



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

JOSÉ RICARDO NEVES DA SILVA

Efeito do estresse térmico durante a gestação sobre
o desenvolvimento somático e parâmetros
reprodutivos da progênie feminina de
camundongos

Dissertação de Mestrado submetida a Universidade Federal Fluminense visando à
obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia

Orientadores: Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista



Niterói
2020

JOSÉ RICARDO NEVES DA SILVA

Efeito do estresse térmico durante a gestação sobre o desenvolvimento somático e parâmetros reprodutivos da progênie feminina de camundongos

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Apoio Financeiro: CNPq, FAPERJ.

Dissertação de Mestrado
Submetida à Universidade
Federal Fluminense como
requisito parcial visando à
obtenção do grau de Mestre em
Ciências e Biotecnologia

Orientadores: **Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan**
Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

S586e Silva, José Ricardo Neves da
Efeito do estresse térmico durante a gestação sobre o desenvolvimento somático e parâmetros reprodutivos da progênie feminina de camundongos / José Ricardo Neves da Silva ; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan, orientadora ; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista, coorientador. Niterói, 2020.
71 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPBI.2020.m.05522468750>

1. Reprodução animal. 2. Foliculogênese. 3. Embriogênese. 4. Aquecimento global. 5. Produção intelectual. I. Fabjan, Joanna Maria Gonçalves de Souza, orientadora. II. Batista, Ribrio Ivan Tavares Pereira, coorientador. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD -

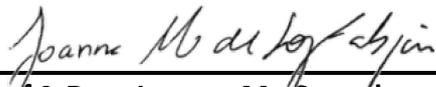
Bibliotecário responsável: Sandra Lopes Coelho - CRB7/3389

JOSÉ RICARDO NEVES DA SILVA

Efeito do estresse térmico durante a gestação sobre o desenvolvimento somático e parâmetros reprodutivos da progênie feminina de camundongos

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia

Banca Examinadora:



Prof.^a Dra. Joanna M. Gonçalves de Souza Fabjan – Departamento de Patologia e Clínica Veterinária – UFF (Orientador/Presidente)



Prof. Dr. Claudio Cesar Cirne dos Santos – Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFF



Prof. Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira – Embrapa Gado de Leite



Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales – Departamento de Medicina Veterinária – UFJF

AGRADECIMENTOS

Creio que palavras não são suficientes para dar significado ao esplendor da gratidão que tenho por todas as pessoas que contribuíram e que fizeram parte dessa minha jornada. Meus sinceros agradecimentos! Entretanto, gostaria de fazer alguns agradecimentos especiais:

À minha família, especialmente aos meus pais Zulene Neves e José Silva, por todo o esforço que fizeram para me proporcionar uma educação digna, por todo exemplo de vida, honestidade e trabalho que fazem de mim a pessoa que sou hoje.

À Profa. Dra. Joanna Fabjan, minha orientadora, excelente profissional que ama o que faz! Obrigado por confiar em mim, pelo teu apoio, por transmitir calma, por ser sensível, por me dizer quando eu precisava parar um pouquinho e quando eu precisava seguir em frente! Obrigado por mostrar que a meta é um aliado e que a conquista é o conhecimento, e que esse deve ser o tempo todo renovado. Obrigado por ser esse exemplo de pessoa, que trabalha sempre com sorriso no rosto, que aplaude, que vibra com as conquistas de todos! Você existe! E todo elogio é pouco.

Ao Prof. Dr. Ribrio Batista, meu orientador, excelente profissional, apaixonado por biologia molecular! Agradeço imensamente pela oportunidade de fazer parte desse projeto, obrigado por todos os ensinamentos, pelas nossas reuniões virtuais sempre muito produtivas, pela grandiosa paciência ao responder todas as minhas dúvidas, por me mostrar o caminho certo na interpretação dos dados estatísticos. Obrigado por ser essa pessoa tranquila, brilhante, e por tornar fácil o que para mim era difícil!

