

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – CCAE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

IZABELLE PEREIRA DE LACERDA

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES E QUALIDADE DE COMPLEXOS
***CUMULUS*-OVÓCITO DE DOADORAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS NO**
VERÃO E INVERNO

ALEGRE-ES

2020

IZABELLE PEREIRA DE LACERDA

**CARACTERÍSTICAS MOLECULARES E QUALIDADE DE COMPLEXOS
CUMULUS-OVÓCITO DE DOADORAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS NO
VERÃO E INVERNO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Nutrição e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José de Oliveira Carvalho Neto

ALEGRE-ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

L131c Lacerda, Izabelle Pereira de, 1995-
Características moleculares e qualidade de complexos
cumulus-ovócito de doadoras de diferentes genótipos no verão e
inverno / Izabelle Pereira de Lacerda. - 2020.
64 f. : il.

Orientador: José de Oliveira Carvalho Neto.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. Zebu. 2. Bovinos. 3. Inverno. 4. Verão. 5. Cumulus. I.
Carvalho Neto, José de Oliveira. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III.
Título.

CDU: 619

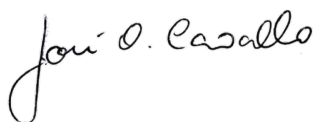
IZABELLE PEREIRA DE LACERDA

**CARACTERÍSTICAS MOLECULARES E QUALIDADE DE COMPLEXOS
CUMULUS-OVÓCITO DE DOADORAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS NO
VERÃO E INVERNO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Nutrição e Reprodução Animal.

Aprovado em 13 de fevereiro de 2020.

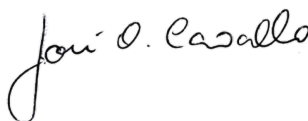
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. José de Oliveira Carvalho Neto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Prof. Dra. Carla Braga Martins
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dra. Maria Clara Caldas Bussiere
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À minha família, em especial minha mãe, Maria da Conceição, e meus irmãos, Danielle e Ângelo, por se fazerem presente mesmo com a distância.

Ao meu orientador, Dr. José de Oliveira Carvalho, pela amizade, por confiar em mim para realização deste projeto, pelos conhecimentos passados e por todos os momentos que compartilhamos ao longo destes quatro anos juntos.

Aos amigos da pós-graduação, por compartilharem as dificuldades e os bons momentos durante os dois anos de mestrado.

À Júlia Delpupo, pelo companheirismo e apoio.

Ao Andrei Fidelis, Otávio Faria, Felipe Ruas, Adomar Neto, Gabriel Moulin, Otávio Olmo e Hugo Zago pela ajuda durante as atividades a campo.

À Dra Margot Dode, por me receber na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, contribuindo com meu crescimento profissional e a realização de parte deste trabalho.

Aos proprietários e funcionários das fazendas Nô da Silva e Santa Luzia, por cederem o espaço e animais para realização deste trabalho.

À Dra. Ligiane Leme e Dr. Maurício Machaim Franco, pela ajuda na realização da análise molecular.

Ao Dr. Luiz Gustavo Siqueire e Dr. João Henrique Viana, por me auxiliarem com a prática de aspiração folicular guiada por ultrassonografia na Embrapa Gado de Leite.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo pelo financiamento deste projeto (EDITAL FAPES/CNPq Nº 04/2017; TERMO DE OUTORGA: 97/2017).

À Universidade Federal do Espírito Santo, pelo curso oferecido.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste projeto e não foram citados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

LACERDA, IZABELLE PEREIRA DE. **Características moleculares e qualidade de complexos *cumulus*-ovócito de doadoras de diferentes genótipos no verão e inverno.** 2020. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia importante para auxiliar na disseminação da genética de animais de interesse zootécnico, resultando em maior produtividade do rebanho. Entretanto, animais *Bos taurus* apresentam pior resultado na PIVE em relação aos *Bos indicus* em condições de clima tropical, possivelmente por serem mais suscetíveis ao estresse e apresentarem metabolismo diferente, o qual pode influir de forma negativa na competência dos ovócitos. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi quantificar a abundância de mRNA de genes relacionados ao estresse térmico (HSPA5), estresse oxidativo (SOD2, GPX3), metabolismo de glicose (SLC2A3) e apoptose (CASP3, FOSL1) em ovócitos e células do *cumulus* (CC) de doadoras das raças Gir (n=10), Holandês (n=7) e ½ Sangue Gir-Holandês (n=12) ao final das estações de verão e inverno. Para isto, cada doadora foi submetida à 4 sessões consecutivas de aspiração folicular (OPU) com 72 horas de intervalo entre elas. Após a OPU, os complexos *cumulus*-ovócito (COCs) foram classificados de acordo com qualidade (graus 1, 2, 3 e 4) sendo os graus 1 e 2, e suas respectivas CC utilizados para análise molecular. A expressão dos genes SLC2A3, HSPA5, SOD2 e FOSL1 para CCs e ovócitos, GPX3 para CCs e CASP3 para ovócitos foi quantificada por PCR em tempo real. Animais zebuínos e mestiços apresentaram maior média de COCs viáveis recuperados ($3,3 \pm 0,3$ e $3,6 \pm 0,6$, respectivamente) em relação aos taurinos ($1,3 \pm 0,3$). A estação de inverno provocou redução na média de COCs totais em zebuínos ($7,5 \pm 0,7$ vs. $5,9 \pm 0,9$) e mestiços ($17,8 \pm 3,4$ vs. $11,2 \pm 0,5$), em quanto o verão foi prejudicial para taurinos ($2,7 \pm 0,9$ vs. $4,2 \pm 1,9$). Com relação a expressão dos genes, as estações do ano não apresentaram efeito sob nenhuma das raças. Ao avaliar a diferença na expressão dos genes entre as raças, independente da estação do ano, os genes HSPA5 e SLC2A3 em ovócitos apresentaram maior expressão em Holandês em relação aos ovócitos de doadoras ½ sangue Gir-Holandês. Para as CC não foi observada diferença na expressão dos genes entre as raças. Conclui-se que a estação do ano apresenta influência na quantidade de COCs recuperados, mas não

na expressão de genes relacionados ao estresse. Além disso, ovócitos de animais taurinos apresentam maior expressão de genes relacionados ao estresse em relação às outras raças, sem que haja diferença na expressão desses genes em células do *cumulus*.

Palavras-chave: *Bos indicus*. *Bos taurus*. Competência ovocitária. Estação do ano. HSPA5. SLC2A3.

ABSTRACT

LACERDA, IZABELLE PEREIRA DE. **Molecular characteristics and quality of cumulus-oocyte complexes from donors of different genotypes in summer and winter.** 2020. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES.

In vitro embryo production (IVEP) is an important biotechnology to assist in the genetic dissemination of animals of zootechnical interest, resulting in greater productivity of the herd. However, *Bos taurus* show worse results in IVEP compared with *Bos indicus* in tropical climate conditions, possibly because they are more susceptible to stress and presents different metabolism, which can negatively influence the oocyte competence. Thus, the objective with this work was to quantify the mRNA of genes related to heat stress (HSPA5), oxidative stress (GPX3, SOD2), glucose metabolism (SLC2A3) and apoptosis (CASP3, FOSL1) in oocytes and cumulus cells (CC) of Gir (n=10), Holstein (n=7) and ½ Holstein-Gir (n=12) donors at the end of summer and winter seasons. For this, each donor was submitted to 4 consecutive follicular aspiration session (OPU) with 72-hour interval between them. After OPU, the cumulus-oocyte complexes (COCs) were classified according to the quality (grades 1, 2, 3 and 4) with grades 1 and 2, and their respective CC used for molecular analysis. The expression of SLC2A3, HSPA5, SOD2 and FOSL1 genes for CCs and oocytes, GPX3 for CCs and CASP3 for oocytes was quantified by real-time PCR. Zebu and crossbred animal had higher average of viable COCs recovered (3.3 ± 0.3 and 3.6 ± 0.6 , respectively) compared to Taurine (1.3 ± 0.3). The winter season caused a reduction in the average of total COCs in zebu (7.5 ± 0.7 vs. 5.9 ± 0.9) and crossbred (17.8 ± 3.4 vs. 11.2 ± 0.5), while the summer was harmful for Taurine (2.7 ± 0.9 vs. 4.2 ± 1.9). Regarding the gene expression, the season had no effect on any breed. Assessing the difference in gene expression between breeds, regardless of the season, the HSPA5 and SLC2A3 genes in oocyte showed greater expression in Holstein compared to oocytes from ½ Holstein-Gir donors. For CCs, no difference was observed in gene expression between breeds. It is concluded that the season has an influence on the amount of COCs recovered, but not on the expression of stress-related genes. In addition, oocytes from Taurine animals show greater expression of stress-related genes than other breeds, with no difference in the expression of these genes in cumulus cells.

Key-words: *Bos indicus*. *Bos taurus*. Oocyte competence. Season. HSPA5. SLC2A3.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Dinâmica Folicular.....	13
2.2 Competência Ovocitária.....	16
2.3 Estresse.....	17
2.3.1 Estresse térmico e apoptose.....	17
2.3.2 Estresse metabólico.....	19
2.3.3 Estresse oxidativo.....	20
2.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões na pecuária de leite.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Comitê de Ética no Uso de Animais.....	23
3.2 Animais e local.....	23
3.3 Aspiração Folicular.....	24
3.4 Abundância relativa de transcritos.....	25
3.5 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Quantidade de ovócitos recuperados.....	28
4.2 Efeito das sessões consecutivas de OPU.....	29
4.3 Abundância relativa de mRNA.....	30
5 DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÕES.....	49
7 REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICE.....	55
APÊNDICE A - Expressão do gene SLC2A3 em ovócitos de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V).....	56
APÊNDICE B - Expressão do gene SOD2 em ovócitos de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V)	57
APÊNDICE C - Expressão do gene HSPA5 em ovócitos de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V)	58

APENDICE D - Expressão do gene FOSL1 em ovócitos de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V)	59
APÊNDICE E - Expressão do gene SLC2A3 em células do <i>cumulus</i> de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V)	60
APÊNDICE F - Expressão do gene SOD2 em células do <i>cumulus</i> de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V)	61
APÊNDICE G - Expressão do gene HSPA5 em células do <i>cumulus</i> de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V)	62
APÊNDICE H - Expressão do gene FOSL1 em células do <i>cumulus</i> de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V)	63
APÊNDICE I - Expressão do gene GPX3 em células do <i>cumulus</i> de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V)	64

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de leite do mundo (RESENDE *et al.*, 2019), apresentando valor bruto de produção (VBP) superior a 48 milhões de reais em 2018. Além disso, foi o segmento da pecuária com maior crescimento de VBP entre 2017 e 2018, havendo expectativas de crescimento para os próximos anos (CNA Brasil, 2018). Entretanto, quando se trata de produtividade, o Brasil ocupa a penúltima posição entre os 20 maiores produtores de leite mundial (RESENDE *et al.*, 2019), demonstrando baixa eficiência de produção neste segmento. Outro fator preocupante para a pecuária de leite, é que na última década as importações de leite superaram as exportações, situação desfavorável para a economia do país. Isto pode ser devido à intensa oscilação climática e nos preços do leite no mercado interno do país (ROCHA; CARVALHO, 2018).

Para que este cenário seja modificado, é necessário melhorar a eficiência de produção dos animais, o que pode ser alcançado, em parte, pela intensificação do trabalho de melhoramento genético. Neste contexto, as biotecnologias reprodutivas podem auxiliar neste processo, em especial a produção *in vitro* de embriões (PIVE), a qual permite a obtenção de maior número de descendentes por fêmea, quando comparada à inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões convencional em um mesmo período (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Além disso, com a PIVE é possível otimizar o cruzamento de raças, tal como o cruzamento de animais taurinos e zebuínos, com o nascimento de produtos $\frac{1}{2}$ sangue. A partir destes cruzamentos, podem ser gerados animais mestiços que apresentam alta produção leiteira associada a maior rusticidade (PONTES *et al.*, 2010; SILVA-SANTOS *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2004).

Atualmente no segmento leiteiro, as raças mais utilizadas na PIVE são Holandês e Girolando, seguidas por Gir, Jersey e Pardo-Suiça (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2018). Entretanto, mesmo com todos os benefícios proporcionados pela PIVE, fatores relacionados às raças das doadoras de ovócitos podem gerar variações nos índices desta biotecnologia (LACERDA *et al.*, 2020; PONTES *et al.*, 2010). É relatado que doadoras *Bos taurus* apresentam menor quantidade de complexos *cumulus*-ovócito (COCs) recuperados e menor taxa de embrião produzida por sessão de aspiração folicular (OPU), quando comparados a doadoras *Bos indicus* (LACERDA *et*

al., 2020; PONTES *et al.*, 2010). Já os animais mestiços, embora apresentem quantidade de COCs superior a taurinos e zebuínos, a taxa de embrião produzida é semelhante (LACERDA *et al.*, 2020; PONTES *et al.*, 2010). Deste modo, estudos são necessários para compreender melhor a fisiologia reprodutiva destes animais, visando maior exploração do potencial reprodutivo na PIVE, uma vez que o gado Girolando é responsável por 80% da produção leiteira no Brasil (SILVA *et al.*, 2014), principalmente os animais meio sangue, que compreendem mais de 55% dos animais Girolando em lactação (ABCG, 2019).

Dentre os fatores que afetam os resultados da PIVE, a qualidade ovocitária ocupa posição de destaque, uma vez que a mesma envolve a competência do ovócito, influenciando a taxa de produção de embrião. A aquisição da competência ovocitária é dependente da interação entre as células presentes no folículo ovariano, como células do *cumulus* (CC), da granulosa e o próprio ovócito (LI *et al.*, 2000; SIRARD *et al.*, 2006; SIRARD, 2019).

A comunicação celular no microambiente folicular ocorre por sinalização parácrina, autócrina e endócrina, vesículas extracelulares presentes no fluido folicular, por projeções transzonais e ligações *gap* (revisado por DEL COLLADO *et al.*, 2018). Devido a um mecanismo complexo e dependente da comunicação com outras células, a competência do ovócito pode ser comprometida por diferentes fontes de estresse, de acordo com o ambiente em que o animal se encontra inserido.

O estresse oxidativo está entre os fatores que contribuem para a baixa qualidade de ovócitos, comprometendo a fertilidade do mesmo (ARIAS-ÁLVAREZ *et al.*, 2018). Outro fator que pode inferir na competência ovocitária é o estresse térmico (ROTH; HANSEN, 2004), o qual pode exercer influência de forma diferente, de acordo com a raça da doadora, uma vez que animais taurinos são menos termotolerantes que zebuínos (HANSEN, 2004). Além do aumento na temperatura, o qual apresenta efeito direto nos animais, o aquecimento global acarreta no aumento da escassez de água e intensifica a seca (KOGAN; GUO; YANG, 2020). Logo, este cenário afeta a produção agrícola e produção de alimentos, principalmente nos países em desenvolvimento (SEAGER *et al.*, 2018). De fato, ovócitos coletados de animais Holandês durante o verão apresentam menor qualidade quando comparado aos coletados no inverno, além de ser observada menor taxa de embrião na estação quente para esta raça (ROCHA *et al.*, 1998).

Neste contexto, a atividade das células que compõe o folículo é importante na resposta ao estresse. As células do *cumulus*, por exemplo, atuam fornecendo ao ovócito antioxidantes celulares como a glutatona, proporcionando proteção aos ovócitos, e prevenindo o estresse oxidativo nesta célula (DE MATOS *et al.*, 1997; MAEDOMARI *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 1996). Desta forma, é possível que haja diferenças nas atividades de células que compõe o microambiente folicular em animais taurinos, zebuínos e ½ sangue, e que afetam a competência dos ovócitos ao longo do ano.

Estudos mais recentes, tem mostrado ainda que existem diferenças na expressão de genes relacionados a competência ovocitária (LOPES *et al.*, 2017) e estresse térmico (TICIANELLI *et al.*, 2017) em COCs de taurinos, zebuínos e mestiços. Porém, diversos são os genes relacionados à competência do ovócito e estresse térmico ainda não estudados. Além disso, até o momento não há na literatura trabalhos comparando genes relacionados ao metabolismo de glicose e estresse oxidativo em diferentes raças bovinas. Estes trabalhos contribuem para elucidar os resultados divergentes no emprego da PIVE em doadoras de diferentes raças, uma vez que podem comprometer a competência do ovócito.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a quantidade e qualidade de COCs recuperados, bem como quantificar a abundância de mRNA de genes relacionados ao estresse térmico, estresse oxidativo e metabolismo de glicose em ovócitos e células do *cumulus* de doadoras das raças Gir, Holandês e ½ Sangue Gir-Holandês ao final das estações de verão e inverno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dinâmica folicular

O desenvolvimento folicular antral em bovinos ocorre em padrão de ondas. A onda folicular tem início com a emergência, também conhecida como recrutamento, de folículos antrais de mesmo tamanho, os quais crescem em resposta ao hormônio folículo estimulante (FSH). Após 2 a 4 dias, ocorre o desvio ou seleção, com as células da granulosa do folículo de maior tamanho adquirindo receptores para o hormônio luteinizante (LH), devido, entre outros fatores, a maior concentração do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) no fluido folicular (GINTHER *et al.*, 2001).

