects on Uterine Blood Flow in Dairy Cows. **Journal Animal Science**, v. 46, p. 175-180, 1978.

- ROSE, T.A.; BAVISTER, B.D. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. **Mol Reprod**, v. 31, p. 72-77, 1992.
- ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 83-90. 2000
- ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v. 122, p. 737-744, 2001.
- ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Involvement of Apoptosis in Disruption of Developmental Competence of Bovine Oocytes by Heat Shock During Maturation. **Biol Reprod**, v. 71, p. 1898-1906, 2004.
- ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v. 129, p. 235-244, 2005.
- RÜSSE I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p.77-92, 1983.
- SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; YAMAUCHI, N.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NAGAI, T.; FIRST, N.L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors *in vitro*. **Reproduction**, v. 123, p. 135- 142, 2002.
- SAKAHIRA, H.; ENARI, M.; NAGATA, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**, v. 391, p. 96-99, 1998.
- SARTORELLI, E.S.; SATRAPA, R.A.; BARCELOS, A.C.Z.; POTIENS, J.R.; BARROS, C.M. Influence of heat stress on apoptosis rate of in vitro produced bovine embryos (*indicus* vs *taurus*) and in their capacity to originate pregnancies. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 474, 2006.
- SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.; WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **J Dairy Sci.**, v. 87, p. 905-920, 2004.
- SATRAPA, R.A. influência dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e II), seus receptores (IGF-R I e II), proteínas ligantes (IGFBP-2 e 4) e papp-a na aquisição de tolerância ao estresse térmico de embriões bovinos (Nelore vs Holandês) produzidos in vitro. Botucatu, Brasil: UNESP. **Tese** 2011.
- SATRAPA, R.A.; CASTILHO, A.S.; RAZZA, E.M.; PEGORER, M.F.; PUELKER, R.; BARROS, C.M. Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3-4, p. 155-158, 2013.
- SCHMITZ, I.; KIRCHHOFF, S.; KRAMMER, P.H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, p. 1123-1136, 2000.

- SENBON, S.; HIRAO, Y.; MIYANO, T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, p. 259-269, 2003.
- SCHULTZ, G.A.; HOGAN, A.; WATSON, A.J.; SMITH, R.M.; HEYNER, S. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transport: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. **Reprod. Fertil. Develop.**, v. 4, p. 361-371, 1992.
- SINGH, B.; ARMSTRONG, D.T. Insulin-like growth factor-I, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 1370-1375, 1997.
- SILVA, G.R. **Introdução à Bioclimatologia Animal**. São Paulo - Ed.: Nobel 2000.
- SINGH, S.P.; NEWTON, W.M. Acclimatization of young calves to high temperatures: physiological responses. **Am. J. Vet. Res.**, v. 39, p. 795-797, 1978.
- SMITH, B.P. **Tratado de medicina interna dos grandes animais**. 1 ed. São Paulo: Manole, v. 1, cap. 1, p. 3-15, 1993.
- SMITH, W.L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. **Biochemistry Journal**, v. 259, p. 315-324, 1989.
- SODHI, M.; MUKESH, M.; KISHORE, A.; MISHRA, B. P.; KATARIA, R. S.; JOSHI, B. K. Novel polymorphisms in UTR and coding region of inducible heat shock protein 70.1 gene in tropically adapted zebu cattle (*Bos indicus*) and riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). **Gene**, disponível online 19 de junho de 2013.
- SPICER, L.J.; ENRIGHT, W.J. Concentrations of insulin-like growth factor I and steroids in follicular fluid of preovulatory bovine ovarian follicles: effect of daily injections of a growth hormone-releasing factor analog and(or) thyrotropin- releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1133-1139, 1991.
- SPICER, L.J.; SANTIAGO, C.A.; DAVIDSON, T.R.; BRIDGES, T.S.; CHAMBERLAIN, C.S. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 573-581, 2005.
- SPINOLA E CASTRO, A. M.; GUERRA-JÚNIOR, G. GH/IGF e neoplasia: o que há de novo nesta associação. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, p. 833-842, 2005.
- STEIN, A. Decreasing variability in your cell culture. **Biotechniques**, v. 43, p. 228-229, 2007.
- STOTT, G.H.; WILLIAMS, R.J. Causes of low breeding efficiency in dairy cattle associated with seasonal high temperatures. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p. 1369-1375, 1962.
- SWENSON, M.J.; REECE, WO. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- TAKUMA, T.; SAKAI, S.; EZOE, D.; ICHIMARU, H.; JINNOUCHI, T.; KAEDEI, Y.; NAGAI, T.; OTOI, T. Effects of Season and Reproductive Phase on the Quality, Quantity and Developmental Competence of Oocytes Aspirated from Japanese Black Cows. **J. Reprod. Dev.**, v. 56, p. 55-59, 2010.