Ao Prof. Dr. Robson C. Silva, Sâmara B. Dias, Cristiane R. F. Moura e Isaías O. Gino, pela importante colaboração, sem as quais esse trabalho não seria possível. Obrigado!

Ao grupo GERAD, obrigado pelo apoio, motivação, por todos os ensinamentos e contribuições, por todos os sorrisos e pelo companheirismo. Um obrigado especial à minha amiga Viviane Lopes Brair, por todas as vezes que mandei mensagem pedindo uma ajudinha, à minha querida Tays Freitas por se preocupar comigo, por contribuir com meu trabalho e por todas as indicações de literatura que me enviou. Muito obrigado!

À Universidade Federal Fluminense pelo acolhimento e ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia da qual sinto-me extremamente honrado em fazer parte. Agradeço também as agências de fomento: CNPq, CAPES e FAPERJ.

Ao Centro Pan-Americano de Febre Aftosa, em especial à Anna Paula de Souza Alvin, por todo carinho e apoio e ao meu grande amigo Diego Santos, por cobrir minha ausência sempre que necessário. Muito obrigado!

Um agradecimento especial e um pedido de desculpas à minha pequena Ana Beatriz Neves da Silva, por todas as vezes que, com muita dor no coração, tive que dizer agora não, para um pedido de “vamos brincar”. A você, todo meu amor!

À minha pequena Ana Beatriz Neves da Silva.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	X
Lista de ilustrações	XIII
Resumo	XV
Abstract	XVI
1. Introdução	1
1.1 Modelo experimental: O camundongo	2
1.1.2 Perfil reprodutivo de camundongos	4
1.2 Estresse térmico	5
1.2.1 Efeito do estresse térmico na reprodução	8
1.2.2 Efeito do estresse térmico na foliculogênese	9
1.2.3 Efeito do estresse térmico no oócito	11
1.2.4 Efeito do estresse térmico no desenvolvimento embrionário	14
1.3 Adaptação epigenética à temperatura.....	16
1.4 Produção <i>in vivo</i> de embriões	17
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Metodologia	22
3.1 Ética e local do estudo	22
3.2 Desenho experimental	22
3.3 Indução do estresse térmico	23
3.4 Desenvolvimento somático da progênie	23
3.5 Superovulação e coleta de embriões	24
3.6 Histologia ovariana	24
3.7 Análise estatística	25
4. Resultados	26
4.1 Taxa de gestação, prolificidade e peso ao nascimento.....	26
4.2 Desenvolvimento somático	26
4.3 População folicular ovariana	28
4.4 Resposta superovulatória e produção embrionária	31
5. Discussão	32
6. Considerações finais	39

6.1 Conclusões	39
6.2 Perspectivas	39
7. Referências bibliográficas	40
7.1 Obras citadas	40
8. Apêndices e anexos	55
8.1 Folha de aprovação do comitê de ética	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ATP – Adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)
- BAX – Bcl-2 Associated X-protein (proteína X associada a BCL-2)
- BSA – Bovine serum albumin (albumina séria bovina)
- °C – Graus celsius
- CCO – Complexo *cumulus* oócito
- CEUA – Comissão de Ética na Utilização de Animais
- CL – Corpo lúteo
- CONT – Grupo controle
- DAPI – 4',6'-diamino-2-fenil-indol
- DNA – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
- DNOoc – Diâmetro médio do núcleo do oócito
- EC – Espessura do corte histológico
- eCG – Equine chorionic gonadotropin (gonadotrofina coriônica equina)
- EGF – Estresse térmico gestação final
- EGI – Estresse térmico gestação inicial
- EGT – Estresse térmico gestação total
- ETC – Estresse térmico pelo calor
- FPa – Folículos primários
- FS – Folículos secundários
- FSH – Follicle stimulating hormone (hormônio folículo estimulante)
- FT – Folículos Terciários