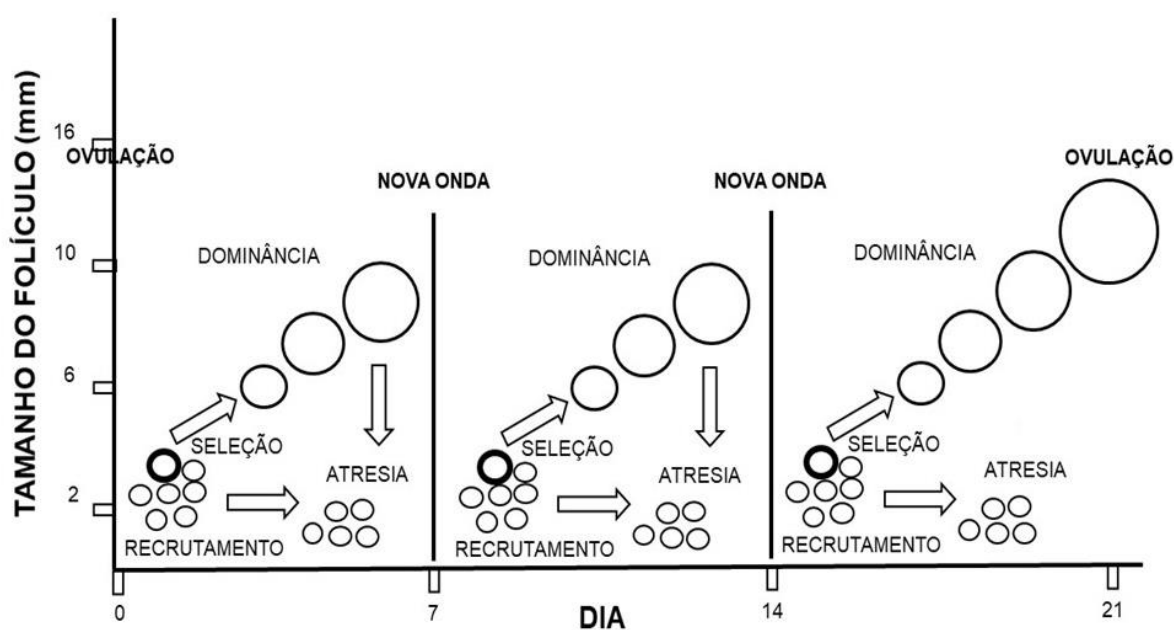
A maior concentração de IGF-1 neste folículo é proporcionada pela ação da proteína plasmática A associada a prenhez (PAPPA), uma protease de proteínas de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina (IGFBP; SPICER, 2004). A presença dos receptores de LH, permite o crescimento do folículo dominante em resposta à liberação pulsátil deste hormônio, promovendo liberação de inibina e estradiol (GHINTER *et al.*, 2003). Estes dois hormônios realizam *feedback* negativo no hipotálamo, reduzindo a secreção de FSH e, conseqüentemente, limitando o crescimento dos demais folículos, que entrarão em atresia (LUCY *et al.*, 1992).

O folículo de maior tamanho continua seu crescimento em uma fase de dominância folicular, até atingir o tamanho pré-ovulatório. Neste momento, este folículo dominante libera um pico de estradiol, estimulando a liberação de um pico de LH, o qual promoverá a maturação final do ovócito e ovulação (GARVERICK; ZOLLERS; SMITH, 1992; STOCK; FORTUNE, 1993). Após liberação do COCs, as células da teca e granulosa passam pelo processo de luteinização, com formação do corpo lúteo (CL), o qual dará início a produção e liberação de progesterona (P4). Aproximadamente 17 dias após a ovulação, na ausência de gestação, há a produção de prostaglandina 2 α (PGF2 α) pelo endométrio que, por mecanismo de contracorrente, chega ao ovário e promove a luteólise (MILVAE, 2000).

Durante o período em que há presença de P4 em altas concentrações, a atividade ovariana permanece, com contínuo crescimento folicular. Porém, a P4 realiza *feedback* negativo no hipotálamo, impedindo a liberação do pico de LH pela adeno-hipófise e, conseqüentemente, inibindo nova ovulação enquanto houver

presença de CL funcional. No momento em que ocorre a redução da P4 devido a luteólise, o folículo dominante da nova onda folicular pode culminar na ovulação, iniciando um novo ciclo (figura 1; FORTUNE *et al.*, 2004; GINTHER *et al.*, 1989; GINTHER *et al.*, 1997; MILVAE, 2000; WEBB *et al.*, 1999).

Figura 1 - Fases do crescimento folicular antral durante um ciclo estral de fêmea bovina apresentando três ondas de crescimento folicular.



Fonte: Adaptado de Adams *et al.* (2008).

Em relação ao número de ondas de cada ciclo, podem ocorrer variações entre raças e categoria animal, sendo que animais zebuínos, em geral, apresentam de 3 a 4 ondas (BALDRIGHI *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2004; DEGEFA *et al.*, 2016; VIANA *et al.*, 2000) e animais taurinos de 2 a 3 (BALDRIGHI *et al.*, 2012; WOLFENSON *et al.*, 2004). Embora poucos trabalhos abordem a fisiologia reprodutiva de animais mestiços, foi relatada presença de 2 a 3 ondas nestes animais (BORGES *et al.*, 2001; DEGEFA *et al.*, 2016).

Além disso, a fisiologia reprodutiva de taurinos e zebuínos difere em outros aspectos, tais como a concentração de hormônios circulantes, quantidade de folículos recrutados, taxa de crescimento folicular e tamanho de folículo pré-ovulatório (SALES *et al.*, 2014). Animais zebuínos apresentam maior quantidade de folículos antrais em relação aos taurinos, enquanto animais taurinos apresentam maior tamanho de folículo dominante e pré-ovulatório, conseqüentemente, maior volume de CL

(BALDRIGHI *et al.*, 2012; BASTOS *et al.*, 2010). Em animais zebuínos, o tamanho médio do folículo pré-ovulatório é de 12 mm, e de 16 mm em taurinos (BALDRIGHI *et al.*, 2012; BASTOS *et al.*, 2010). Em relação aos animais mestiços, Borges *et al.* (2001) observaram diâmetro máximo do folículo dominante de $13,3 \pm 1,4$ mm em animais de duas ondas, enquanto para animais de três ondas foi de $11,8 \pm 1,3$ mm.

Diante das diferenças nas populações de folículos antrais entre taurinos e zebuínos, Silva-Santos *et al.* (2011) conduziram um estudo com Nelore (*Bos indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus*) para testar a hipótese de que a maior população antral em *Bos indicus* seria decorrente de maior quantidade de folículos pré-antrais nos ovários. Foram avaliados ovários de fetos de 6 a 8 meses ($n=10$), novilhas ($n=12$) e vacas ($n=10$) de ambas as raças. A quantidade de folículos pré-antrais por ovário foi semelhante em fetos (285.155 ± 325.195 vs. 143.929 ± 64.028), novilhas (109.673 ± 86.078 vs. 76.851 ± 78.605) e vacas (89.577 ± 86.315 vs. 39.438 ± 31.017) de taurinos e zebuínos, respectivamente. Entretanto, foi observada maior média de folículos primordiais em novilhas taurinas (83.726 ± 85.148) que zebuínas (47.436 ± 61.888), bem como de folículos secundários em fetos (4.172 ± 3.437 vs. 1.423 ± 1.648) e vacas (1.859 ± 1.477 vs. 464 ± 312). Estes resultados sugerem que a maior quantidade de folículos antrais em animais zebuínos não é devido a maiores reservas ovarianas de folículos pré-antrais, podendo estar relacionada a mecanismos de controle do recrutamento de folículos pré antrais para passarem a folículos antrais.

Desta forma, as diferenças quantitativas na população folicular antral observadas entre taurinos e zebuínos, podem ser associadas a maiores concentrações de fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1; ALVAREZ *et al.*, 2000), hormônio anti-muleriano (AMH; BALDRIGHI *et al.*, 2014; BATISTA *et al.*, 2016; FAVORETO *et al.*, 2019; GUERREIRO *et al.*, 2014), hormônio do crescimento (GH; ALVAREZ *et al.*, 2000), insulina e glicose (ALVAREZ *et al.*, 2000; SALES *et al.*, 2015) em zebuínos. Estes fatores promovem maior recrutamento de folículos pré-antrais e crescimento folicular inicial, além de promover maior proliferação de células da granulosa e da teca (ALVAREZ *et al.*, 2000; SALES *et al.*, 2015), aumento no número de folículos antrais (BALDRIGHI *et al.*, 2014; BATISTA *et al.*, 2016) e consequentemente na qualidade dos COCs (ALVAREZ *et al.*, 2000; SALES *et al.*, 2015).

2.2 Competência ovocitária

A competência ovocitária está relacionada à capacidade do ovócito em maturar, ser fecundado e sustentar o desenvolvimento embrionário inicial. Para que a mesma seja alcançada, diversos eventos celulares precisam ocorrer (CONTI; FRANCIOSI, 2018). De acordo com Sirard *et al.* (2006), a competência ovocitária pode ser avaliada em cinco níveis: (i) retomar a meiose, (ii) clivar após a fecundação, (iii) atingir o estágio de blastocisto, (iv) gerar prenhez e leva-la a termo, (v) nascimento de um descendente hígado. Os mesmos autores ainda ressaltam que estes eventos são independentes, e o sucesso em um nível prévio não garante a ocorrência do próximo.

Desta forma, a competência ovocitária é uma condição complexa e pode ser afetada por inúmeros fatores, como estação do ano (AL-KATANANI *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2011), fase da onda folicular (HENDRIKSEN *et al.*, 2004), tamanho dos folículos (MACHATKOVA *et al.*, 2004) e idade da fêmea (YAMAMOTO *et al.*, 2010; SU *et al.*, 2012). Todos estes fatores, de forma individual ou em grupo, podem interferir diretamente nos resultados das biotecnologias reprodutivas (ARMSTRONG, 2001).

Desde o nascimento, as fêmeas possuem em seus ovários folículos primordiais contendo ovócitos que se encontram em prófase I, e assim permanecem até a puberdade (FAIR, 2003). Durante este processo de desenvolvimento folicular pré antral, os folículos passam pelas fases de primordial, primário e secundário, até a formação do antro, quando passa a ser denominado de folículo terciário ou antral (HULSHOF *et al.*, 1994). Os folículos primordiais são compostos por um ovócito envolto por uma única camada de células da granulosa (KASINSKIS *et al.*, 2005). Conforme avança em seu desenvolvimento, há multiplicação e diferenciação dessas células, crescimento do ovócito e aumento no número de organelas, formação da zona pelúcida, formação do antro, dentre outras alterações importantes para o desenvolvimento folicular (RIMON-DAHARI *et al.*, 2016; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Ao atingir o estágio de folículo pré ovulatório, ocorre o pico de LH liberado pela adeno hipófise, desencadeando a retomada da meiose, promovendo a maturação ovocitária, o qual atinge o estágio de metáfase II (Fair, 2003). Portanto, a aquisição da competência está diretamente relacionada ao tamanho do folículo em que se encontra o ovócito (CAIXETA *et al.*, 2009), mas não é o único fator determinante.

De fato, estudos comparando a capacidade de maturação nuclear em ovócitos provenientes de folículos pré-antrais e antrais, mostram que após a formação do antro,

as chances do ovócito chegar em metáfase II crescem em mais de 40% (DE SMEDT *et al.*, 1994; FUHRER *et al.*, 1989; MOTLIK *et al.*, 1989).

É importante ressaltar que durante o crescimento folicular há intensa síntese de RNA. Isto é necessário não só para o crescimento ovocitário durante o período pré-antral, mas também para armazenamento destes transcritos, visando suportar as próximas etapas de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (CONTI; FRANCIOSI, 2018; FAIR; HYTTEL; GREEVE, 1995).

Todo este processo de foliculogênese é dependente da interação entre o ovócito, células do *cumulus* e células da granulosa (EPPIG *et al.*, 1994; GILCHRIST *et al.*, 2008). Fatores de crescimento, como kit-ligante (KL), fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15) sintetizados por células da granulosa e ovócitos, respectivamente, medeiam a comunicação parácrina entre ovócitos e células da granulosa (BURATINI JR., 2007). Esta comunicação pode ser intermediada, dentre outras maneiras, por vesículas extracelulares, capazes de realizar a comunicação entre as células da granulosa e *cumulus*, podendo transportar e transferir mRNAs, microRNAs e proteínas entre estas células (DEL COLLADO *et al.*, 2018). Já a comunicação entre células do *cumulus* e ovócito, ocorre, além de fatores parácrinos, autócrinos e endócrinos, por meio de projeções transzonais, principalmente via junções *gap*, que irão estabelecer uma comunicação entre as células do *cumulus* e ovócito (DEL COLLADO *et al.*, 2018).

2.3 Estresse

2.3.1 Estresse térmico e apoptose

Ao longo dos anos, com o objetivo de suprir as necessidades de mercado de produção de leite, animais foram selecionados com base em sua produtividade. Entretanto, durante o processo de seleção, houve redução no sucesso reprodutivo desses animais (BERRY *et al.*, 2015). Somado a isto, parte dos animais utilizados na pecuária leiteira são animais *Bos taurus*, os quais são mais sensíveis ao calor (HANSEN, 2009). Animais taurinos possuem zona de conforto térmico, faixa de temperatura no qual animais apresentam melhor desempenho, entre 0 e 16°C, e

animais zebuínos entre 10 e 27°C. Valores fora desta faixa podem comprometer o metabolismo e desempenho animal (AZEVEDO; ALVES, 2009).

Os efeitos deletérios do estresse térmico no organismo animal, podem ser causados pelo aumento na temperatura corpórea ou por uma resposta fisiológica para regular a temperatura (HANSEN, 2009). Desta forma, o estresse térmico induzido por calor, além de ser uma problemática econômica, gerando redução na produção de leite (RHOADS *et al.*, 2010), também pode causar disfunções no metabolismo animal, como alteração de parâmetros fisiológicos, redução de índices reprodutivos e alterações celulares (GARNER *et al.*, 2016 HANSEN, 2004). Uma das formas com que o estresse térmico afeta a reprodução das fêmeas, é interferindo na qualidade ovocitária (ROTH; HANSEN, 2004). Nesse contexto, as proteínas de choque térmico (HSP) apresentam importante função para a sobrevivência celular, prevenindo o processo de apoptose (KENNEDY *et al.*, 2014).

A partir de uma situação de estresse térmico, há estímulo para a liberação de citocromo C pelas mitocôndrias, que irá se ligar ao fator de ativação da protease apoptótica 1 (APAF-1). Na presença de dATP ou ATP há oligomerização do APAF-1 e incorporação da pro-caspase 9 a esse complexo formado, para recrutar e clivar a pro-caspase 3. A caspase 3 é então ativada e apta a clivar os substratos alvo, induzindo a apoptose. As HSPs, em especial a HSP70, atualmente conhecida como HSPA5, atuam em diferentes eventos dessa via apoptótica, visando impedir estes acontecimentos e manter a sobrevivência celular (BEERE, 2001). Portanto, a expressão de HSPA5 ocorre em situações adversas para as células, sendo observado que a expressão desse gene era menor em células do *cumulus* de ovócitos que deram origem a embriões de melhor qualidade (HAMOND *et al.*, 2015). Com relação à diferentes raças, Camargo *et al.* (2007) avaliaram a expressão de HSP70.1 em ovócitos de taurinos e zebuínos sob condições de clima tropical, e observaram maior expressão, com menor taxa de blastocisto em taurinos, uma vez que estes estão mais propensos ao estresse térmico em clima tropical em relação ao zebuínos.

Enquanto as proteínas de choque térmico são sinalizadoras de condição de estresse, as caspases são indicadoras de apoptose (BOONE; TSANG, 1998; FENWICK; HURST, 2002). De fato, comparando a expressão da caspase 3 (CASP3) em células da granulosa de folículos dominantes subordinados em novilhas, é possível observar menor expressão deste gene no folículo dominante com relação aos demais, uma vez que os outros folículos estão entrando em processo de atresia

(NICHOLAS *et al.*, 2005). Além disso, já foi identificado menor expressão de CASP3 em ovócitos frescos em comparação a ovócitos vitrificados (DIÓGENES *et al.*, 2017). Isto sugere que a expressão elevada deste gene apresenta impacto negativo no crescimento folicular e produção de embriões. (AMANSYAH *et al.*, 2017; DIÓGENES *et al.*, 2017; LOBACH *et al.*, 2017).

Assim como a caspase 3, o gene *Fos-related antigen 1* (FOSL1) também está envolvido na morte celular. Após dano ao DNA, membros da super-família das proteínas ativadas por mitogênio (MAP quinase) como *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) e *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) mediarão a apoptose ou progressão do ciclo celular, de acordo com o tipo celular, a fonte e grau da injúria. Estes fatores induzem a atividade de FOSL1, responsável por regular a atividade da quinase 2 dependente de ciclina (CDK2; HAMDÍ *et al.*, 2008). No caso da inativação da atividade da CDK2, há aumento da apoptose (SAURUS *et al.*, 2016). De fato, estudos demonstram que um aumento na expressão do gene FOSL1 está relacionado a maior apoptose após processos que geram estresse celular, como a vitrificação de embrião (LEME *et al.*, 2016).