- TERUI, S.; ISHINO, S.; MATSUDA, K.; SHOJI, Y.; AMBO, K.; TSUDA, T. Effect of experimental high environmental temperature and humidity on steers. **Tohoku J. Agric. Res.**, v. 30, p. 95–107, 1979.
- THATCHER, W.W.; COLLIER, R.J. Effects of climate on bovine reproduction. **Current Therapy in Theriogenology** 2, p. 301–309. W. B. Saunders, Philadelphia, 1986.
- THATCHER, W.W.; FLAMENBAUM, I.; BLOCK, J.; BILBY, T.R. Interrelationships of Heat Stress and Reproduction in Lactating Dairy Cows. **Anais: XIV Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**, p. 2-25, 2010.
- TILLY, J.L. Commuting the death sentence: how oocyte strive to survive. **Nature Rev Mol Cell Biol**, v. 2, p. 838-848, 2001.
- TITTO, E.A.L. Clima: influência na produção de leite. Ambiência na produção de leite em clima quente. **Simpósio brasileiro de ambiência na produção de leite**. Anais. Piracicaba: fealq, p. 10-23, 1998.
- TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PIRES, M.F.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; RAMOS, A.A.; FOLHADELLA, I.M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; SÁ FILHO, M.F.; SOUZA, A.H.; MARTINS, L.M.; BARUSELLI, P.S. **Acta Scientiae Veterinariae** (Suplemento 1) 2006, 34, s284.
- TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PIRES, M.F.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; RAMOS, A.A.; FOLHADELLA, I.M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; SÁ FILHO, M.F.; PAULA-LOPES, F.F.; BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 155-166, 2008.
- TROUT, J.P.; MCDOWELL, L.R.; HANSEN, P.J. Characteristics of the estrous cycle and antioxidant status of lactating Holstein cows exposed to heat stress. **J Dairy Sci**, v. 81, p. 1244-1250, 1998.
- TURNER, H.G. Genetic variation of rectal temperature in cows and its relationship to fertility. **Animal Production**, v. 35, p. 401-412, 1982.
- ULBERG, L.C.; BURFENING, P.J. Embryo death resulting from adverse environment on spermatozoa or ova. **J. Anim. Sci.**, v. 26, p. 571-577, 1967.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.
- VEERASAMY, S.; NAQVI, S.M.K.; EZEJI, T.; LAKRITZ, J.; LAL, R. **Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production**, Springer heildeberg, New York, Dordrecht, London, 2012.
- VILELA, R.A. Comportamento e termorregulação de vacas holandesas lactantes frente a recursos de ventilação e nebulização em estabulação livre. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, **Dissertação**, 2008.
- WANG, L.M.; FENG, H.L.; MA, Y.ZH.; CANG, M.; LI, H.J.; YAN, ZH.; ZHOU, P.; WEN, J.X.; SHORGAN BOU; LIU, D.J. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 99-108. 2009.