GnRH – Gonadotropin-releasing hormone (hormônio liberador de gonadotrofinas)

hCG – Human chorionic gonadotropin (gonadotrofina coriônica humana)

HE – Hematoxylin-eosin (Hematoxilina-eosina)

HPA – Hypothalamic–pituitary–adrenal (hipotálamo-hipófise-adrenal)

HPG – Hypothalamic–pituitary–gonadal (hipotálamo-hipófise-gonadal)

HSP – Heat shock proteins (proteínas do choque térmico)

IETS – International Embryo Technology Society (Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões)

IL-1 β – Interleukin 1 Beta (interleucina 1 beta)

ITU – Índice de temperatura e umidade

LH – Luteinizing hormone (hormônio luteinizante)

mRNA – Messenger RNA (RNA mensageiro)

ncRNAs – Non-coding RNAs (RNAs não codificantes)

NF – Número de folículos

NS – Número de secções

NSO – Número de secções observadas

PBS – Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)

PF – População folicular

ROS – Espécies reativas do oxigênio

RNA – Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)

SOV – Superovulação

STAT5B – Signal Transducer And Activator Of Transcription 5B (transdutor de sinal e ativador da transcrição 5B)

TAF – Taxa de ativação folicular

TF – Total de folículos

TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

UR – Umidade relativa do ar

Zeb2 – Zinc finger E-box Binding homeobox 2 (A homeobox 2 de ligação à E-box do dedo de zinco)

ZGA – Zygotic genome activation (ativação do genoma embrionário)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do desenvolvimento embrionário de camundongos da fertilização à formação do blastocisto.....	3
Figura 2: Estimativa da população folicular ovariana (população total e primordial) de camundongos de diferentes linhagens aos 42 dias de vida.....	4
Figura 3: Classificação de embriões bovinos de acordo com a qualidade morfológica (adaptado de Viana 2009)	19
Figura 4: Esquema ilustrativo da câmara ambiental utilizada para indução do estresse térmico em camundongos C57BL/6, fêmeas, em diferentes momentos do período gestacional de acordo com o grupo experimental.....	23
Figura 5: Quantificação da população folicular ovariana da progênie feminina (população F1) de camundongos C57BL/6 expostas ao ETC durante o desenvolvimento embrionário em diferentes momentos do período gestacional.....	29
Figura 6: Taxa de folículos ativados contabilizados a partir das análises histológicas da população folicular ovariana, da progênie feminina (população F1) de camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas expostas ao ETC durante o desenvolvimento embrionário e submetidas ao protocolo de superovulação.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxa de prenhez, média de crias nascidas e peso ao nascimento da população F1 de camundongos C57BL/6 fêmeas submetidas ao ETC em diferentes momentos do período gestacional.....	26
Tabela 2: Análise do desenvolvimento somático, evolução do peso (em gramas), da população F1 (machos e fêmeas) de camundongos C57BL/6 submetidos ao ETC durante diferentes momentos do período gestacional.....	27

Tabela 3: Análise do desenvolvimento somático, evolução do peso (em gramas), da população F1 (fêmeas) de camundongos C57BL/6 submetidas ao ETC durante diferentes momentos do período gestacional.....	28
Tabela 4: Produção de embriões da população F1, após a superovulação, por fêmea de camundongos C57BL/6 submetidas ao ETC durante o desenvolvimento embrionário em diferentes momentos do período gestacional.....	31