2.3.2 Estresse metabólico

A glicose é um substrato essencial para atividade celular em mamíferos, em especial às estruturas envolvidos no estabelecimento da prenhez, como ovócito, espermatozoide e embrião (AUGUSTIN *et al.*, 2001; HARVEY *et al.*, 2004; PURCELL; MOLEY, 2009; ZHENG; VASSENA; LATHAM, 2007).

A molécula de glicose é incapaz de permear a membrana plasmática da célula (NISHIMOTO *et al.*, 2005), sendo que seu transporte deve ser realizado por transportadores de glicose acoplados ao sódio (SGLTs) ou pelos transportadores de glicose (GLUTs), o qual ocorre com base na concentração de glicose intracelular (AUGUSTIN *et al.*, 2001; FLADEBY SKAR; SERCK-HANSSEN, 2003; PURCELL; MOLEY, 2009).

Nesse contexto, *Solute carrier family 2 members 1 e 3* (SLC2A1 e SLC2A3, respectivamente) e com menos expressão o SLC2A4, atuam para suprir a demanda de glicose ovariana, sustentando a foliculogênese, ovulação e formação do CL (NISHIMOTO *et al.*, 2005). De fato, Diógenes *et al.* (2017) encontraram maior

expressão de SLC2A3 em células do *cumulus* cultivadas em sistema que gerou maior taxa de embrião em D7 e D8. Apesar disso, Kussano e colaboradores (2016) não conseguiram estabelecer relação entre a expressão dos genes SLC2A1 e SLC2A3 e a taxa de produção embrionária, uma vez que não foi observada diferença na expressão desses genes em células do *cumulus* de ovócitos que originaram ou não embriões.

Em outro estudo, foi observado que temperatura superior a 40°C durante a maturação ovocitária de bubalinos, reduziu a expressão de transportadores de glicose (ASHRAF *et al.*, 2014). Da mesma maneira, dietas abaixo da necessidade de manutenção, também reduzem a expressão desses genes em ovócitos de ovelhas (PISANI *et al.*, 2008). Por outro lado, a expressão de transportadores de glicose aumentou em células do *cumulus* de bovinos (CORDEIRO, 2011) e em células da granulosa de suínos (MUNAKATA *et al.*, 2016) conforme aumento do tamanho dos folículos, assim como em situações de hipóxia durante o cultivo *in vitro* de folículos secundários de bovinos (MAKANJI *et al.*, 2014).

2.3.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição caracterizada por desequilíbrio entre antioxidantes e moléculas pró-oxidantes (AGARWAL *et al.*, 2012). A produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorrem como resultado do metabolismo celular, devido a fosforilação oxidativa, realizada pelas mitocôndrias, e necessária para produção de energia celular. Ao mesmo tempo, estas organelas sintetizam enzimas para defesa antioxidante, permitindo um equilíbrio intracelular destes fatores (ARIAS-ÁLVAREZ *et al.*, 2018; COMBELLES *et al.*, 2010).

As enzimas antioxidantes como catalase, glutathiona peroxidase e superóxido desmutase (SOD), atuam neutralizando as EROS, convertendo-as em água e oxigênio (AGARWAL; ALLAMANENI, 2004; AGARWAL *et al.*, 2012; ANGELUCCI *et al.*, 2006; LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006). As condições de cultivo *in vitro* favorecem a produção de EROS (CETICA *et al.*, 2001), sendo que a adição de enzimas antioxidantes se apresenta como uma alternativa interessante em todas as etapas da PIVE (MOUROT *et al.*, 2006).

Combelles *et al.* (2010) avaliaram a expressão de SOD1, 2 e 3 em ovócitos, células do *cumulus* e da granulosa e fluido folicular. Estes autores observaram maior expressão em fluido folicular de folículos de 2 a 5mm em comparação aos folículos maiores que 8mm, sugerindo que a enzima SOD pode ser um marcador de competência, uma vez que a menor atividade de SOD corresponde a ovócitos mais capazes de serem fecundados.

Assim como a SOD, a glutathione peroxidase (GPX) também apresenta correlação com a competência ovocitária. A menor expressão de GPX3 em células do *cumulus* de mulheres está relacionada a melhor produção de blastocistos em D5 (HUANG *et al.*, 2013; MONTFOORT *et al.*, 2008). Entretanto, Guimarães (2017) não observou relação da expressão desse gene em células do *cumulus* com a PIVE em bovinos. Em células da granulosa, Ceko *et al.* (2015) também não observaram diferença na expressão de GPX3 em folículos de 2 a 5 mm, viáveis ou atresícos, e folículos maiores que 8 mm.

2.4 Produção *in vitro* de embriões na pecuária de leite

A pecuária leiteira teve importante contribuição no crescimento da técnica de PIVE no Brasil. Apesar disso, a seleção dos animais a serem utilizados para a reprodução com base em sua produção, contribui para o declínio na performance reprodutiva das gerações ao longo dos anos (GATIUS, 2003; LONERGAN *et al.*, 2016; PRYCE *et al.*, 2004; WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011).

Dentro do segmento leiteiro, doadoras Holandês, Jersey, Pardo-Suíça, Guzerá, Gir e Girolando representam as principais raças utilizadas na PIVE (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2018). O uso de diferentes raças implica em resultados variáveis, tanto relacionados a quantidade e qualidade dos COCs recuperados, como na taxa de produção de embriões na PIVE (LACERDA *et al.*, 2020; PONTES *et al.*, 2009; SALES *et al.*, 2015).

Em recente estudo, Lacerda e colaboradores (2020) analisaram resultados de aproximadamente 3000 sessões de OPU em gado de leite provenientes de um laboratório comercial na região da Zona da Mata, Minas Gerais. Do total analisado, 70,8% das aspirações foram realizadas em doadoras Gir, 16,1% em Girolando, 9,2% em Holandês e 3,9% em doadoras de outros graus de sangue provenientes do

cruzamento entre Gir e Holandês. Isto mostra uma predileção pelo uso de doadoras Gir ao se realizar a PIVE em rebanhos leiteiros nesta região, sendo que considerando o vasto território e diferentes climas do Brasil, esta proporção pode variar de acordo com a região em estudo.

No que diz respeito à performance de animais de diferentes raças na PIVE, Lacerda *et al.* (2020) e Pontes *et al.* (2010) observaram que animais meio sangue apresentavam maior média de ovócitos viáveis recuperados, seguidos de Gir e Holandês. Esta proporção se repetiu para a média de embriões e prenhez por OPU. Por outro lado, no primeiro estudo não foi observada diferença na taxa de embrião entre as raças, enquanto Lacerda e colaboradores (2020) observaram maior taxa de embrião em doadoras Gir em relação ao Holandês. Para os animais mestiços, foi observada taxa de embrião semelhante à de raças puras. Por fim, em ambos estudos não foi observado efeito racial da doadora, sobre a taxa de prenhez.

Doadoras Girolando tem apresentado um mercado promissor dentro da PIVE, gerando animais mestiços com alta produção de leite, próximas às raças puras (VIANA *et al.*, 2012). Além disso, como relatado anteriormente, animais $\frac{1}{2}$ sangue apresentaram resultados na PIVE semelhantes ou superiores às raças puras. Acredita-se que o melhor desempenho numérico desses animais frente às raças puras seja promovido pela heterose (PONTES *et al.*, 2010). A heterose é o fenômeno pelo qual os filhos provenientes de cruzamentos apresentam melhor desempenho do que a média de seus pais, e será mais pronunciada, quanto maior a diferença genética entre as raças ou linhagens envolvidas no cruzamento (LIPPMAN; ZAMIR, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética no Uso de Animais

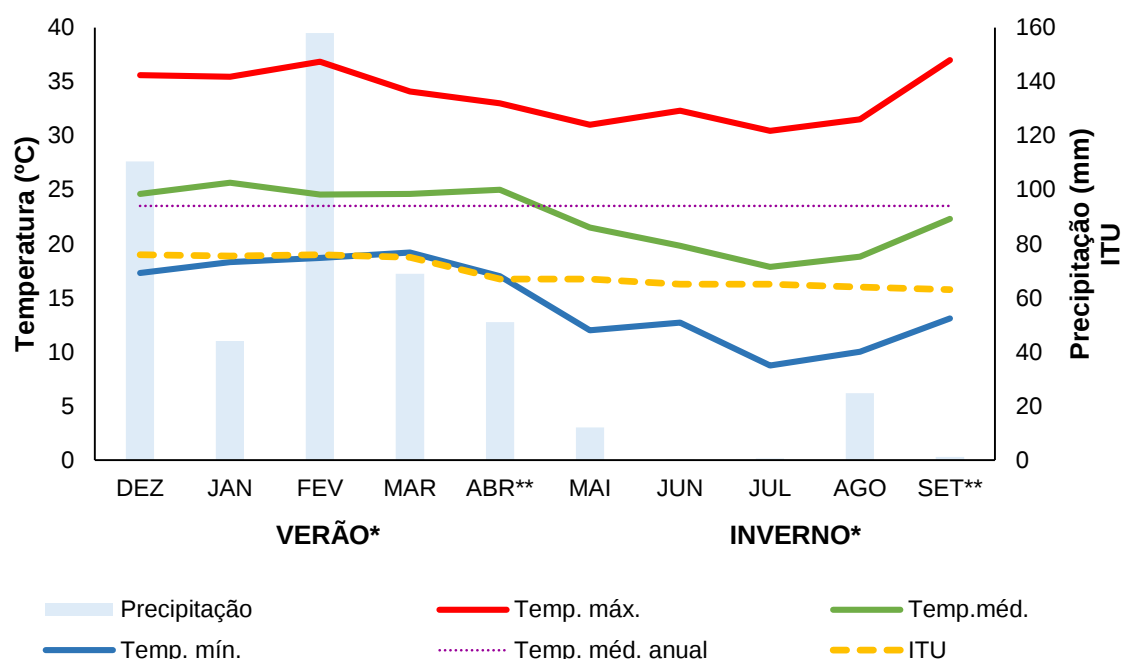
O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo – campus Alegre Protocolo nº.81/201.

3.2 Animais e local

Fêmeas não lactantes das raças Gir (verão n=10; inverno n=10), Holandês (verão n=7; inverno n=7) e ½ sangue Gir-Holandês (verão n=12; inverno n=12) foram utilizadas como doadoras de complexos *cumulus*-ovócito (COCs). Os animais apresentaram condições de escore de condição corporal (ECC) variando de 3 a 4, em escala de 1 a 5, e peso médio de 425,50 ± 17,86 kg para Gir, 686,67 ± 28,36 kg para Holandês e 402,80 ± 12,65 kg para mestiças.

Os animais foram criados em sistema semi-intensivo, em áreas de pastagens sombreadas, com pastejo e água à vontade e mineralização ofertada em cochos. As propriedades comerciais estavam localizadas na região da zona da mata de Minas Gerais, com clima predominante o tropical, indicando inverno seco e verão chuvoso. As temperaturas mínima, média e máxima registradas para região, bem como o índice de temperatura e umidade (ITU) e precipitação (Figura 2) foram registradas pela estação meteorológica do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizadas em latitude e longitude de -21.104867 e -42.375904, respectivamente.

Figura 2 - Temperatura mínima, média e máxima (°C), índice de temperatura e umidade (ITU) e precipitação mensal para as estações de verão e inverno.



Fonte: Próprio autor.

*Verão corresponde ao período de 22 de dezembro à 20 de março e Inverno de 21 de junho à 23 de setembro.

**Meses em que foram realizadas as sessões de aspiração folicular (OPU).

3.3 Aspiração folicular

Em dia aleatório do ciclo estral, definido como dia 0 (D0) do experimento, os animais foram submetidos a aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU), como preconizado por Monteiro *et al.* (2017), seguida de mais três sessões com intervalos de 72 horas entre as OPUs (dias 3, 6 e 9). Para isto, os animais foram submetidos à anestesia epidural baixa (no espaço entre as vértebras S5 e Co1), com aproximadamente 3 mL de lidocaína (Pearson®, Eurofarma, Brasil).

Durante a OPU, folículos maiores que 2 mm de diâmetro foram aspirados, com auxílio de scanner de ultra-som de modo B em tempo real acoplado à um transdutor microconvexo de 7,5 MHz, (Mindray DP 2200, Shenzhen, China). A punção folicular foi realizada utilizando bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, Brasil) com pressão negativa de 70 mmHg (12 mL/seg), agulha para aspiração folicular 20G (WTA, Cravinhos, Brasil) conectada a um tubo cônico de 50 mL contendo solução tampão

fosfato-salina (PBS) acrescida de 125 UI/mL de heparina (Liquemine, Roche, Brasil) e 500 µL de soro fetal bovino (Sigma Chemical Co., St Louis, USA).

Após cada sessão de OPU os COCs foram selecionados com auxílio de estereomicroscópio e classificados em graus 1, 2, 3 e 4 de acordo com a morfologia citoplasmática e número de camadas de células do *cumulus* (CC; STOJKOVIC *et al.*, 2001). Complexos *cumulus*-ovócito graus 1 e 2 foram considerados viáveis e selecionados para avaliação do nível de transcritos dos genes avaliados neste estudo. Após a classificação, CC e ovócitos foram totalmente separados por pipetagens sucessivas em gotas de 200 µL de PBS. Após pipetagem, as CC e ovócitos de cada animal/sessão de OPU foram transferidas individualmente para microtubos de 0,2 mL e centrifugadas. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o microtubo contendo cada tipo celular foi armazenado em nitrogênio líquido até o momento da extração do RNA.

Para avaliar o efeito da estação do ano sobre as variáveis em estudo, todo o procedimento foi realizado em duas estações distintas do ano, sendo a sequência de OPU realizada ao fim do período de inverno (mês de setembro) e fim do período de verão (mês de abril). Tal metodologia foi aplicada ao final da estação para coletar ovócitos que passaram pelo processo de foliculogênese durante a estação de interesse deste estudo.

3.4 Abundância relativa de transcritos

A abundância relativa de transcritos de seis genes relacionados ao metabolismo de glicose (SLC2A3), estresse (GPX3, HSPA5 e SOD2) e apoptose (CASP3 e FOSL1), foram avaliados pela Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em Tempo Real (qPCR; 7500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA) nos dois tipos celulares. Os genes CASP3 e GPX3, apresentaram amplificação somente em ovócitos e células do *cumulus*, respectivamente.

No momento da extração do RNA, foram formados *pools* de acordo com a quantidade disponível no grupamento genético com menor recuperação ovocitária (Holandês; 21 ovócitos), assim como de suas respectivas CC. A extração foi realizada em 4 réplicas biológicas contendo pool de 5,25 ovócitos por réplica, e suas respectivas

CC, com as células coletadas em D0, D3, D6 e D9 de cada época do ano (inverno e verão).

O RNA total foi isolado utilizando o Kit RNeasy Plus Micro (Quiagen®, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante, e eluídos em água livre de RNA. Após extração, foi realizada síntese de cDNA utilizando GoScript (200 UI/μL, Promega®, Wisconsin, USA) com *primers* (do inglês, oligonucleotídeo iniciador) Oligo-dT (0,5 μg/μL) e Random (0,5 μg/μL), adicionando as enzimas transcriptase reversa e inibidor de ribonuclease recombinante e tampão, em um volume final de 30 μL. As reações foram realizadas a 70 °C por 5 minutos, seguido de resfriamento por pelo menos 5 minutos. Por fim, a etapa de anelamento ocorreu à 25 °C por 5 minutos, e extensão à 42 °C por 60 minutos, seguido pela inativação da enzima à 70 °C por 15 minutos.

A análise da qPCR foi realizada utilizando *GoTaq Master Mix* (Promega®). As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima entre 80 e 110% para cada gene, por cálculos usando as curvas padrões relativas no programa 7500 2.0.3 (Applied Biosystems). Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e tamanho do *amplicon* (do inglês, fragmento amplificado) em gel de agarose. Cada reação foi realizada em volume final de 25 μL usando cDNA correspondente a 0,88 ovócito. As condições para amplificações dos genes foram de 95 °C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos, com desnaturação à 95 °C por 15 segundos e posterior anelamento à 60 °C por 30 segundos.

A sigla do gene, sequência e concentração do *primer*, tamanho do *amplicon* e número de acesso de cada gene estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sigla do gene, sequência e concentração do *primer*, tamanho do *amplicon* e número de acesso de cada gene utilizados para amplificação de fragmentos de genes para análise em qPCR em tempo real.