- WEST, J.W. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 2131-2144, 2003.
- WHEELOCK, J.B.; RHOADS, R.P.; VANBAALE, M.J.; SANDERS, S.R.; BAUMGARD, L.H. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 93, p. 644-655, 2010.
- WIERSMA, F. **Department of Agricultural Engineering**, University of Arizona, Tuscon, 1990.
- WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, p. 17-29, 2006.
- WOLFENSON, D.; BARTOL, F.F.; BADINGA, L.; BARROS, C.M.; MARPLE, D.N.; CUMMINGS, K.; WOLFE, D.; LUCY M.C.; SPENCER, T.E.; THATCHER, W.W. Secretion of PGF2a and oxytocin during hyperthermia in cyclic and pregnant heifers. **Theriogenology**, v. 39, p. 1129-1141, 1993.
- WOLFENSON, D.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L.; SAVIO, J. D.; MEIDAN R.; LEW B. J.; BRAW-TAL, R.; BERMAN, A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**, v. 52, p.1106-1113. 1995.
- WYLLIE, A.H. Apoptosis: an overview. **British Medical Bulletin**
- XU, K.P.; BRACKET, B.G. A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **J Reprod Fertil**, v. 82, p. 127-134, 1988.
- YOSHIDA, Y.; MIYAMURA, M.; HAMANO, S.; YOSHIDA, M. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 60, p. 549-54, 1998.
- YOSHIMURA, Y.; ANDO, M.; NAGAMATSU, S.; IWASHITA, M.; ADACHI, T.; SUEOKA, K.; MIYAZAKI, T.; KUJI, N.; TANAKA, M. Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. **Biol Reprod.**, v.55, p. 152-160, 1996.
- YOUSEF, M.K. Stress physiology: definition and terminology. **Stress physiology in livestock**, v. 1, p. 3-7, 1985.
- ZHANDI, M.; TOWHIDI, A.; NASR-ESFAHANI, M. H.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; ZARE-SHAHNEH, A. Unexpected detrimental effect of Insulin like growth factor-1 on bovine oocyte developmental competence under heat stress. **J Assist Reprod Genet**, v. 26 p.605-611. 2009.
- ZHAO, J.; TAVERNE, M.A.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; BEVERS, M.M.; VAN DEN, H.R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p. 287-296, 2001.
- 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, p. 447-454, 2001.

ANEXOS

Figura 46 – Categorias de ITU. Figura baseada na classificação de Armstrong, 1994

Umidade Relativa (%)

TBS (°C)		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
	20	63	63	63	64	64	64	64	65	65	65	66	66	66	66	67	67	67	67	68
	22	64	65	65	66	66	66	67	67	67	68	68	69	69	69	70	70	70	71	71
	24	66	67	67	68	68	69	69	70	70	70	71	71	72	72	73	73	74	74	75
	26	68	69	69	70	71	71	72	73	73	74	74	74	75	75	76	77	77	78	78
	28	70	70	71	72	72	73	74	74	75	76	76	77	78	78	79	80	80	81	82
	30	71	72	73	74	74	75	76	77	78	78	79	80	81	82	83	83	84	85	85
	32	73	74	75	76	77	77	78	79	80	81	82	83	84	84	84	85	86	87	88
	34	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	84	85	85	86	87	87	89	90	91
	36	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	89	90	90	90	93	95
38	78	79	81	82	83	84	85	86	88	89	90	91	91	92	93	94	95	96	97	
40	80	81	82	84	85	86	88	89	90	91	93	94	95	95	96	97	98	98	99	
Ausência de estresse Estresse moderado Estresse térmico Estresse severo à morte																				

Figura 47 – Índice de temperatura e umidade (ITU) calculado com base nos dados da estação meteorológica do campus da USP em Pirassununga (jan-08 até Dez-11).