RESUMO

Com o avanço do aquecimento global, o estresse térmico pelo calor (ETC) emerge e se intensifica a cada ano como um dos principais fatores responsáveis pela redução do desempenho reprodutivo animal. Este problema afeta aproximadamente 60% da população mundial de gado causando graves perdas econômicas. Dessa forma, é imprescindível o conhecimento dos efeitos do ETC sob a capacidade reprodutiva animal e os possíveis impactos no perfil reprodutivo da prole exposta ao ETC no útero materno. Neste estudo objetivou-se avaliar o impacto do ETC na população F1 feminina de camundongos da linhagem C57BL/6 submetidas ao ETC durante o desenvolvimento embrionário / fetal em diferentes momentos do período gestacional. Para isso, o desenvolvimento intrauterino (peso ao nascer), desenvolvimento somático (peso durante o desenvolvimento pós-natal até oito semanas de idade) e parâmetros reprodutivos (quantificação da população folicular ovariana e resposta ao protocolo de superovulação) foram avaliados nas progêneses femininas dos grupos i) estressados termicamente (41°C e 65% de umidade relativa) durante a primeira metade da gestação (EGI); ii) segunda metade da gestação (EGF); iii) durante toda a gestação (EGT) e controle, mantidas em condições normotérmicas (CONT). O ETC afetou o desenvolvimento intrauterino da população F1 em todos os grupos tratados em relação ao CONT ($P < 0,0001$), sendo o efeito deletério mais proeminente quando o ETC ocorreu na primeira metade da gestação, resultando na diferença ($P < 0,05$) entre os grupos EGI e EGT em comparação com o grupo EGF. Em adição, o ETC promoveu alteração do desenvolvimento somático da prole nos grupos EGI e EGT. Além disso, alterou o perfil da população folicular ovariana ao reduzir o número de folículos primordiais no grupo EGI em relação aos grupos de EGF e EGT ($P < 0,05$) e reduziu a taxa de ativação folicular do grupo EGT em relação ao grupo EGI ($P < 0,05$). Na avaliação da produção embrionária em F1, após a superovulação, verificamos que o ETC promoveu redução ($P < 0,05$) de estruturas embrionárias viáveis no grupo EGT quando comparado ao CONT. Em conjunto, os resultados sinalizam que o ETC durante a gestação afetou negativamente o desenvolvimento intrauterino e o desenvolvimento somático da população F1, alterou o perfil da população folicular ovariana da progênie feminina, e comprometeu a resposta ovariana à superovulação e produção de embriões.

Palavras-chave: aquecimento global, foliculogênese, embriogênese, epigenética, reprodução.

ABSTRACT

With the advancement of global warming, heat stress (HS) due to heat emerges and intensifies each year as one of the main factors responsible for the reduction of animal reproductive performance. This problem affects approximately 60% of the world's livestock population, causing severe economic losses. Thus, it is essential to know the effects of HS on the animal's reproductive capacity and the possible impacts on the reproductive profile of the offspring exposed to HS in the maternal uterus. This study aimed to evaluate the impact of HS on the F1 female population of mice of C57BL/6 strain submitted to HS during embryonic / fetal development at different times of the gestational period. For this, intrauterine development (birth weight), somatic development (body weight during postnatal development up to eight weeks of age) and reproductive parameters (quantification of the ovarian follicular population and response to the superovulation protocol) were evaluated in the female progeny of the following groups i) thermally stressed (41 ° C and 65% relative humidity) during the first half of pregnancy (EGI); ii) second half of pregnancy (EGF); iii) during the whole pregnancy (EGT) and control, maintained in normothermic conditions (CONT). HS affected the intrauterine development of the F1 population in all groups treated in relation to CONT ($P < 0.0001$), with the most prominent deleterious effect when HS occurred in the first half of pregnancy, resulting in the difference ($P < 0.05$) between EGI and EGT groups compared to the EGF group. In addition, HS promoted alteration in the somatic development of the offspring in the EGI and EGT groups. In addition, it changed the profile of the ovarian follicular population by reducing the number of primordial follicles in the EGI group in relation to the EGF and EGT groups ($P < 0.05$) and reduced the follicular activation rate of the EGT group in relation to the EGI group ($P < 0.05$). In the evaluation of embryonic production in F1, after superovulation, we found that HS promoted a reduction ($P < 0.05$) of viable embryonic structures in the EGT group when compared to CONT. Taken together, these results indicate that maternal HS during pregnancy negatively affected intrauterine development and the somatic development of the F1 population, altered the ovarian follicular population profile of the female progeny, and compromised the ovarian response to superovulation and embryo production.