Genes	Sequência dos primers	Concentração do primer (nM)	Tamanho do amplicon (bp)	GeneBank Número de acesso /referência
GAPDH	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA	300	118	NM_001034034.2
	R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T			
ACTB	F: GGC ACC CAG CAC AAT GAA GAT CAA	300	126	XM_010845770.1
	R: ATC GTA CTC CTG CTT GCT GAT CCA			

SOD2	F: TTG CTG GAA GCC ATC AAA CGT GAC R: AAT CTG TAA GCG TCC CTG CTC CTT	300	135	NM_201527
CASP3	F: GCC CAG GAC TTT AGC AGT CA R: AAA TGT GAG CGC CTT TGT T	250	185	NM_001077840.1
HSPA5	F: CGT GGC CAC TAA TGG AGA TAC R: CTC TGT TGT CCT TCC GAA CAT	300	119	NM_001075148.1
FOSL1	F: GCT TCC TAG TAG AGC CAA AG R: GAA GAG GTG ATG AAG ACC ATA G	300	200	NM_001205985.1
SLC2A3	F: ACT CTT CAC CTG ATT GGC CTT GGA R: GGC CAA TTT CAA AGA AGG CCA CGA	300	145	X12877 (EL-SAYED <i>et al.</i> , 2006)
GPX3	F: GCT AGA CCC TTT ACT GTT ACA C R: GTT CCT CTC TGG CAT TCT TC	300	189	NM_174077.4

F: forward; R: reverse

O nível de expressão relativa dos genes constitutivos Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e β -Actina (ACTB), foram utilizados para cálculo de média geométrica, sendo este valor utilizado para normalização dos dados (PFAFFL, 2006). A expressão relativa de cada gene alvo foi normalizada pelos genes constitutivos, com a expressão relativa calculada pelo método de $\Delta\Delta CT$ para correção da eficiência (PFAFFL, 2001).

3.5 Análise estatística

Os dados relacionados à quantidade de ovócitos recuperados não apresentaram distribuição normal, sendo comparados pelo teste de Kruskal-Wallis.

O efeito da estação do ano e da raça das doadoras na abundância relativa dos genes de interesse nos diferentes tipos celulares, foram testados por ANOVA e as médias de abundância relativa de mRNA comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), considerando diferenças significativa com $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Quantidade de ovócitos recuperados

Independente da estação do ano, animais das raças Gir e ½ sangue Gir-Holandês apresentaram maior número de COCs viáveis recuperados em comparação as doadoras Holandês, com doadoras Gir apresentando maior porcentagem em relação as demais raças. Com relação aos COCs totais, doadoras ½ sangue Gir-Holandês apresentaram maior quantidade que Gir e Holandês (Tabela 2).

Tabela 2 - Média ($\pm$ E.P.M.) de complexos *cumulus*-ovócito (COCs) viáveis e totais recuperados em doadoras das raças Gir, 1/2 sangue Gir-Holandês (F1) e Holandês.

Raça	COCs viáveis*		COCs totais
	$\bar{x}$	%	
Gir	3,3 $\pm$ 0,3 ^a	50,0 ^a	6,7 $\pm$ 0,6 ^b
F1	3,6 $\pm$ 0,6 ^a	24,9 ^b	14,1 $\pm$ 2,0 ^a
Holandês	1,3 $\pm$ 0,3 ^b	36,6 ^b	3,6 $\pm$ 0,5 ^c

^{a-c} Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

*Foram considerados COCs viáveis os classificados como graus 1 e 2, de acordo com a morfologia citoplasmática e número de camadas de células do *cumulus*, segundo Stojkovic *et al.* (2001).

Ao avaliar o efeito da estação do ano na quantidade e qualidade dos COCs, foi observado que doadoras Gir apresentaram maior quantidade de COCs viáveis recuperados durante o verão (Tabela 3). Em relação a quantidade de COCs totais, o efeito da estação do ano foi observado em doadoras das três raças, com maior quantidade de COCs totais no verão para Gir e mestiços, e maior quantidade no inverno para Holandês (Tabela 3).

Tabela 3 – Média ($\pm$ E.P.M.) de complexos *cumulus*-ovócito (COCs) viáveis e totais recuperados em doadoras das raças Gir, 1/2 sangue Gir-Holandês (F1) e Holandês ao fim das estações de verão e inverno.

Estação do ano	COCs viáveis*						COCs totais		
	Gir		F1		Holandês		Gir	F1	Holandês
	$\bar{x}$	%	$\bar{x}$	%	$\bar{x}$	%			
Verão	4,0 $\pm$ 0,4 ^a	53,8 ^a	4,0 $\pm$ 1,1 ^a	22,7 ^a	1,0 $\pm$ 0,4 ^a	36,7 ^a	7,5 $\pm$ 0,7 ^a	17,8 $\pm$ 3,4 ^a	2,7 $\pm$ 0,9 ^a
Inverno	2,7 $\pm$ 0,4 ^b	45,1 ^a	3,2 $\pm$ 0,5 ^a	28,6 ^b	1,5 $\pm$ 0,3 ^a	36,5 ^a	5,9 $\pm$ 0,9 ^b	11,2 $\pm$ 1,9 ^b	4,2 $\pm$ 0,5 ^b

^{a,b} Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna diferem pelo teste U de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

*Foram considerados COCs viáveis classificados como graus 1 e 2, de acordo com a morfologia citoplasmática e número de camadas de células do *cumulus*, segundo Stojkovic *et al.* (2001).

4.2 Efeito das sessões consecutivas de OPU

Ao longo das sessões de aspiração folicular no verão, não houve diferença na quantidade de COCs viáveis e totais por OPU para todas as raças (Tabela 4). Por outro lado, doadoras Gir e Holandês durante o inverno, apresentaram variação na quantidade de COCs viáveis recuperados ao longo das sessões de OPU. Já as fêmeas 1/2 sangue Gir-Holandês apresentaram diminuição na quantidade de COCs totais ao longo das quatro sessões de OPU, enquanto os COCs viáveis não apresentaram variação (Tabela 4).

Tabela 4 – Média ($\pm$ E.P.M.) de complexos *cumulus*-ovócito (COCs) viáveis e totais recuperados de doadoras das raças Gir, 1/2 sangue Gir-Holandês (F1) e Holandês após sessões de aspiração folicular com intervalos de três dias ao fim das estações de verão e inverno.

Estação do ano	COCs	Raça	OPU 1	OPU 2	OPU 3	OPU 4
Verão	COCs totais	Gir	8,9 $\pm$ 1,4 ^a	7,7 $\pm$ 1,2 ^a	5,9 $\pm$ 0,8 ^a	7,2 $\pm$ 1,7 ^a
		F1	23,8 $\pm$ 4,9 ^a	18,3 $\pm$ 4,0 ^a	13,8 $\pm$ 3,4 ^a	13,1 $\pm$ 2,3 ^a
		Holandês	2,6 $\pm$ 1,0 ^a	3,3 $\pm$ 1,4 ^a	2,3 $\pm$ 0,8 ^a	-
	COCs viáveis*	Gir	5,0 $\pm$ 0,8 ^a	4,6 $\pm$ 0,7 ^a	3,1 $\pm$ 0,6 ^a	3,3 $\pm$ 0,7 ^a
		F1	3,8 $\pm$ 1,5 ^a	4,3 $\pm$ 1,2 ^a	4,7 $\pm$ 1,4 ^a	2,9 $\pm$ 0,7 ^a
		Holandês	0,6 $\pm$ 0,4 ^a	1,4 $\pm$ 0,7 ^a	1,0 $\pm$ 0,5 ^a	-
Inverno	COCs totais	Gir	8,6 $\pm$ 1,7 ^a	7,1 $\pm$ 1,3 ^a	4,3 $\pm$ 1,2 ^a	3,5 $\pm$ 0,7 ^a

COCs viáveis*	F1	19,7±3,6 ^a	7,8±1,4 ^{ab}	10,7±2,3 ^{ab}	6,8±1,8 ^b
	Holandês	5,4±2,8 ^a	7,5±1,4 ^a	3,8±0,8 ^a	2,8±0,7 ^a
	Gir	4,6±0,6 ^a	3,2±0,7 ^{ab}	1,5±0,5 ^b	1,3±0,3 ^b
	F1	3,9±0,9 ^a	2,5±0,9 ^a	4,3±0,9 ^a	2,1±0,7 ^a
	Holandês	1,7±0,9 ^{ab}	3,5±0,6 ^a	1,0±0,4 ^{ab}	1,0±0,5 ^b

^{a,b} Diferentes letras sobrescritas na mesma linha diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

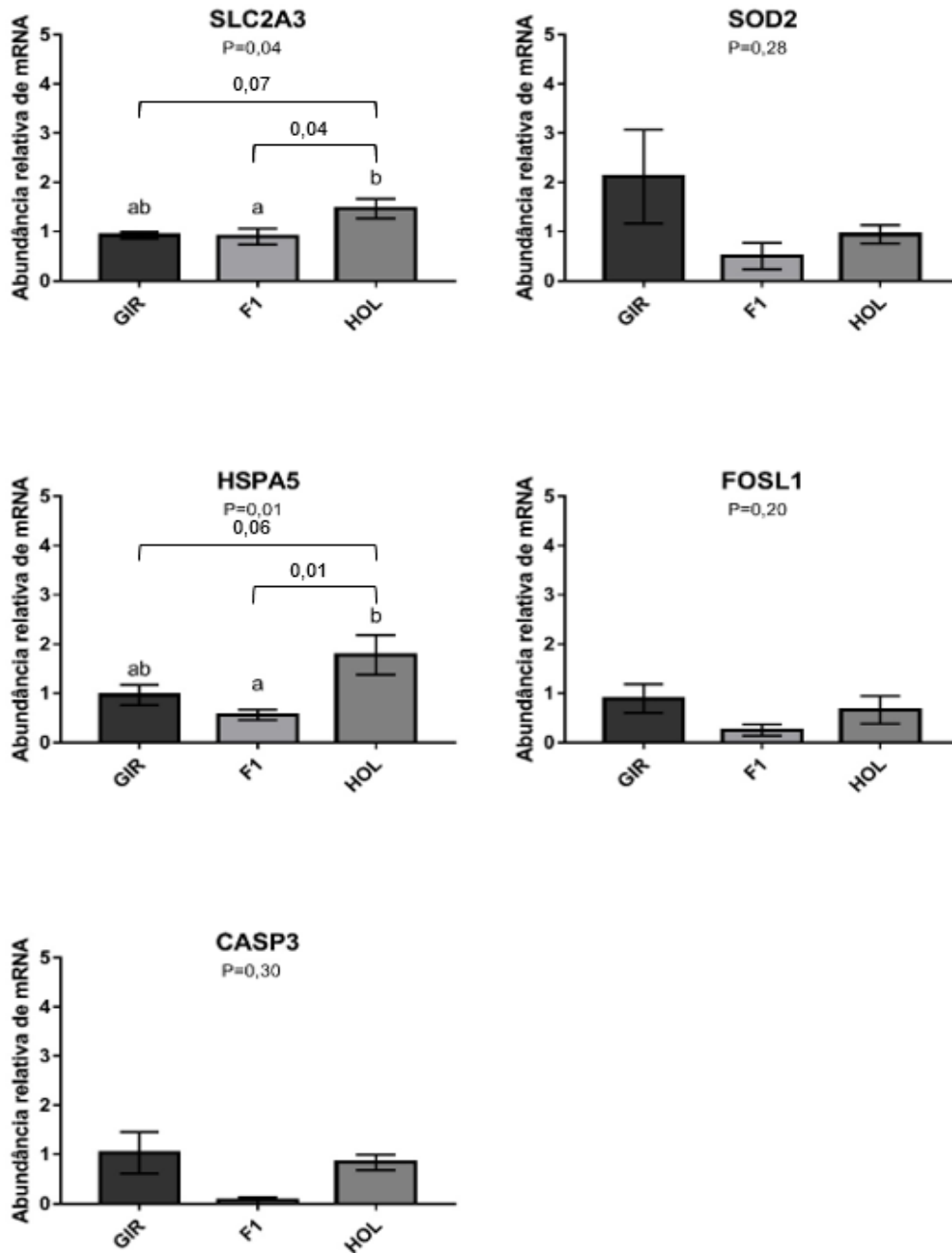
*Foram considerados COCs viáveis classificados como graus 1 e 2, de acordo com a morfologia citoplasmática e número de camadas de células do *cumulus*, segundo Stojkovic *et al.* (2001).

4.3 Abundância relativa de mRNA

Não foi observado efeito da estação do ano sobre a abundância relativa de mRNA dos genes analisados, tanto em CC quanto em ovócitos, para todas as raças (Apêndices A-I). Deste modo, os dados foram agrupados por raças, independente da estação do ano.

Os genes SLC2A3 e HSP5A apresentaram abundância relativa de mRNA superior em ovócitos provenientes de doadoras Holandês em relação a doadoras ½ sangue Gir-holandês, sendo ambas semelhantes à expressão relativa em ovócitos de doadoras Gir (Figura 3). Em relação aos demais genes avaliados em ovócitos, não foi observada diferença entre as raças (Figura 3).

Figura 3 - Abundância relativa de mRNAs (valores médios $\pm$ E.P.M) dos genes SLC2A3, SOD2, HSPA5, FOSL1 e CASP3 em ovócitos viáveis imaturos coletados ao fim da estação de verão e inverno de doadoras Gir (GIR), $\frac{1}{2}$ sangue Gir-Holandês (F1) e Holandês (HOL).

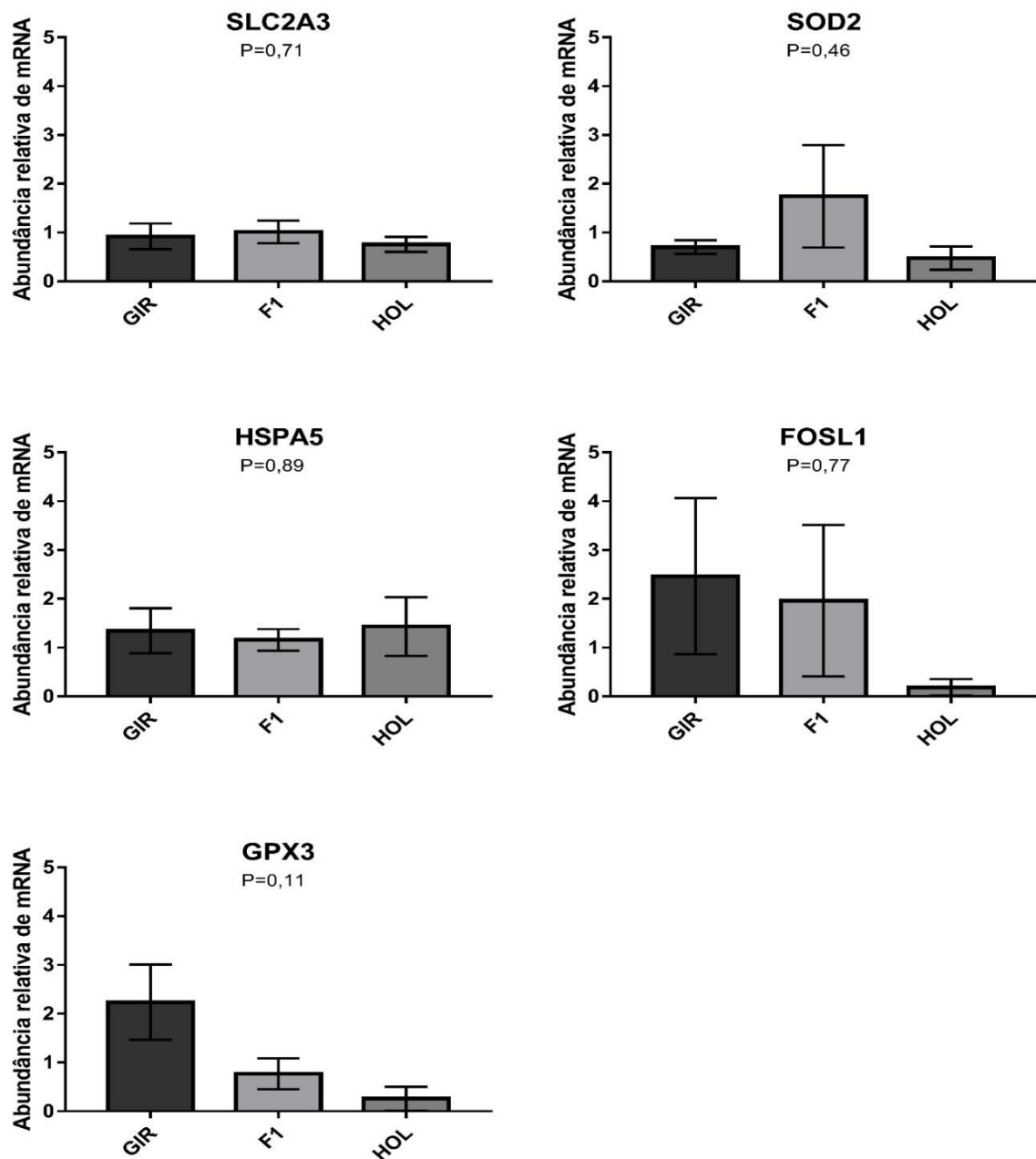


^{a,b} Barras com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os dados foram normalizados usando a fórmula $\Delta\Delta CT$ (PFAFFL, 2001), usando-se os genes GAPDH e ACTB como controle endógeno.

Ao se analisar a expressão relativa de mRNA nas células do *cumulus*, nenhum dos genes foram diferentemente expressos em doadoras das raças Gir, Holandês e ½ Sangue Gir-Holandês (Figura 4).