Análise do ITU em Pirassununga (Janeiro de 2008 até Dezembro de 2011)												
Horas	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
00:00	69,08	69,76	68,72	65,28	59,59	55,75	57,65	58,85	63,05	65,35	67,76	69,09
01:00	68,62	69,25	68,24	64,67	58,87	54,94	56,93	57,84	62,22	64,86	67,08	68,49
02:00	81,29	68,79	67,74	64,06	58,06	54,17	55,91	56,89	61,49	64,42	66,42	68,02
03:00	67,87	68,30	67,28	63,52	57,42	53,46	55,14	56,09	60,74	64,03	65,82	67,53
04:00	64,40	67,80	66,76	62,84	56,80	52,88	54,52	55,36	60,10	63,52	65,30	67,12
05:00	67,04	67,33	66,37	62,27	56,20	52,38	53,98	54,65	59,43	63,01	64,89	66,74
06:00	67,02	67,20	66,23	61,88	55,59	52,04	53,54	54,20	59,34	63,93	65,44	66,87
07:00	67,98	68,37	67,88	63,53	56,59	52,53	54,00	56,27	62,48	67,18	67,82	68,35
08:00	70,42	71,26	70,65	67,15	60,51	55,95	58,23	61,77	66,46	70,00	70,96	70,97
09:00	72,61	74,23	73,20	70,26	64,45	60,09	62,55	65,68	69,35	72,26	73,13	73,17
10:00	74,44	76,22	75,10	72,54	67,62	63,82	66,20	68,43	71,62	73,96	74,93	75,10
11:00	75,90	77,62	76,50	74,33	69,92	66,59	68,96	70,52	73,30	75,43	76,28	76,59
12:00	76,84	78,58	77,42	75,49	71,47	68,70	70,73	71,85	74,36	76,45	77,13	77,70
13:00	77,41	79,25	77,97	76,06	72,42	70,03	71,84	72,62	74,87	76,47	77,85	78,35
14:00	77,50	79,47	78,37	76,20	72,80	70,64	72,35	72,98	75,01	76,38	78,10	78,55
15:00	77,26	79,34	78,15	76,23	72,83	70,84	72,36	73,01	74,91	76,00	77,98	78,22
16:00	76,77	78,72	77,67	75,84	72,53	70,56	71,85	72,57	74,56	74,90	77,71	77,77
17:00	76,08	77,87	76,49	74,84	70,85	68,51	70,22	71,30	73,48	73,85	76,73	76,75
18:00	75,12	76,54	74,59	71,97	67,37	64,27	66,40	67,27	70,59	71,59	75,41	75,61
19:00	73,59	74,85	72,60	69,57	64,91	61,72	63,64	64,71	68,38	69,73	73,45	74,22
20:00	71,89	72,88	71,27	68,46	63,41	60,21	62,03	63,27	67,18	68,69	71,58	72,50
21:00	70,70	71,85	70,41	67,56	62,27	58,92	60,65	62,01	66,12	67,75	70,39	71,33
22:00	70,01	71,11	69,79	66,70	61,25	57,57	59,53	60,77	65,05	66,90	69,39	70,51
23:00	69,55	70,39	69,16	65,76	60,33	56,49	58,54	59,65	64,05	66,10	68,61	69,88

Ausência de estresse
 Estresse moderado
 Estresse térmico
 Estresse severo à morte

Figura 48 – Umidade relativa do ar coletada da estação meteorológica do campus da USP em Pirassununga (jan-08 até Dez-11).

Análise Umidade Em Pirassununga (Janeiro 2008 até Dezembro 2011)												
Horas	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
0:00	91,84	91,31	91,10	90,20	89,80	90,78	87,98	81,29	80,13	86,85	86,81	90,24
1:00	92,48	92,23	91,84	91,12	90,78	91,68	89,01	83,57	82,08	87,77	88,13	91,26
2:00	93,08	92,88	92,49	91,90	91,78	92,26	90,33	85,19	83,71	88,35	89,34	91,92
3:00	93,70	93,56	93,07	92,54	92,43	92,78	91,23	86,46	85,14	88,97	90,32	92,51
4:00	94,29	94,17	93,48	93,18	92,96	93,20	91,77	87,56	86,27	89,69	91,18	92,96
5:00	94,72	94,64	93,91	93,74	93,29	93,39	92,14	88,56	87,48	90,34	91,99	93,39
6:00	94,90	94,94	94,32	94,12	93,74	93,55	92,58	89,41	88,04	90,30	91,88	93,58
7:00	94,11	93,73	92,83	93,53	93,82	93,77	92,88	88,41	84,65	85,02	88,73	92,10
8:00	90,16	88,91	88,17	88,20	90,03	91,86	88,76	78,68	75,02	78,70	81,86	87,21
9:00	85,06	81,44	81,92	81,08	83,07	86,36	81,00	67,92	67,05	72,66	75,95	82,24
10:00	80,55	74,83	76,62	74,88	75,28	77,96	71,87	60,02	60,56	67,41	70,77	77,23
11:00	75,96	69,53	71,29	68,82	68,51	70,69	63,91	52,79	54,95	63,20	65,70	72,73
12:00	72,45	64,94	67,32	63,54	62,58	63,96	57,40	46,94	50,29	59,86	62,31	68,81
13:00	69,72	61,61	64,25	59,62	58,11	58,56	52,59	43,32	47,36	58,30	59,33	65,44
14:00	68,48	59,56	62,02	57,65	55,74	55,16	49,87	41,01	46,29	57,53	56,89	63,61
15:00	68,79	59,90	61,92	57,12	54,62	53,81	49,10	40,11	45,81	57,48	56,10	63,47
16:00	69,49	61,23	63,33	58,83	55,99	55,08	50,55	41,20	46,57	60,67	55,94	64,08
17:00	71,57	64,44	67,89	63,96	62,69	62,64	57,12	46,40	50,53	64,41	59,98	67,11
18:00	75,10	69,99	74,95	73,61	73,44	74,39	68,42	58,70	59,22	71,11	65,48	71,38
19:00	80,23	77,59	81,25	79,98	79,66	80,15	75,43	65,68	65,95	76,97	72,15	75,92
20:00	85,51	83,69	84,99	82,76	82,77	83,11	79,25	69,85	69,71	80,11	77,87	81,60
21:00	88,58	86,58	87,14	84,77	85,14	85,83	82,47	73,65	72,89	82,30	81,33	84,99
22:00	90,05	88,43	88,46	86,84	87,19	88,38	84,79	76,98	75,80	84,25	83,86	87,00
23:00	90,95	90,28	90,00	88,76	88,84	89,82	86,52	79,61	78,09	85,95	85,89	88,59