Keywords: global warming, folliculogenesis, embryogenesis, epigenetic, reproduction.

1. INTRODUÇÃO

O aquecimento global é uma realidade capaz de reduzir o bem-estar de diversos organismos vivos. Segundo o relatório do *Intergovernmental Panel on Climate Change* de 2018, a temperatura média do período 2006-2015 foi 0,87 °C mais alta do que a média do período de 1850-1900. Ainda de acordo com este relatório, a temperatura média global pode aumentar 1,5 °C entre 2030-2052. Nessa direção, BASTIN *et al.* (2019) em suas estimativas pontuaram a vulnerabilidade de cidades tropicais e subtropicais, das quais 30% das cidades analisadas em seu estudo, existirão em um regime climático completamente novo, essencialmente mais seco, até 2050. Essas mudanças no clima representam uma grande ameaça à sobrevivência de muitas espécies e ecossistemas, e impactam substancialmente na sustentabilidade financeira dos sistemas de produção em várias partes do mundo (HOFFMANN *et al.*, 2010).

De acordo com o levantamento da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes 2019, o Brasil é um dos protagonistas, a nível mundial, no setor de produção animal. Além disso, o país possui grande parte do seu território situado na faixa tropical do planeta, onde as altas temperaturas são frequentes (BAENA *et al.*, 2019). De acordo com HENRY *et al.* (2018) mais da metade da produção mundial de carne e leite são oriundas de áreas tropicais e subtropicais. Prevê-se ainda que a produção pecuária nessas áreas continuará a sustentar a demanda mundial de carne (RENAUDEAU *et al.*, 2012).

A alta temperatura ambiental nos meses de verão é considerado um fator extremamente prejudicial para a pecuária, ao comprometer a produtividade e impactar nas funções reprodutivas dos animais. Estes, na tentativa de se adaptar às condições ambientais, desviam recursos energéticos para a manutenção das atividades vitais do organismo em detrimento de outros processos biológicos (AMITHA *et al.*, 2019). Assim, o estresse térmico pelo calor (ETC) é definido como sendo o resultado da incapacidade do animal em dissipar o calor excedente de forma satisfatória para manter a sua homeotermia (WEST, 1999). Alguns estudos de abordagem reprodutivas, têm relatado queda de aproximadamente 25% nas taxas de concepção para cada aumento de 1 °C na temperatura interna do animal, além de aumento do intervalo de partos e redução da

produção animal (PAVANI *et al.*, 2015). Além disso, a diminuição da fertilidade do animal associada ao ETC durante o verão contribui para o declínio da eficiência de técnicas reprodutivas como a superovulação (VARGAS *et al.*, 2019).

Como consequências do aumento da temperatura, ocorrem efeitos deletérios na função celular que incluem i) inibição da síntese de DNA, transcrição, processamento de RNA e tradução; ii) inibição da progressão do ciclo celular; iii) dobramento incorreto de proteínas; iv) aumento da degradação de proteínas através de vias proteossômicas e lisossomais; v) ruptura dos componentes do citoesqueleto; vi) alterações no metabolismo que levam a uma redução líquida de ATP celular; e vii) alterações na permeabilidade da membrana que levam a um aumento de Na⁺, H⁺ e Ca²⁺ intracelular (LINDQUIST, 1986; KUHL e RENSING, 2000). Apesar disso, pouco se sabe a respeito dos efeitos do ETC no perfil reprodutivo de mamíferos e da capacidade adaptativa desses animais à alterações ambientais.