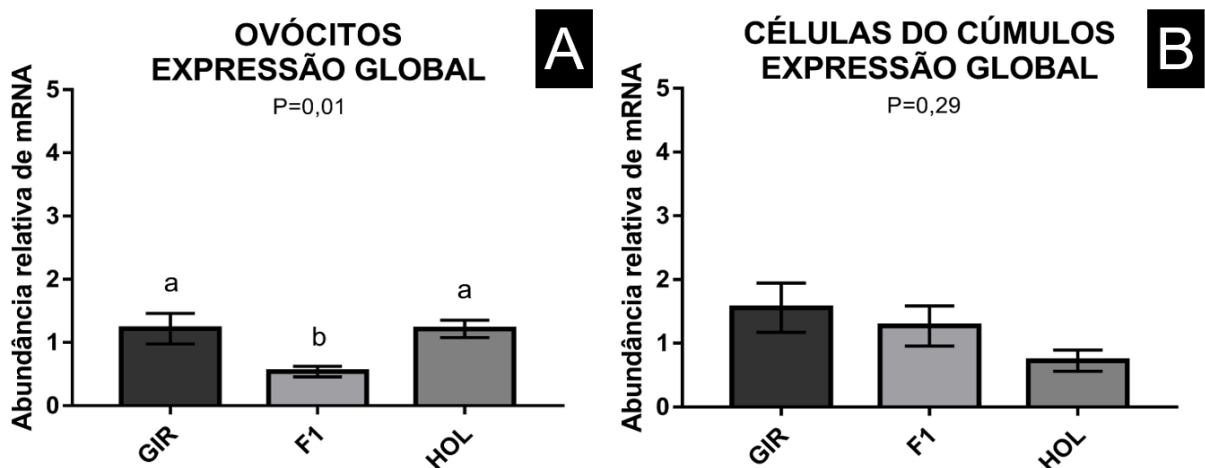
Figura 4 - Abundância relativa de mRNAs (valores médios $\pm$ E.P.M) dos genes SLC2A3, SOD2, HSPA5, FOSL1 e GPX3 em células do *cumulus* coletadas ao fim da estação de verão e inverno de doadoras Gir (GIR), 1/2 sangue Gir-Holandês (F1) e Holandês (HOL).



Os dados foram normalizados usando a fórmula $\Delta\Delta CT$ (PFAFFL, 2001), usando-se os genes GAPDH e ACTB como controle endógeno.

Também foi avaliada a expressão global dos genes alvo em CC e ovócitos das diferentes raças. Nesta análise, os genes foram menos expressos em ovócitos de doadoras ½ Sangue Gir-Holandês em relação aos ovócitos das demais raças. Em CC não foi observada efeito da raça na expressão global dos genes (Figura 5).

Figura 5 - Expressão global (valores médios $\pm$ E.P.M) dos genes alvo em ovócitos imaturas (A) e células do *cumulus* (B) de doadoras das raças Gir (GIR), 1/2 Sangue Gir-Holandês (F1) e Holandês (HOL).



^{a,b} Barras com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os dados foram normalizados usando a fórmula $\Delta\Delta CT$ (PFAFFL, 2001), usando-se os genes GAPDH e ACTB como controle endógeno.

5. DISCUSSÃO

Este estudo comparou o efeito das estações de verão e inverno e das raças de doadoras Gir, Holandês e ½ Sangue Gir-Holandês sobre a quantidade e qualidade de complexos *cumulus*-ovócitos, e nível de transcritos de genes em ovócitos e células do *cumulus*.

A raça da doadora apresentou influência na quantidade de COCs recuperados, sendo que animais Gir e ½ sangue apresentaram maior quantidade de COCs viáveis e totais do que as doadoras Holandês, corroborando com estudos anteriores (GIMENES *et al.*, 2015; LACERDA *et al.*, 2020; PONTES *et al.*, 2010; SALES *et al.*, 2015). É possível que a maior quantidade de COCs recuperados em animais mestiços ou zebuínos, esteja relacionada às particularidades na fisiologia reprodutiva de cada raça. De fato, animais zebuínos possuem maiores níveis plasmáticos de fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1; ALVAREZ *et al.*, 2000), hormônio anti-mulheriano (AMH; BALDRIGHI *et al.*, 2014; BATISTA *et al.*, 2016; GUERREIRO *et al.*, 2014), hormônio do crescimento (GH; ALVAREZ *et al.*, 2000), insulina e glicose (ALVAREZ *et al.*, 2000; SALES *et al.*, 2015) em relação às fêmeas taurinas. Estes autores relatam que a maior concentração destes hormônios promove maior recrutamento e crescimento folicular inicial. Além disto, promovem maior proliferação de células da granulosa e da teca.

Para as doadoras mestiças, embora pouco se conheça sobre a fisiologia reprodutiva, acredita-se que a maior quantidade de COCs recuperados seja devido à heterose promovida pelo cruzamento de duas raças puras, a qual resulta na superioridade fenotípica de um indivíduo sobre seus pais (LIPPMAN; ZAMIR, 2007). Apesar disso, esses animais apresentaram baixa porcentagem de ovócitos viáveis recuperados, ainda sendo desconhecida a razão deste achado.

Com relação a estação do ano, foi observada menor recuperação de COCs em animais zebuínos e mestiços no inverno, enquanto para taurinos foi observada queda na recuperação no verão. É conhecido que animais taurinos possuem zona de conforto térmico entre 0 e 16 °C, e animais zebuínos entre 10 e 27 °C (AZEVEDO; ALVES, 2009). Em relação aos animais mestiços, a zona de conforto térmico não é bem estabelecida, mas acredita-se que estes tolerem maiores variações de temperatura, por herdarem características de termotolerância de animais zebuínos

(PONTES *et al.*, 2010; SILVA-SANTOS *et al.*, 2014). Logo, a temperatura média da região durante o verão (25 °C) e inverno (19,2 °C) encontrava-se propícia para o conforto térmico de zebuínos e fora da zona de conforto térmico para taurinos, especialmente no verão.

Outra maneira de se avaliar o estresse térmico é através do ITU, sendo que valores de ITU acima de 72 indicam desconforto térmico para bovinos (ARMSTRONG, 1994; BOHMANOVA; MISZTAL; COLE, 2007; HANSEN, 2004). Apesar da temperatura e ITU dentro do ideal para as raças Gir e ½ sangue Gir-Holandês, estes animais apresentaram queda na quantidade de COCs totais durante o inverno. É conhecido que a estação da seca/fria pode proporcionar forrageiras de menor qualidade e menor fornecimento de nutrientes na pastagem, devido à menor umidade no solo, baixas temperaturas e fotoperíodo reduzido (LIU *et al.*, 2018; PETERSON; SHEAFFER; HALL, 1992; REIS; BARBERO; HOFFMANN, 2016; SANTOS *et al.*, 2004; VITOR *et al.*, 2009). Associado a isto, durante o período da seca, a baixa disponibilidade de forragem e aumento da porção fibrosa na forrageira são agravantes, podendo limitar a ingestão e atendimento das exigências nutricionais dos animais, com as forrageiras na estação seca suprimindo menos de 60% das necessidades nutricionais dos animais (BARBERO, 2016; OLIVEIRA, 2014; REIS; BARBERO; HOFFMANN, 2016; SANTOS *et al.*, 2004). Tais fatores associados poderiam comprometer a função reprodutiva dos animais Gir e mestiços.

Já as doadoras Holandês, durante todas as estações encontravam-se em ambiente com temperaturas acima da ideal para seu conforto térmico. Diversos estudos têm relatado os efeitos deletérios do calor na função reprodutiva em taurinos (BEATTY *et al.*, 2006; HAMMOND *et al.*, 1996; ROCHA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2013; TAKUMA *et al.*, 2010). Esses animais são menos capazes de realizar a regulação da temperatura corporal em resposta ao estresse, sendo mais suscetíveis aos efeitos negativos de temperaturas elevadas a nível celular (HANSEN, 2004). O estresse térmico pode prejudicar o desenvolvimento folicular, ao promover apoptose e alterar a função de células da granulosa, uma vez que o desenvolvimento folicular é dependente da funcionalidade destas células (LI *et al.*, 2016). Além disso, o estresse por calor pode reduzir o apetite e ingestão alimentar, visando menor produção de calor pelo metabolismo (KHODAEI-MOTLAGH *et al.*, 2011), o que pode gerar restrição no fornecimento de nutrientes aos animais.

Com relação à análise da expressão dos genes nos ovócitos, foi observada maior expressão do gene SLC2A3 em Holandês em relação ao ½ sangue Gir-Holandês, e uma tendência ($P=0,07$) de maior expressão em ovócitos provenientes de Holandês quando comparado ao Gir. O gene SLC2A3 está relacionado ao transporte de glicose, e atua mediando a entrada deste substrato para o meio intracelular (NISHIMOTO *et al.*, 2006; PERALTA *et al.*, 2016; PURCELL; MOLLEY, 2009). Durante o desenvolvimento do ovócito, o metabolismo da glicose é essencial no fornecimento de energia para eventos como maturação nuclear, expansão das células do *cumulus* e reações de oxirredução (SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2010).

Sabe-se que ovócitos de animais zebuínos são mais competentes que taurinos em condições de clima tropical (LACERDA *et al.*, 2020; PONTES *et al.*, 2010) e que a maior expressão de transportadores de glicose é observada em ovócitos mais competentes (LEONI *et al.*, 2007). Logo, esperava-se maior expressão do gene SLC2A3 em ovócitos de animais zebuínos. Por outro lado, estudos demonstram que a expressão deste gene pode ser elevada em condições de dieta com nutrientes abaixo do requerido (PISANI *et al.*, 2008) ou hipóxia (AL-EDANI *et al.*, 2014; MAKANJI *et al.*, 2014).

Em situações onde os animais encontram-se em ambientes com temperaturas acima de sua zona de conforto térmico, estes utilizam mecanismos de termorregulação, como aumento da taxa respiratória e vasodilatação periférica como alternativa para perder calor. Consequentemente, pode ocorrer redução na vascularização de órgãos internos, sendo que no trato reprodutivo, esta redução pode chegar de 20 a 30% (HANSEN, 2009; MAIA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2012), havendo necessidade de aumentar a captação de glicose para realizar glicólise por via anaeróbia (AL-EDANI *et al.*, 2014; FLADEBY *et al.*, 2003; MIMURA *et al.*, 2012). Sendo assim, é possível que a maior expressão de SLC2A3 em ovócitos de doadoras Holandês seja devido a um mecanismo compensatório, decorrente do estresse térmico em que estes animais são expostos.

Assim como o gene SLC2A3, a HSPA5 também foi mais expressa em ovócitos de Holandês em relação ao ½ sangue, com tendência ($P=0,06$) de maior expressão em Holandês quando comparado ao Gir. Estes resultados corroboram o estudo de Camargo *et al.* (2007), o qual identificaram maior expressão de HSPA5 em ovócitos imaturos de doadoras Holandês quando comparada à ovócitos de doadoras Gir mantidos em clima tropical.

A HSPA5, também conhecida como HSP78, é membro da família das proteínas HSP70, composta por outras proteínas de choque térmico, tais como HSPA1, HSPA6, HSPA8 e HSPA9. Estas proteínas podem ter expressão influenciada pelo estresse térmico (CAMARGO *et al.*, 2007; ROTH; HANSEN, 2004), hipóxia (KUKREJA *et al.*, 1994; OSTHEIMER *et al.*, 2017) e presença de radicais livres (DIMAURO; MERCATELLI; CAPOROSSI, 2016; ZHAO *et al.*, 2017). Frente a situações adversas, as HSPs são estimuladas para atuar impedindo a execução dos processos que ocorrem nas vias apoptóticas, prevenindo a morte celular (BEERE, 2001; KENNEDY *et al.*, 2014). Deste modo, a maior expressão de HSPA5 em taurinos pode estar relacionada a resposta destes animais ao estresse térmico no qual encontram-se inseridos, como uma tentativa de prevenir apoptose celular mediada pelo calor.

Apesar da maior expressão de SLC2A3 e HSPA5, indicando situação de estresse, genes relacionados ao estresse oxidativo, como SOD2, e à apoptose, como CASP3 e FOSL1 não apresentaram variação entre as raças deste estudo. Alguns autores (AFOLAYAN *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2017; MORIYAMA-GONDA *et al.*, 2002) relatam correlação positiva na expressão de HSPs e SOD. Porém, semelhante a este estudo, Humblot *et al.* (2005) não observaram diferença na expressão de SOD2 e outros genes relacionados ao estresse oxidativo em grupos de ovócitos com diferentes taxas de blastocisto, mesmo com maior expressão de HSP naqueles menos competentes. Lushchak e Bagnyukova (2006), afirmam que o aumento na expressão de agentes oxidantes nem sempre indica atividade enzimática de antioxidantes elevada.

Em relação aos genes ligados à apoptose, como CASP3 e FOSL1, é possível que o aumento na expressão HSPA5, tenha atuado inibindo a atividade destes genes, prevenindo apoptose ocasionada por estresse nos animais deste estudo (BEERE, 2001; MOSSER *et al.*, 1997; MOSSER *et al.*, 2000; RÉROLE; JEGO; GARRIDO, 2011).

Quando avaliada a expressão global dos genes em ovócitos das doadoras de diferentes raças, animais $\frac{1}{2}$ sangue Gir-Holandês apresentaram menor expressão dos genes em relação as demais raças. Estes resultados reforçam a hipótese do efeito da heterose nesta raça, uma vez que estes animais, durante a PIVE, apresentam resultados semelhantes ou superiores às raças puras (LACERDA *et al.*, 2020; PONTES *et al.*, 2010). Desta forma, sugere-se que animais $\frac{1}{2}$ sangue possuem maior

capacidade de enfrentar situações adversas, como maior amplitude de variação térmica e/ou restrição de nutrientes na alimentação.

Para os genes avaliados nas CCs, não foi identificado qualquer efeito da estação do ano ou grupo racial na expressão dos genes. Ovócitos e células do *cumulus* apresentam comunicação bidirecional. Assim, ovócitos secretam fatores como GDF-9 e BMP-15, que irão modular a atividade das células do *cumulus*, as quais auxiliam no fornecimento de suprimento necessário para aquisição da competência do ovócito (GILCHRIST *et al.*, 2008). Sabe-se, ainda, que essa troca influencia mutuamente a atividade e expressão de genes nestas células (DEL COLLADO *et al.*, 2018; GILCHRIST *et al.*, 2008; THOMAS *et al.*, 2004; YEO; GILCHRIST; LANE, 2009).

Apesar disso, estudos apresentam resultados controversos com relação à resposta de ovócitos e células do *cumulus* frente ao estresse térmico. Pennarossa *et al.* (2012), observaram aumento na expressão de proteínas de choque térmico em ovócitos de suínos submetidos ao estresse térmico, mas não nas CCs. Por outro lado, Payton *et al.* (2011) e Yin *et al.* (2018), identificaram expressão de HSPs aumentada em CCs e reduzida em ovócitos de bovinos e suínos, respectivamente.

Um fator importante a ser levantado é que nos estudos de Payton *et al.* (2011) e Yin *et al.* (2019) os COCs foram submetidos ao estresse térmico e condições de cultivo *in vitro*, enquanto no presente estudo e no estudo de Pennarossa *et al.* (2012) o estresse ocorreu enquanto os COCs ainda se encontravam dentro dos folículos ovarianos. Sabe-se que o microambiente folicular é composto por diferentes células, tais como células do *cumulus*, granulosa e teca, cujas funções são importantes para manutenção da viabilidade do ovócito. Quando fora do folículo, somente as células do *cumulus* estão presentes para realizar esta atividade, e por isso maior expressão de HSPs pode ter sido observada nestas células em outros estudos. Além disso, o complexo *cumulus*-ovócito conta com diversas células do *cumulus* que apresentam comunicação entre si, o qual podem contribuir para que estas células respondam de forma diferente dos ovócitos, que são uma única célula, podendo ser mais suscetível ao estresse.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que a estação de inverno influencia negativamente na quantidade de COCs totais recuperados em doadoras Gir e $\frac{1}{2}$ sangue, enquanto o verão prejudica doadoras Holandês. Os genes relacionados ao estresse térmico (HSPA5) e metabolismo de glicose (SLC2A3) avaliados neste estudo, não demonstraram sofrer influência pela estação do ano, e sim da raça da doadora em ovócitos provenientes de doadoras Gir, Holandês e $\frac{1}{2}$ sangue Gir-Holandês.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.P. *et al.* Understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72-80, 2008.
- AFOLAYAN, A.J. *et al.* Inducible HSP70 regulates superoxide dismutase-2 and mitochondrial oxidative stress in the endothelial cells from developing lungs. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 306, n. 4, p. L351-L360, 2013.
- AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S.S. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reproductive biomedicine online**, v. 9, n. 3, p. 338-347, 2004.
- AGARWAL, A. *et al.* The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 49, 2012.
- AL-EDANI, T. *et al.* Female aging alters expression of human cumulus cells genes that are essential for oocyte quality. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 390-6, 2002.
- ALBERTINI, D.F. *et al.* Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 121, n. 5, p. 647-653, 2001.
- ALVAREZ, P. *et al.* Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 5, p. 1291-302, 2000.
- AMANSYAH, A. *et al.* Comparison of the Number of Cumulus Cells and the Expression of LH Receptor, Caspase 3 and P53 with the Success in Oocyte Maturation in the Process of In Vitro Maturation After Vitrification. **Advanced Science Letters**, v. 23, n. 7, p. 6755-6757, 2017.
- ARIAS-ÁLVAREZ, M. *et al.* α -Tocopherol modifies the expression of genes related to oxidative stress and apoptosis during in vitro maturation and enhances the developmental competence of rabbit oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 12, p. 1728-1738, 2018.
- ARMSTRONG, D. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2044-2050, 1994.
- ARMSTRONG, D.T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1303-1322, 2001.