Figura 49 – Temperatura do bulbo seco (TBS) coletada da estação meteorológica do campus da USP em Pirassununga (jan-08 até Dez-11).

Análise Temperatura Pirassununga (Janeiro 2008 até Dezembro 2011)				
Horas	Verão	Outono	Inverno	Primavera
0:00	21,02	16,61	14,94	19,77
1:00	20,70	16,20	14,41	19,38
2:00	20,40	15,79	13,84	19,04
3:00	20,13	15,43	13,39	18,71
4:00	19,83	15,07	12,99	18,43
5:00	19,59	14,76	12,64	18,12
6:00	19,55	14,51	12,41	18,42
7:00	20,31	15,20	13,31	20,03
8:00	22,10	17,35	16,19	22,10
9:00	23,98	19,65	18,95	23,84
10:00	25,54	21,72	21,41	25,44
11:00	26,85	23,49	23,55	26,80
12:00	27,86	24,89	25,15	27,80
13:00	28,59	25,84	26,24	28,41
14:00	28,97	26,31	26,79	28,70
15:00	28,86	26,41	26,95	28,57
16:00	28,43	26,03	26,54	28,06
17:00	27,57	24,50	24,86	26,99
18:00	26,26	21,69	21,18	25,30
19:00	24,66	19,83	19,04	23,62
20:00	23,16	18,89	17,93	22,36
21:00	22,32	18,18	17,01	21,55
22:00	21,80	17,55	16,19	20,90
23:00	21,38	16,97	15,52	20,33

Figura 50 – Temperatura do bulbo seco máxima e mínima mensal em Pirassununga (2008 a 2011).