Considerando as inúmeras projeções de aumento da temperatura global, torna-se necessário o aprofundamento da compreensão dos mecanismos pelo qual o ETC impacta na capacidade reprodutiva animal, e a extensão dos efeitos na prole, incluindo a capacidade de resposta desses animais à técnicas reprodutivas como a superovulação, largamente utilizada para produção de embriões em animais de criação. Nesse aspecto, os camundongos, devido seu período gestacional curto (de 18 a 21 dias) e ciclos regulares, constituem um modelo eficiente para investigar mudanças que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (CALIGIONI, 2009; GOUGOULA *et al.*, 2019). O entendimento dos impactos do ETC na capacidade reprodutiva em mamíferos, poderá contribuir para o aprimoramento de metodologias voltadas para a otimização das respostas produtivas no campo (NÓBREGA *et al.*, 2011).

1.1 Modelo experimental: O camundongo

O camundongo é o modelo experimental mais bem conhecido e extensivamente utilizado na pesquisa científica. O pequeno tamanho, fácil manejo, a rápida aquisição da maturidade sexual e a alta prolificidade são algumas das características que fazem do camundongo um modelo atraente na pesquisa científica (SOBRINHO, 2018).

O estabelecimento de linhagens consanguíneas, como o camundongo C57BL/6, representa um avanço importante para pesquisa científica. Devido a homoziguidade genética das linhagens consanguíneas, reduz-se a variabilidade fenotípica levando a uma uniformidade das características herdáveis (FESTING, 2004; BATISTA et al., 2010). Tais características são particularmente interessantes para estudos relacionados a biologia da reprodução. Segundo AKBARINEJAD et al. (2017), questões de cunho reprodutivos são amplamente influenciadas por fatores genéticos. Além disso, o estabelecimento de linhagens consanguíneas tornou possível o uso de menos animais para concluir um experimento, e proporcionou um modelo poderoso para estudos que envolvem edições gênicas, permitindo que os efeitos das modificações sejam melhor examinados devido uma menor interferência da variabilidade genética entre os indivíduos de um experimento (FESTING, 2004).

No que tange aos aspectos comparativos da biologia embrionária, os camundongos compartilham características comuns a outras espécies, já que os embriões de mamíferos são morfologicamente semelhantes e desenvolvem-se de zigoto a blastocistos (Figura 1) antes de eclodir e implantar (TAFT, 2008; SOBRINHO, 2018). Desta forma, os embriões murinos são amplamente utilizados em pesquisas relacionadas à biologia do desenvolvimento (BATISTA et al., 2010). Entretanto, devido as particularidades de mecanismos fisiológicos entre os animais, muitas vezes torna-se inapropriado transpor resultados diretamente de uma espécie para outra. Algumas das principais diferenças entre as espécies, em relação à biologia do desenvolvimento embrionário, residem no tempo de desenvolvimento do embrião, metabolismo energético e estratégia de implantação embrionária (TAFT, 2008). Por outro lado, modelos experimentais como o camundongo são extremamente úteis para desenvolver e refinar hipóteses a serem testadas posteriormente em espécies de interesse (TAFT, 2008).

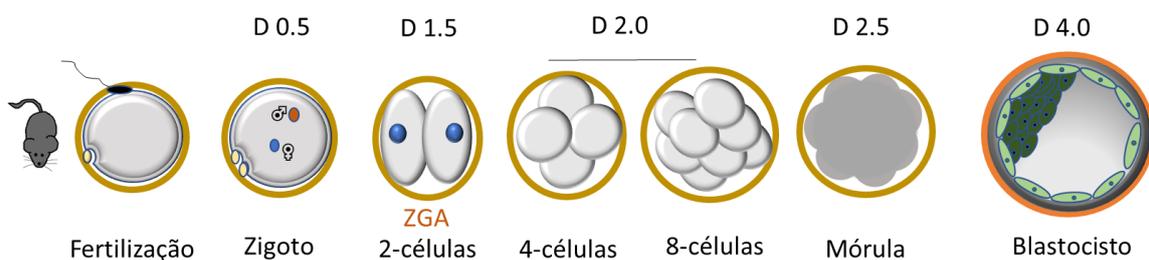


Figura 1. Esquema representativo do desenvolvimento embrionário de camundongos da fertilização à formação do blastocisto, em dias (D). ZGA: ativação do genoma embrionário; adaptado de ORON E IVANOVA, (2012).