ASHRAF, S. *et al.* Developmental competence and expression pattern of bubaline (*Bubalus bubalis*) oocytes subjected to elevated temperatures during meiotic maturation in vitro. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 10, p. 1349-1360, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE GIROLANDO (ABCG). Estatísticas do Serviço de Controle Leiteiro - SLC. Disponível em: <<http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/controle,21>>. Acesso em: 13 jan 2020.

AUGUSTIN, R. *et al.* Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 3, p. 370-6, Nov 2001.

AZEVEDO, D.M.M.R.A.; ALVES, A.A. **Bioclimatologia aplicada à produção de bovinos leiteiros nos trópicos**. Embrapa Meio-Norte Teresina, 2009.

BALDRIGHT, J.M. *et al.* Novilhas taurinas, zebuínas e bubalinas apresentam diferenças na dinâmica folicular e luteal durante o ciclo estral quando comparadas no mesmo ambiente e manejo nutricional. In: XXVI Reunião Anual da SBTE, **Anais...** Foz do Iguaçu, PR, 2012, p.337

BALDRIGHI, J. *et al.* Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 6, p. 1015-1020, 2014.

BARBERO, R.P. Altura do pasto e suplementação na recria de tourinhos e efeitos sobre a terminação. Orientador: Euclifres Braga Malheiros. 2016. 90f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BASINI, G. *et al.* Reactive oxygen species and anti-oxidant defences in swine follicular fluids. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 2, p. 269-274, 2008.

BASTOS, M.R. *et al.* Ovarian function and circulatory hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. In: XXIV Reunião Anual da SBTE, **Anais...** Porto de Galinhas, PE: Acta Scientiae Veterinariae, 2010, p.776.

BATISTA, E.O. *et al.* Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reprod Domest Anim**, v. 49, n. 3, p. 448-52, 2014.

BEATTY, D.T. *et al.* Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity¹. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 4, p. 972-985, 2006.

BEERE, H.M. Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2001, n. 93, p. re1, 2001.

BEERE, H.M.; GREEN, D.R. Stress management – heat shock protein- 70 and the regulation of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 6-10, 2001.

BERRY, D. *et al.* Milk production and fertility in cattle. **Annual review of animal biosciences**, v. 4, p. 269-290, 2016.

BERRY, D.P. Breeding the dairy cow of the future: what do we need? **Animal Production Science**, v. 55, n. 7, p. 823-837, 2015.

BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1947-1956, 2007.

BOONE, D.L.; TSANG, B.K. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 6, p. 1533-1539, 1998.

BORGES, A.M. *et al.* Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 595–604, out. 2001.

BORGES, A.M. *et al.* Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 346–354, 2004.

BURATINI JR, J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 190-196, 2007.

BURNS, D. *et al.* Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle- stimulating hormone concentrations. **Biology Of Reproduction**, v. 73, n. 1, p. 54-62, 2005.

BUTLER, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 83, n. 2, p. 211-218, 2003.

CAIXETA, E.S. *et al.* Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655-664, 2009.

CAMARGO, L.S.A. *et al.* Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, p. 626-632, 2007.

CAMPEN, K.A. *et al.* Heat stress impairs gap junction communication and cumulus function of bovine oocytes. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 5, p. 385-392, 2018.

CARVALHO, J.P.B. *et al.* 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, p. 167-175, 2008.

CEKO, M.J. *et al.* X- Ray fluorescence imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function. **Metallomics**, v. 7, n. 1, p. 71-82, 2014.

CETICA, P.D. *et al.* Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte In Vitro Maturation. **IUBMB Life**, v. 51, n. 1, p. 57-64, 2001.

CHOI, S.-M. *et al.* Expression of Cu/Zn SOD protein is suppressed in hsp 70.1 knockout mice. **BMB reports**, v. 38, n. 1, p. 111-114, 2005.

COMBELLES, C.M. *et al.* Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 139, n. 5, p. 871-81, 2010.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA BRASIL). Valor Bruto da Produção: Faturamento da Agropecuária encerra 2018 com crescimento de 3,1%. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/boletins-tecnicos/valor-bruto-da-producao-faturamento-da-agropecuaria-encerra-2018-com-crescimento-de-3-1>>. Acesso em: 7 out. 2019.

CONTI, M.; FRANCIOSI, F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. **Human reproduction update**, v. 24, n. 3, p. 245, 2018.

CORDEIRO, D.D.M. Identificação de marcadores moleculares para a competência ovocitária em células do Cumulus bovinas. Orientadora: Margot Alves Nunes Dode. 2011. 159f. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 188-188, 1997.

DE SMEDT, V.; CROZET, N.; GALL, L. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. **Journal of Experimental Zoology**, v. 269, n. 2, p. 128-139, 1994.

DEGEFA, T. *et al.* Ovarian follicular dynamics in purebreed and crossbreed Boran cows in Ethiopia. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 33, p. 1763-1770, 2016.

DEL COLLADO, M. *et al.* Contributions from the ovarian follicular environment to oocyte function. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 261-270, 2018.

DIMAURO, I.; MERCATELLI, N.; CAPOROSSI, D. Exercise-induced ROS in heat shock proteins response. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 46-55, 2016.

DIÓGENES, M. N. *et al.* Effect of prematuration and maturation with fibroblast growth factor 10 (FGF10) on in vitro development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 102, p. 190-198, 2017.

EL-SAYED, A. *et al.* Large- scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, n. 1, p. 84-96, 2006.

EMBRAPA GADO DE LEITE. Diversidade de raças para um país-continente. **ANUÁRIO leite 2018: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro**, 2018. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>>. Acesso em: 7 out. 2019.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 122, n. 6, p. 829, 2001.

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.J. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development in vitro and in vivo. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 415-422, 1998.

EPPIG, J.J. *et al.* Relationship between the Developmental Programs Controlling Nuclear and Cytoplasmic Maturation of Mouse Oocytes. **Developmental Biology**, v. 164, n. 1, p. 1-9, 1994.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 203-216, 2003.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular reproduction and development**, v. 42, n. 4, p. 437-442, 1995.

FAVORETO, M. G. *et al.* Follicle populations and gene expression profiles of Nelore and Angus heifers with low and high ovarian follicle counts. **Molecular Reproduction & Development**, v. 86, n. 2, p. 197, 2019.

FENWICK, M.A.; HURST, P.R. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 124, n. 5, p. 659, 2002.

FERREIRA, R.M. *et al.* The low fertility of repeat- breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2383-2392, 2011.

FLADEBY, C.; SKAR, R.; SERCK-HANSEN, G. Distinct regulation of glucose transport and GLUT1/GLUT3 transporters by glucose deprivation and IGF-I in chromaffin cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1593, n. 2-3, p. 201-208, 2003.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal reproduction science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

FÜHRER, F. *et al.* Maturation competence and chromatin behaviour in growing and fully grown cattle oocytes. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 36, n. 1-10, p. 285-291, 1989.

GARNER, J.B. *et al.* Responses of dairy cows to short-term heat stress in controlled-climate chambers. **Animal Production Science**, v. 57, n. 7, p. 1233-1241, 2017.

GARVERICK, H.; ZOLLERS JR, W.; SMITH, M. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Animal reproduction science**, v. 28, n. 1-4, p. 111-124, 1992.

GILCHRIST, R B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte- secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.

GIMENES, L.U. *et al.* The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 385-93, 2015.

GINTHER, O. *et al.* Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O. *et al.* Follicle Selection in Cattle: Role of Luteinizing Hormone 1. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 197-205, 2001.

GINTHER, O.J. *et al.* Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3, p. 239-257, 2003.

GINTHER, O.J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223-30, 1989.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed., São Paulo: Editora ROCA, 2008. 299p.

GUERREIRO, B.M. *et al.* Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 49, p. 96-104, 2014.

GUIMARÃES, A.L.S. Identificação de marcadores não invasivos para a competência ovocitária em bovinos. Orientadora: Margot Alves Nunes Dode. 2017. 113f. Tese (Doutorado em Ciências Animais) — Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2017

HAMDI, M. *et al.* ATF3 and Fra1 have opposite functions in JNK- and ERK-dependent DNA damage responses. **DNA Repair**, v. 7, n. 3, p. 487-496, 2008.

HAMEL, M. *et al.* Identification of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF: new evidence for the involvement of luteinization process. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 8, p. 548-556, 2010.

HAMMOND, A.C. *et al.* Heat tolerance in two tropically adapted Bos taurus breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida1. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 2, p. 295-303, 1996.

HAMMOND, E.R. *et al.* Assessing embryo quality by combining non-invasive markers: early time-lapse parameters reflect gene expression in associated cumulus cells. **Human Reproduction**, v. 30, n. 8, p. 1850-1860, 2015.

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

HANSEN, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, n. 1534, p. 3341-3350, 2009.

HENDRIKSEN, P.J.M. *et al.* Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 909-920, 2004.

HOEKSTRA, J. *et al.* Genetic and phenotypic parameters for milk production and fertility traits in upgraded dairy cattle. **Livestock Production Science**, v. 40, n. 3, p. 225-232, 1994.

HUANG, X. *et al.* Differences in the transcriptional profiles of human cumulus cells isolated from MI and MII oocytes of patients with polycystic ovary syndrome. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 145, n. 6, p. 597, 2013.

HULSHOF, S. C. J. *et al.* Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 2, p. 78-80, 1994.

HUMBLLOT, P. *et al.* Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1149-1166, 2005.

HUSSEIN, T.S.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Oocyte- secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, v. 296, n. 2, p. 514-521, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Estações automáticas - gráficos. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>>. Acesso em: 7 out. 2019.

KANG, Z.-W. *et al.* The potential coordination of the heat-shock proteins and antioxidant enzyme genes of *Aphidius gifuensis* in response to thermal stress. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 976, 2017.

KENNEDY, D. *et al.* Regulation of apoptosis by heat shock proteins. **IUBMB Life**, v. 66, p.327-338, 2014.

KHODAEI-MOTLAGH, M. *et al.* Alterations in reproductive hormones during heat stress in dairy cattle. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 29, p. 5552-5558, 2011.

KOGAN, F.; GUO, W.; YANG, W. Near 40-year drought trend during 1981-2019 earth warming and food security. **Geomatics, natural hazards and risk**, v. 11, n. 1, p. 469-490, 2020.

KUKREJA, R.C. *et al.* Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. **American Journal of Physiology**, v. 267, n. 6 Pt 2, p. H2213-9, 1994.

KUSSANO, N.R. *et al.* Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1167-1176, 2016.

LACERDA, I.P. *et al.* Donor breed affects in vitro embryo production in a large-scale commercial program on dairy farms. **Livestock Science**, v. 240, p. 104135, 2020.

LEME, L.O. *et al.* Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of in vitro– produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 724-733.e1, 2016.

LEONI, G.G. *et al.* Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 2, p. 249-257, 2007.

LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, n. 3, p. 243-251, 2004.

LI, L. *et al.* The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 3, p. 467-475, 2016.

LI, R. *et al.* Oocyte- secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 839-845, 2000.

LIPPMAN, Z. B.; ZAMIR, D. Heterosis: revisiting the magic. **Trends in genetics**, v. 23, n. 2, p. 60-66, 2007.

LIU, K. *et al.* Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. **Developmental Biology**, v. 299, n. 1, p. 1-11, 2006.

LIU, Y. *et al.* Influence of drought stress on alfalfa yields and nutritional composition. **BMC plant biology**, v. 18, n. 1, p. 13, 2018.

LOBACH, V.N. *et al.* Caspase-3 gene expression in human luteinized granulosa cells is inversely correlated with the number of oocytes retrieved after controlled ovarian stimulation. **Human Fertility**, v. 22, n. 1, p. 33-38, 2019.

LONERGAN, P. *et al.* Embryo development in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 270-277, 2016.

LOPES, A. *et al.* Differential expression of insulin-like growth factor family members in immature cumulus– oocyte complexes from dairy cows with different genotypes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 6, p. 1067-1073, 2017.

LOREN, P. *et al.* Effect of short- term exposure of cumulus– oocyte complex to 3-morpholinopropanolamine on in vitro embryo development and gene expression in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 6, p. 1010-1019, 2016.

LUCY, M. *et al.* Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of animal science**, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. 3, p. 283-289, 2006.

LÓPEZ-GATIUS, F. Is fertility declining in dairy cattle?: A retrospective study in northeastern Spain. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 89-99, 2003.

MACHATKOVA, M. *et al.* Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 329-335, 2004.

MAEDOMARI, N. *et al.* Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 983-993, 2007.

MAIA, A.; DASILVA, R.; BATTISTON LOUREIRO, C. Sensible and latent heat loss from the body surface of Holstein cows in a tropical environment. **International Journal of Biometeorology**, v. 50, n. 1, p. 17-22, 2005.

MAKANJI, Y. *et al.* Hypoxia- mediated carbohydrate metabolism and transport promote early- stage murine follicle growth and survival. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 306, n. 8, p. E893, 2014.

MATOS, D.G.D. *et al.* Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular reproduction and development**, v. 45, n. 4, p. 451-457, 1996.

MELO, E.O. *et al.* Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Animal Genetics**, v. 48, n. 1, p. 19-29, 2017.

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2alpha in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2000. ISSN 1470-1626.

MIMURA, I. *et al.* Dynamic Change of Chromatin Conformation in Response to Hypoxia Enhances the Expression of GLUT3 (SLC2A3) by Cooperative Interaction of Hypoxia- Inducible Factor 1 and KDM3A. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 15, p. 3018, 2012.

MONTEIRO, F. M. *et al.* Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. **Theriogenology**, v. 90, p. 54-58, 2017.

MORIYAMA-GONDA, N. *et al.* Modulation of heat-induced cell death in PC-3 prostate cancer cells by the antioxidant inhibitor diethyldithiocarbamate. **BJU international**, v. 90, n. 3, p. 317-325, 2002.

MOSSER, D.D. *et al.* Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress- induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 9, p. 5317, 1997.

MOSSER, D.D. *et al.* The Chaperone Function of hsp70 Is Required for Protection against Stress- Induced Apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 19, p. 7146, 2000.

MOTLÍK, J.; KUBELKA, M. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 27, n. 4, p. 366-375, 1990.

MOUROT, M. *et al.* The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular reproduction and development**, v. 73, n. 11, p. 1367-1379, 2006.

MUNAKATA, Y. *et al.* Gene expression patterns in granulosa cells and oocytes at various stages of follicle development as well as in in vitro grown oocyte-and-granulosa cell complexes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 62, n. 4, 2016.

NICHOLAS, B. *et al.* Relationship Between Low- Molecular- Weight Insulin- Like Growth Factor- Binding Proteins, Caspase- 3 Activity, and Oocyte Quality 1. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 4, p. 796-804, 2005.

NISHIMOTO, H. *et al.* Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. **The Journal of endocrinology**, v. 188, n. 1, p. 111, 2006.

OLIVEIRA, A.A.D. Manejo do pasto de capim-marandu e suplementação com diferentes fontes de energia na recria de tourinhos Nelore. Orientador: Ricardo Andrade Reis. 2014. 135f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

OSTHEIMER, C. *et al.* Dynamics of Heat Shock Protein 70 Serum Levels As a Predictor of Clinical Response in Non-Small-Cell Lung Cancer and Correlation with the Hypoxia-Related Marker Osteopontin. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1305, 2017.

PAYTON, R.R. *et al.* Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. **Journal of Reproduction and Development**, p. 1104050365-1104050365, 2011.

PENNAROSSA, G. *et al.* Characterization of the constitutive pig ovary heat shock chaperone machinery and its response to acute thermal stress or to seasonal variations. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 5, p. 119, 1-9, 2012.

PERALTA, O.A. *et al.* Tissue localization of GM- CSF receptor in bovine ovarian follicles and its role on glucose uptake by mural granulosa cells. **Animal Reproduction Science**, v. 170, n. C, p. 157-169, 2016.

PETERSON, P.; SHEAFFER, C.; HALL, M. Drought effects on perennial forage legume yield and quality. **Agronomy Journal**, v. 84, n. 5, p. 774-779, 1992.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, 2001.

PFAFFL, M.W. Relative Quantification. In: Dorak MT, editor. **Real-time PCR**. London: Taylor & Francis, 2006. p 63-82.

PISANI, L.F. *et al.* Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels of developmentally relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells. **Reproduction**, v. 136, n. 3, p. 303-312, 2008.

PONTES, J.H.F. *et al.* Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (Bos indicus) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690-697, 2009.

PONTES, J.H.F. *et al.* Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from Bos taurus, Bos indicus, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1349-1355, 2010.

PRYCE, J.E. *et al.* Fertility in the high- producing dairy cow. **Livestock Production Science**, v. 86, n. 1, p. 125-135, 2004.