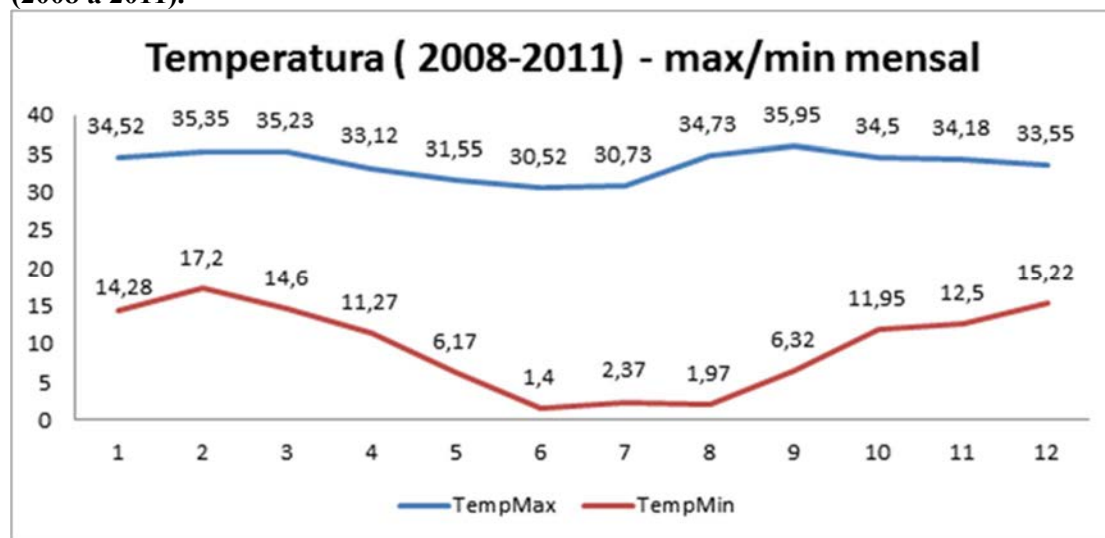


Figura 51 – Temperatura do bulbo seco diária durante o período experimental em Pirassununga nas condições ambientais de Termoneutralidade. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.

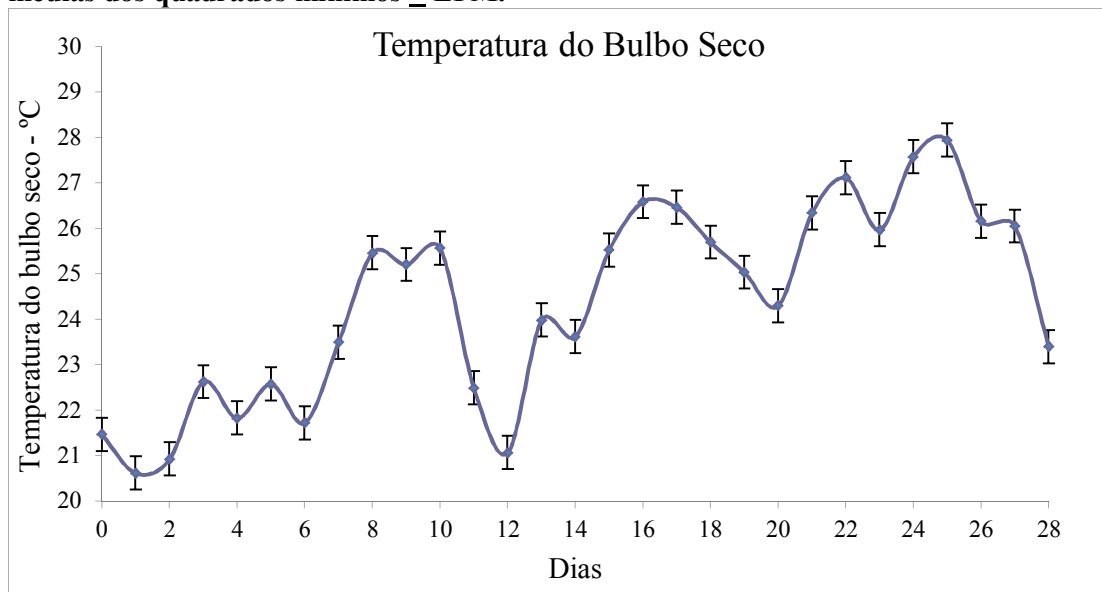


Figura 52 – Umidade relativa do ar diária durante o período experimental em Pirassununga nas condições ambientais de Termoneutralidade. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.