1.1.2 PERFIL REPRODUTIVO DE CAMUNDONGOS

Os camundongos tornam-se sexualmente maduros entre cinco e oito semanas de idade, se reproduzem bem em temperaturas ótimas de 18 a 23 °C e umidade relativa do ar entre 40 e 60%. Estes animais possuem período gestacional curto (de 18 a 21 dias), e o número médio de filhotes varia conforme a linhagem, sendo que para camundongos da cepa C57BL/6J a média é de 5,4 filhotes por gestação (JACKSON LABORATORY, 2009). Entretanto, quando submetidos ao protocolo padrão de superovulação, a média de filhotes aumenta para 11,5 por gestação (HASEGAWA *et al.*, 2016).

De acordo com TINGEN *et al.* (2009), do nascimento até a puberdade os ovários de camundongos sofrem uma perda massiva de folículos primordiais, declinando de aproximadamente 10.000 folículos no dia seis pós-natal para 3.000 folículos após 45 dias do nascimento. Além disso, segundo as estimativas de CANNING *et al.* (2003), a reserva folicular ovariana em camundongos varia conforme a linhagem (Figura 2).

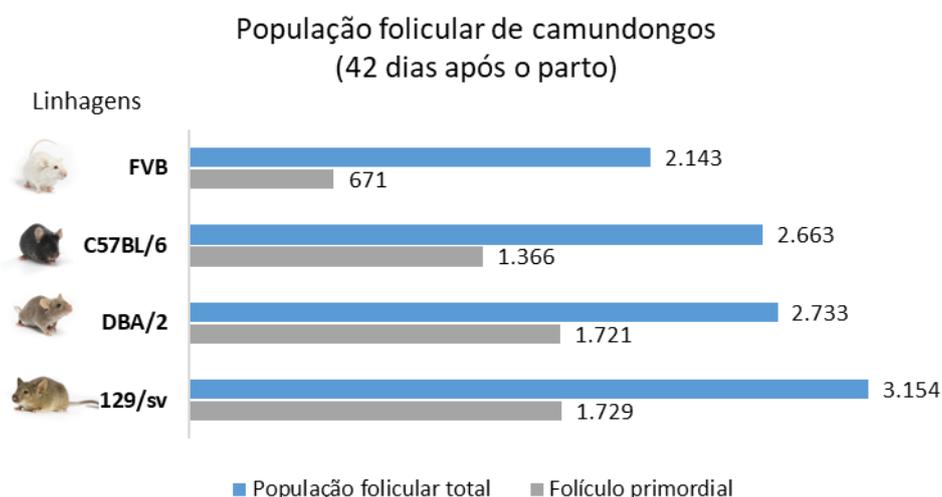


Figura 2. Estimativa da população folicular ovariana (população total e primordial) de camundongos de diferentes linhagens aos 42 dias de vida (CANNING *et al.*, 2003).

Em camundongos o tempo necessário para o desenvolvimento do folículo primordial até a ovulação é de 21 a 28 dias (FINDLAY *et al.*, 2019). A duração do período fértil bem como a expectativa de vida dos camundongos varia conforme a cepa e o sexo.

Para linhagens consanguíneas, como camundongos da cepa C57BL/6J, fêmeas, o período fértil dura em média um ano e meio, e a expectativa de vida é de aproximadamente dois anos e meio (BRUST *et al.*, 2015).