PURCELL, S. H.; MOLEY, K. H. Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 10, p. 483-489, 2009.

REIS, R.A.; BARBERO, R.A.; HOFFMANN, A. Impacts of forage quality on beef cattle production systems. **Informe Agropecuário**, v. 37, p. 36, 2016.

REROLE, A.L.; JEGO, G.; GARRIDO, C. Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. **Methods in Molecular Biology**, v. 787, p. 205-30, 2011.

RESENDE, J.C. *et al.* Produção e produtividade de leite no mundo. **ANUÁRIO leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais**, 2019. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198698/1/Anuario-LEITE-2019.pdf>>. Acesso em: 7 out. 2019.

RHOADS, M.L. *et al.* Effects of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 170-179, 2010.

RIMON-DAHARI, N. *et al.* Ovarian Folliculogenesis. **Results Probl Cell Differ**, v. 58, p. 167-90, 2016.

RIZOS, D. *et al.* Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

ROCHA, A. *et al.* High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, n. 3, p. 657-665, 1998.

ROCHA, D. *et al.* Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 36, n. 1, p. 18-24, 2012.

ROCHA, D.T.; CARVALHO, G.R. Produção brasileira de leite: uma análise conjuntural. **ANUÁRIO leite 2018: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro**, 2018. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>>. Acesso em: 7 out. 2019.

ROMAR, R. *et al.* Expression of Maternal Transcripts During Bovine Oocyte In Vitro Maturation is Affected by Donor Age.(Report). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. e23, 2011.

ROSA, E.J.D.L. *et al.* Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro) insulin correlates with prevention of apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 95, n. 17, p. 9950, 1998.

ROTH, Z.; HANSEN, P. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1898-1906, 2004.

SALES, J.N.S. *et al.* Effects of a high- energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3086-3099, 2015.

SANTOS, E.D.G. *et al.* Avaliação de pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Stapf. 2. Disponibilidade de forragem e desempenho animal durante a seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 214-224, 2004.

SANTOS, E.D.G. *et al.* Avaliação de pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Stapf: 1. Características químico- bromatológicas da forragem durante a seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 203-213, 2004.

SEAGER, R. *et al.* Whither the 100th Meridian? The onde and future physical and human geography of America's arid-humid divide. Part I: The story so far. **Earth interactions**, v. 22, n. 5, p. 1-22, 2018.

SEGERSON, E. *et al.* Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, n. 4, p. 1026-1046, 1984.

SILVA, C. *et al.* Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 351-357, 2013.

SILVA, M. *et al.* Programa de melhoramento genético da raça Girolando-Sumário de touros-Resultado do teste de progênie-Julho/2014. **Embrapa Gado de Leite- Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

SILVA-SANTOS, K.C. *et al.* Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1051-1057, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C. *et al.* Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In Vivo – of *Bos indicus*– *taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, n. 2, p. 228-232, 2014.

SIRARD, M.-A. *et al.* Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

SIRARD, M.-A. Folliculogenesis and acquisition of oocyte competence in cows. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 449-454, 2019.

SPICER, L. J. Proteolytic Degradation of Insulin- Like Growth Factor Binding Proteins by Ovarian Follicles: A Control Mechanism for Selection of Dominant Follicles 1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1223-1230, 2004.

STOCK, A.; FORTUNE, J. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1108-1114, 1993.

STOJKOVIC, M. *et al.* Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904, 2001.

SU, L. *et al.* Effect of Donor Age on the Developmental Competence of Bovine Oocytes Retrieved by Ovum Pick Up. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 184-189, 2012.

SUTTON-MCDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction : the official journal of the Society for the Study of Fertility**, v. 139, n. 4, p. 685-695, 2010.

TAKUMA, T. *et al.* Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. **The Journal of reproduction and development**, v. 56, n. 1, p. 55, 2010.

THOMAS, R.; ARMSTRONG, D.; GILCHRIST, R. Bovine Cumulus Cell- Oocyte Gap Junctional Communication During In Vitro Maturation in Response to Manipulation of Cell- Specific Cyclic Adenosine 3',5'- Monophosphate Levels. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 548-556, 2004. .

TICIANELLI, J.S. *et al.* Gene expression profile in heat-shocked Holstein and Nelore oocytes and cumulus cells. **Reproduction, Fertility & Development**, v. 29, n. 9, p. 1787-1803, 2017.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

VAN MONTFOORT, A.P. *et al.* Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. **Molecular human reproduction**, v. 14, n. 3, p. 157-168, 2008.

VIANA, J. *et al.* Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 12-18, 2012.

VIANA, J.H.M. *et al.* Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 1-12, 2004.

VIANA, J.H.M. *et al.* Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2501-2509, 2000.

VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SIQUEIRA, L.G.B. Brazilian embryo industry in context: Pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 476-481, 2017.

VITOR, C.M.T. *et al.* Produção de matéria seca e valor nutritivo de pastagem de capim- elefante sob irrigação e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 3, p. 435-442, 2009.

WALSH, S.W.; WILLIAMS, E.J.; EVANS, A.C.O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 127-138, 2011.

WEBB, R. *et al.* Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, v. 68, n. 2, p. 257-284, 1999.

WOLFENSON, D. *et al.* Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1042-55, 2004.

YAMAMOTO, T. *et al.* Effect of maternal age on the developmental competence and progression of nuclear maturation in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 7, p. 595-604, 2010.

YEO, C.X.; GILCHRIST, R.B.; LANE, M. Disruption of Bidirectional Oocyte- Cumulus Paracrine Signaling During In Vitro Maturation Reduces Subsequent Mouse Oocyte Developmental Competence. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 5, p. 1072-1080, 2009.

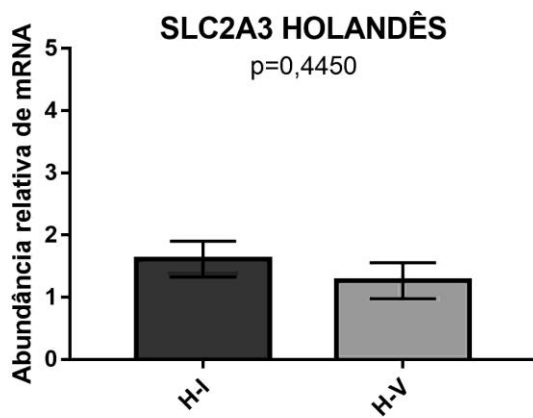
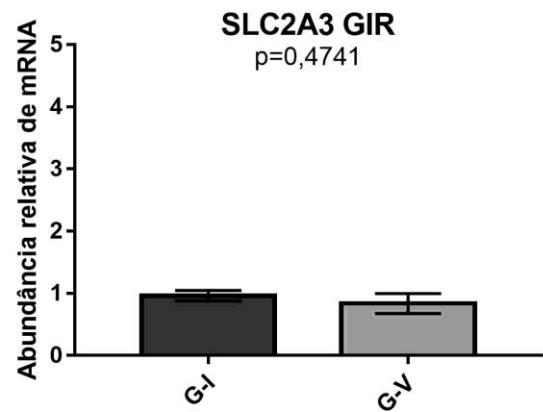
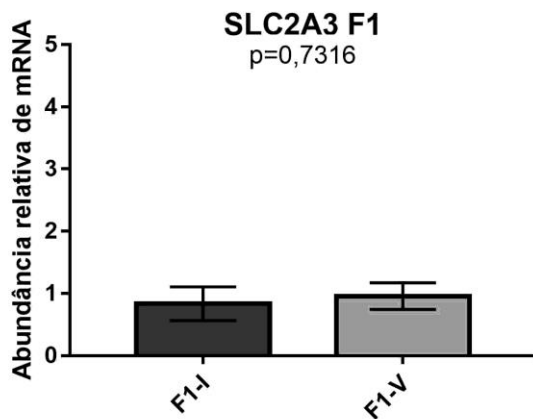
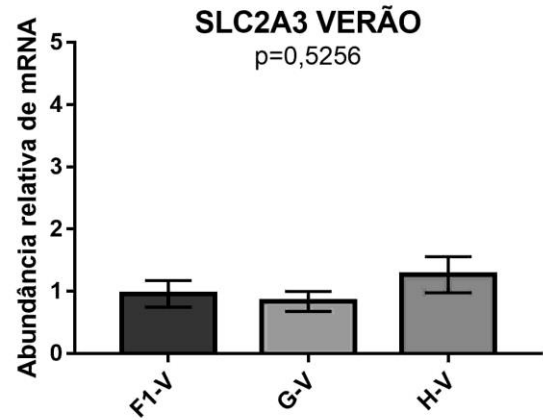
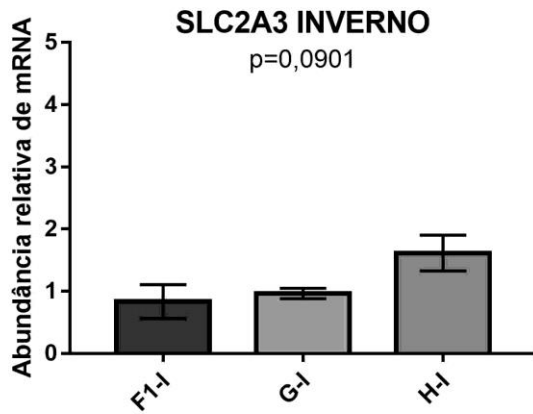
YIN, C. *et al.* Heat stress induces distinct responses in porcine cumulus cells and oocytes associated with disrupted gap junction and trans-zonal projection colocalization. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 4, p. 4787-4798, 2019.

ZHAO, P. *et al.* Neurotoxicity induced by arsenic in Gallus Gallus: Regulation of oxidative stress and heat shock protein response. **Chemosphere**, v. 166, p. 238-245, 2017.

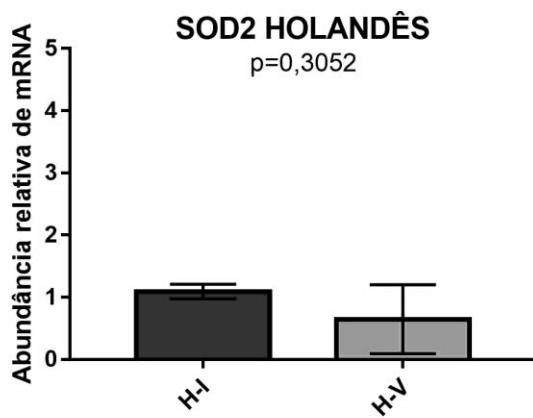
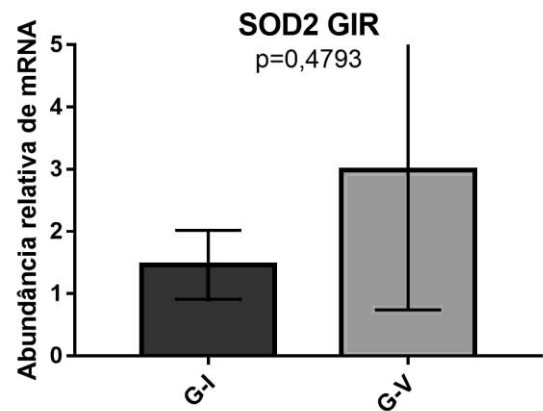
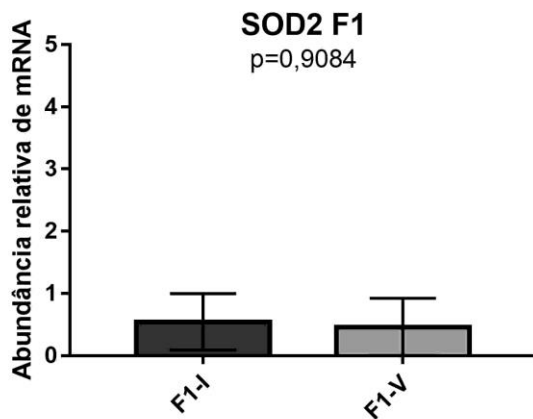
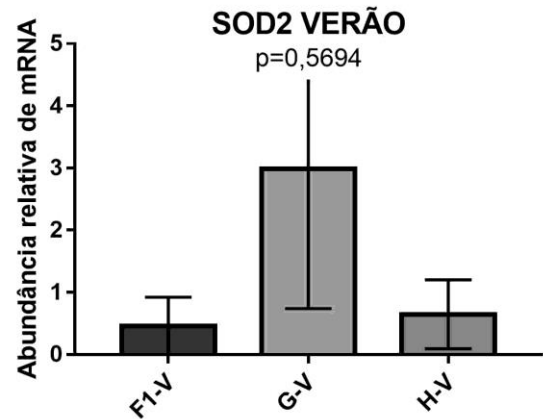
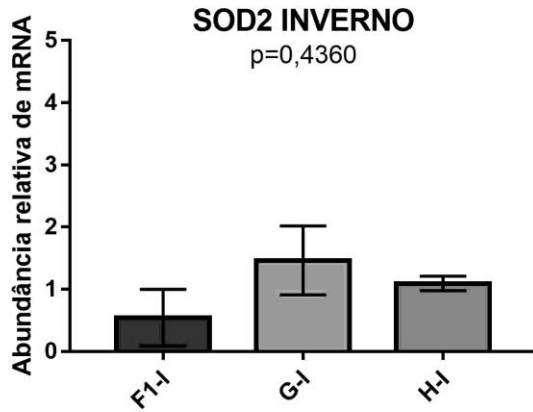
ZHENG, P.; VASSENA, R.; LATHAM, K.E. Effects of in vitro oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos. **Molecular human reproduction**, v. 13, n. 6, p. 361-371, 2007.

APÊNDICES

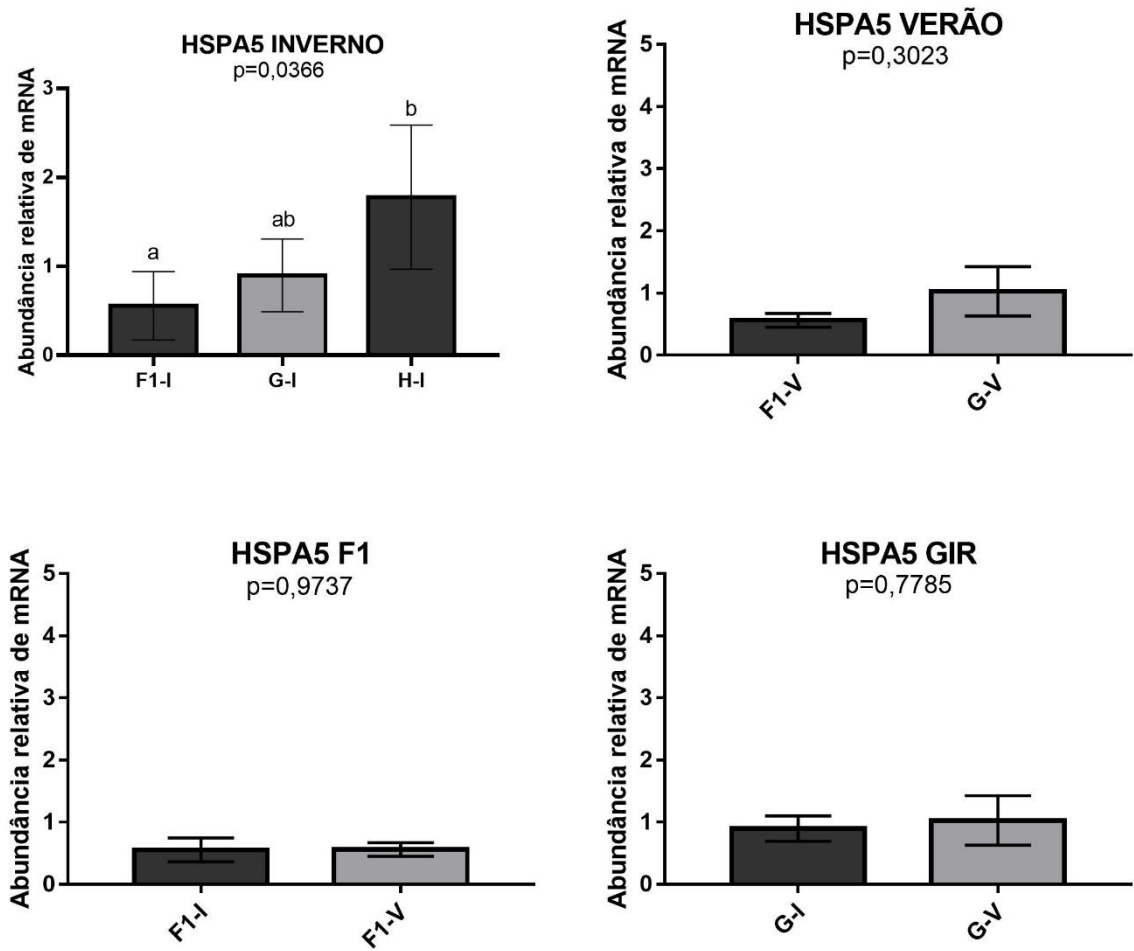
APÊNDICE A - Expressão do gene SLC2A3 em ovócitos de doadoras $\frac{1}{2}$ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V).