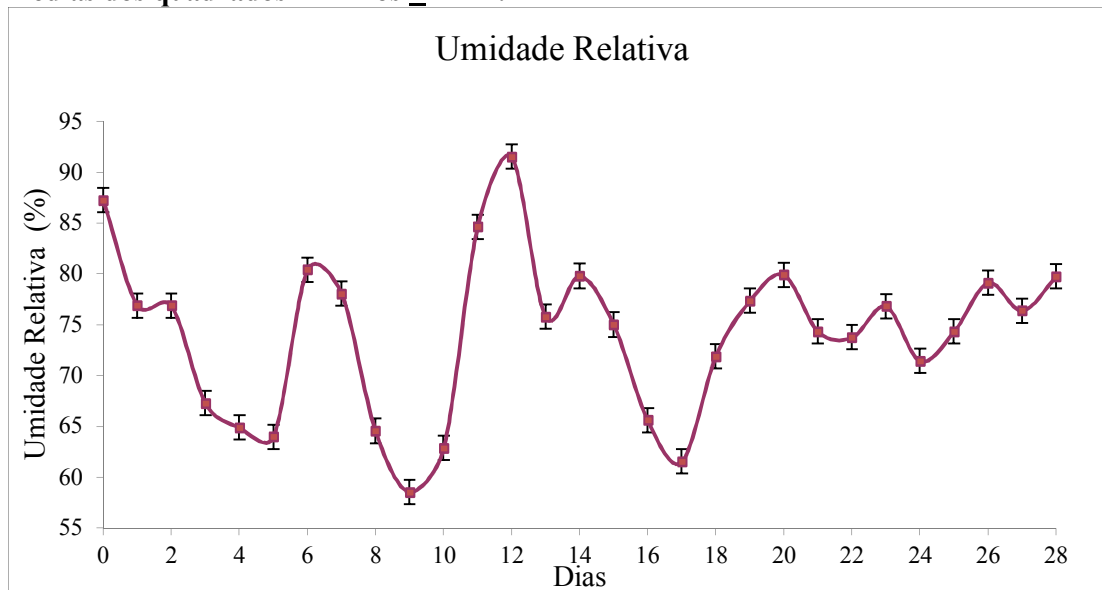


Figura 53 – Temperatura do bulbo seco por hora durante o período experimental em Pirassununga nas condições ambientais de Termoneutralidade. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.

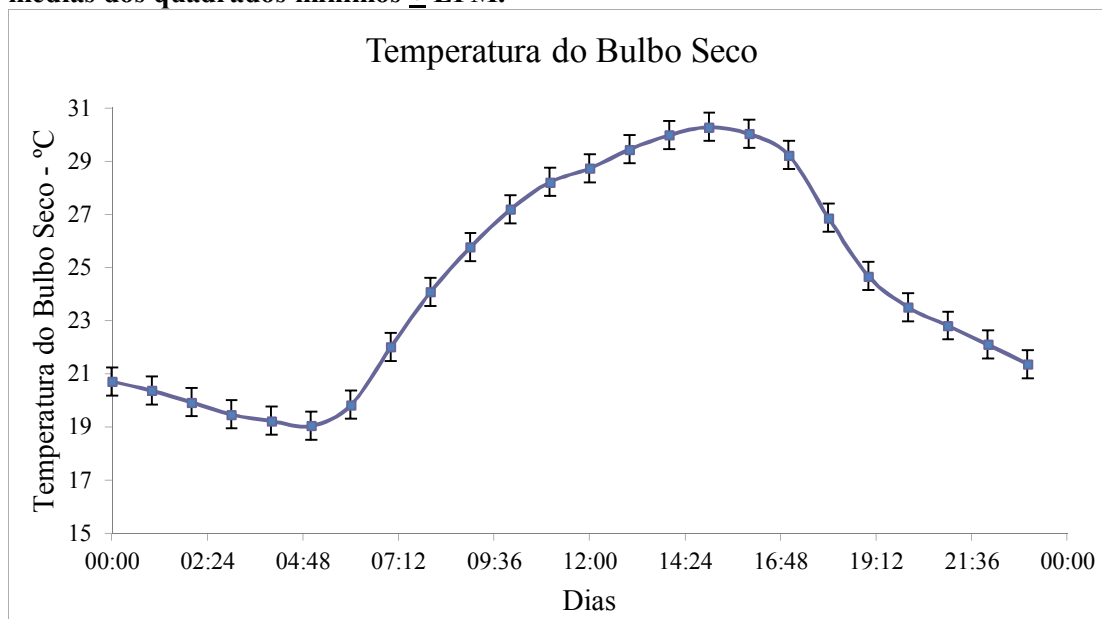


Figura 54 – Umidade relativa do ar por hora durante o período experimental em Pirassununga nas condições ambientais de Termoneutralidade. Os resultados são médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM.