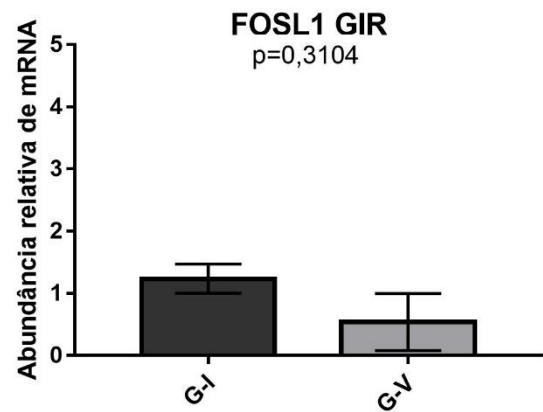
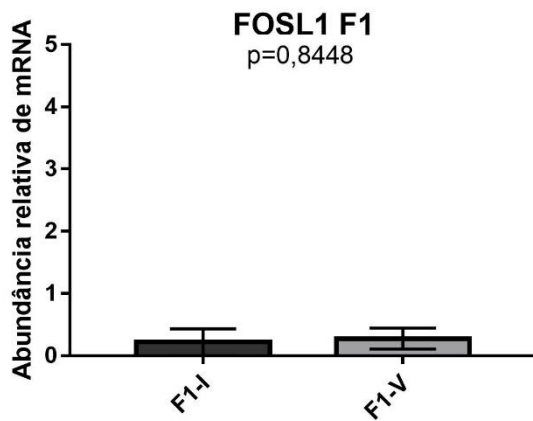
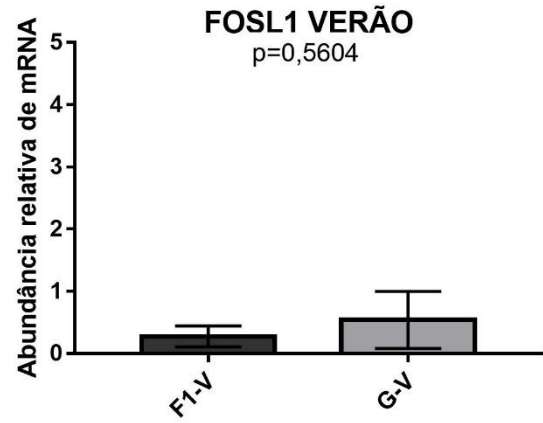
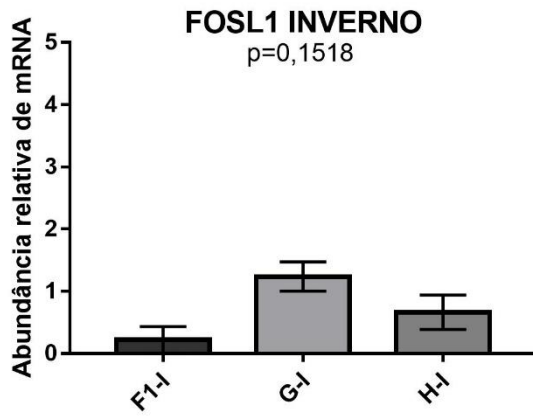
APÊNDICE B - Expressão do gene SOD2 em ovócitos de doadoras $\frac{1}{2}$ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V).



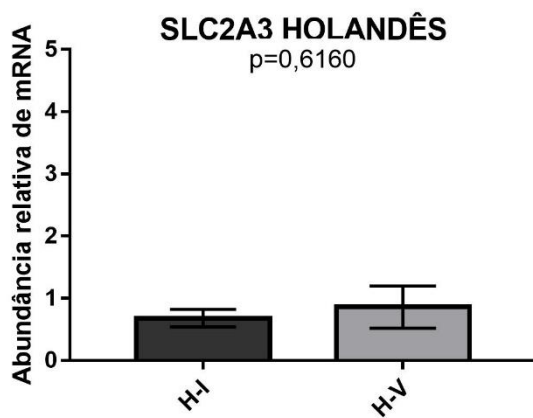
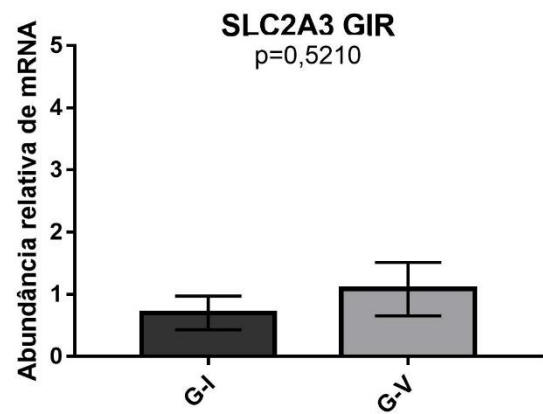
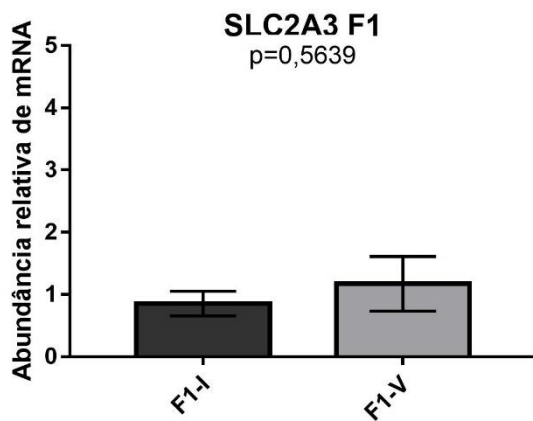
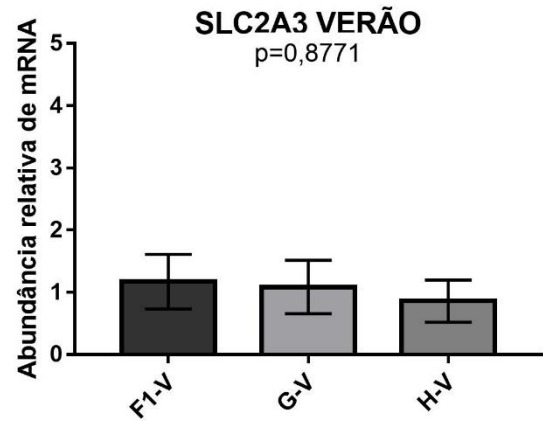
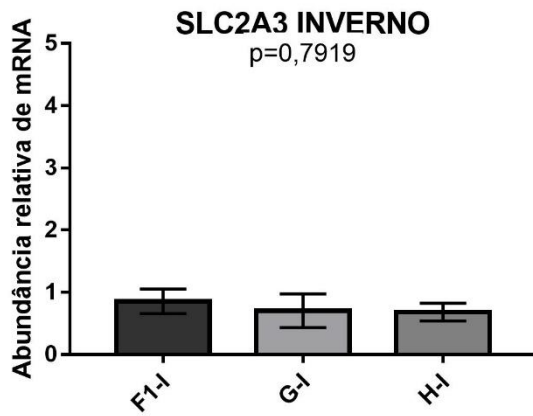
APÊNDICE C - Expressão do gene HSPA5 em ovócitos de doadoras $\frac{1}{2}$ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V).



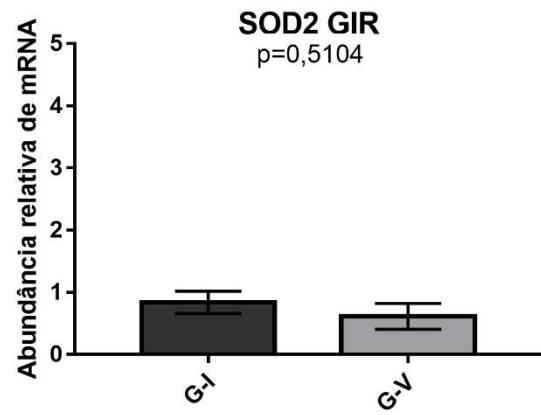
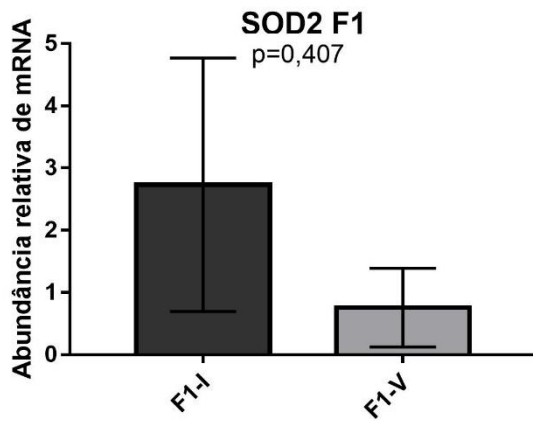
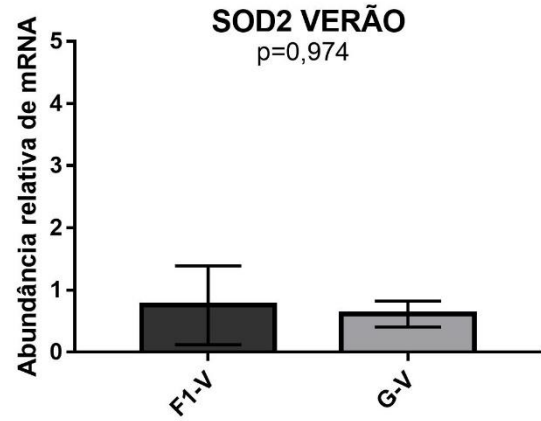
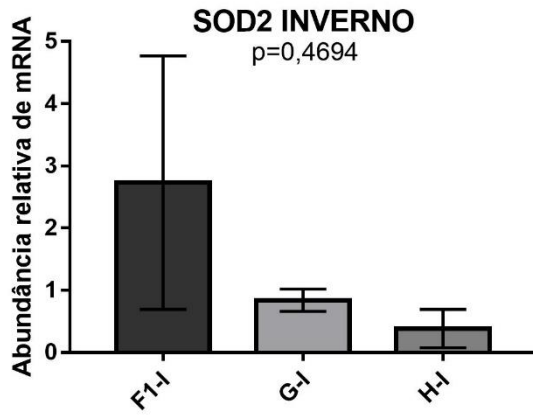
APÊNDICE D - Expressão do gene FOSL1 em ovócitos de doadoras $\frac{1}{2}$ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V).



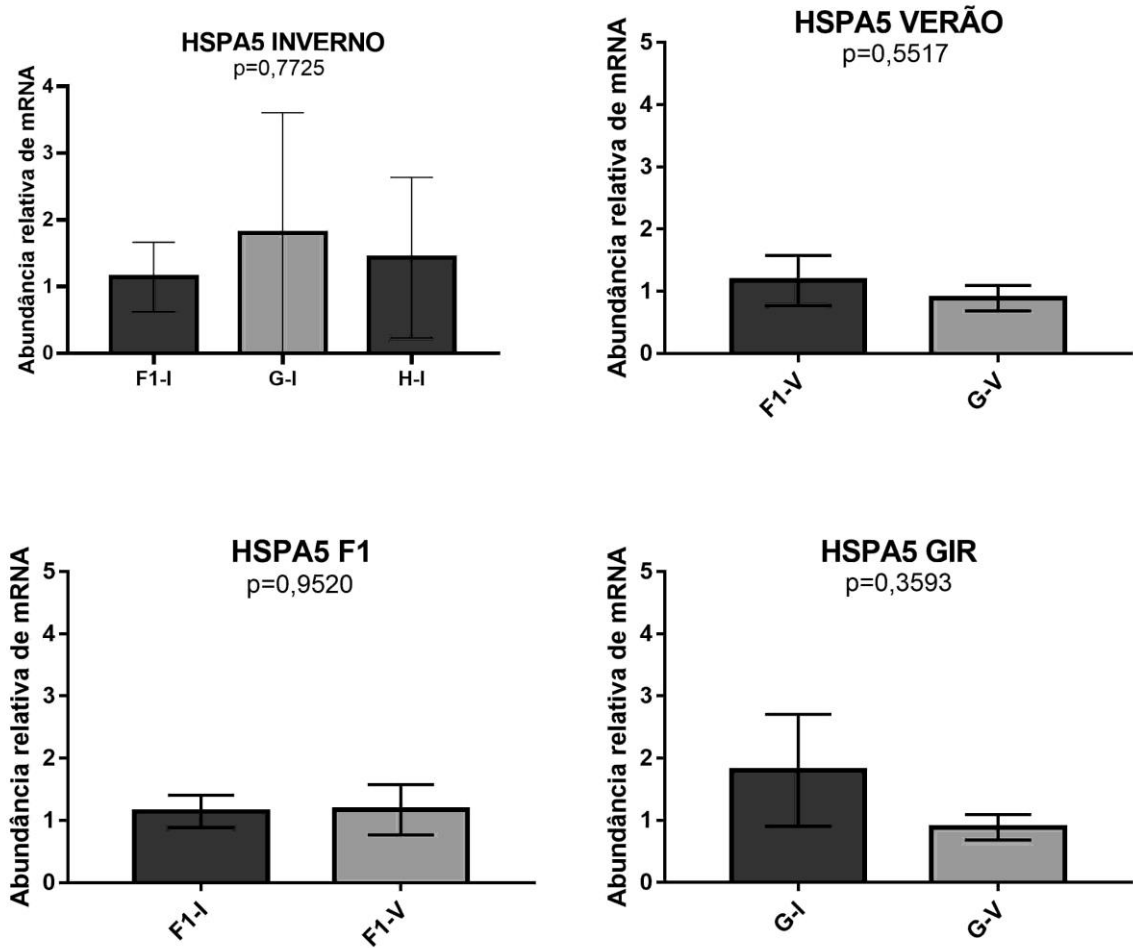
APÊNDICE E - Expressão do gene SLC2A3 em células do *cumulus* de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V).



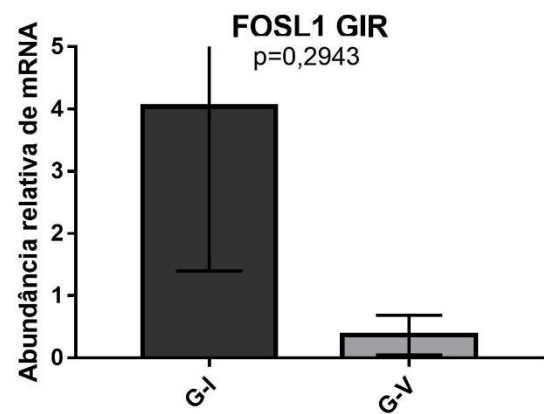
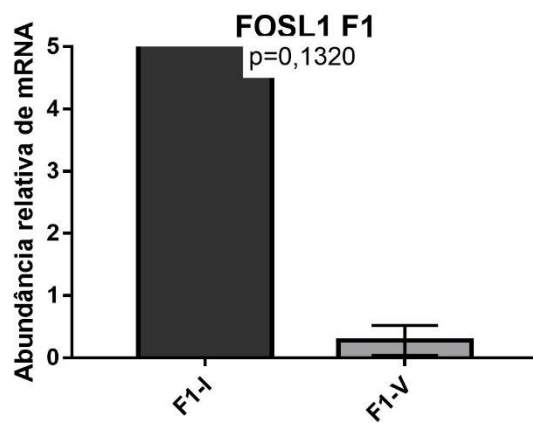
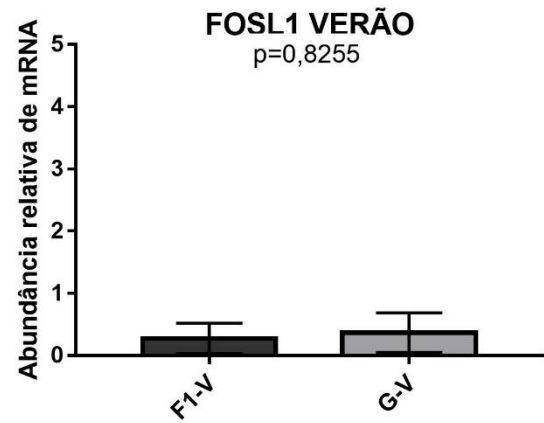
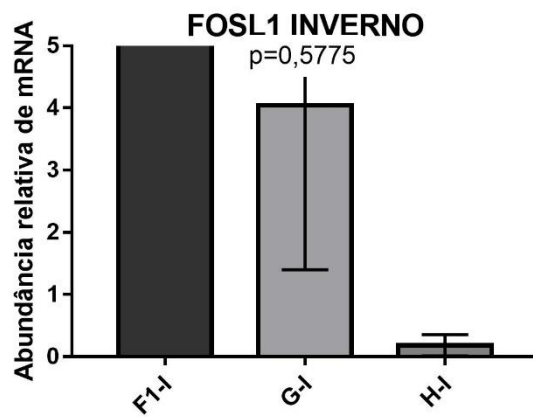
APÊNDICE F - Expressão do gene SOD2 em células do *cumulus* de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V).



APÊNDICE G - Expressão do gene HSPA5 em células do *cumulus* de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V).



APÊNDICE H - Expressão do gene FOSL1 em células do *cumulus* de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V).



APÊNDICE I - Expressão do gene GPX3 em células do *cumulus* de doadoras ½ sangue Gir-Holandês (F1), Gir (G) e Holandês (H) nas estações de inverno (I) e verão (V).