O ciclo estral de camundongos fêmeas é dividido em quatro estágios (proestro, estro, metaestro e diestro). Este, na ausência de gestação, pseudogestação ou anestro, se repete a cada quatro a cinco dias (BYERS *et al.*, 2012). Durante o estro, a fêmea fica receptiva ao macho e o acasalamento normalmente ocorre no período noturno. O acasalamento bem-sucedido é verificado pela presença de plugue de cópula (JACKSON LABORATORY, 2009), objeto firme esbranquiçado, muitas vezes preenchendo completamente a vagina da fêmea. O propósito do plugue de cópula é evitar o reacasalamento por outro macho e ajudar a reter o ejaculado no útero (PRITCHETT E TAFT, 2007).

No camundongo, após a fertilização, o primeiro dia de gestação é marcado pela proliferação do epitélio endometrial. O útero murino é receptivo à implantação do blastocisto no quarto dia da gestação (CHA *et al.*, 2012). Durante o processo de implantação ocorre a diferenciação das células estromais e a decidualização se espalha por todo o estroma ao redor da câmara de implantação. De outro modo, na ausência de implantação, o útero torna-se não-receptivo no quinto dia, ocorrendo a luteólise (ADAMS E DEMAYO, 2015). Embora existam diferenças nas estratégias de implantação embrionária entre as espécies, o processo da implantação embrionária no camundongo, bem como em bovinos, humanos e outros mamíferos, é controlado por esteroides ovarianos, fatores de crescimento e citocinas, comuns entres as espécies. Nesse sentido, o camundongo pode ser um modelo interessante para estudos que envolvem os processos que controlam a implantação embrionária em mamíferos (TAFT, 2008).

1.2 ESTRESSE TÉRMICO

A faixa de temperatura ambiental na qual se estabelece um equilíbrio entre o calor gerado pelo metabolismo em repouso e a taxa de calor perdido para o ambiente é conhecida como zona termoneutra. Dentro desta zona, os ajustes comportamentais, posturais e vasomotores são suficientes para manter uma perfeita sinergia entre a geração e perda de calor (BEALE *et al.*, 2017). Neste caso, não há, portanto, alterações

regulatórias na produção de calor metabólico ou perda de calor por evaporação (JAMES, 2001; PALLUBINSKY, 2019).

De acordo com CABANAC (2006), a característica fundamental de um sistema regulatório é a capacidade de promover uma resposta fisiológica de correção que se opõe ao desvio de uma variável regulada. No caso da termorregulação, quando a temperatura interna se aproxima ou ultrapassa os limites da zona de conforto térmico do animal, ocorre uma resposta fisiológica direcionada à manutenção da homeostase (SKIBIEL *et al.*, 2018a). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal tem papel fundamental na resposta e resistência ao estresse. O hipotálamo é uma região cerebral que desempenha funções na regulação do sistema endócrino e nervoso, e pode converter informações do meio externo, como temperatura, em respostas direcionadas a manutenção da homeostase (HAN *et al.*, 2019).

Os mamíferos são animais endotérmicos com capacidade de produzir e manter a temperatura corporal dentro de faixas estreitas ao longo do dia. Para tanto, deve haver um equilíbrio entre a termogênese e a termólise (WOLFENSON E ROTH, 2019). Dentro da zona termoneutra, em que a temperatura ambiental é inferior ao limite superior da zona de conforto térmico do animal, o calor excedente, produzido pelo metabolismo, será transferido para o ambiente através dos mecanismos de condução convecção e radiação. Estes, são conhecidas como rotas sensíveis, pois, requerem um gradiente térmico entre o animal e o meio ambiente para operar com efetividade (COLLIER *et al.*, 2006). Já na situação em que a temperatura ambiental ultrapassa o limite superior da zona de conforto térmico do animal, o mecanismo evaporativo de troca de calor torna-se a única via disponível, o que pode comprometer a capacidade termorregulatória do animal (COLLIER *et al.*, 2006; HOOLE, 2019). Sendo assim, o ETC é uma condição fisiológica provocada por temperaturas ambientais acima do limite superior da zona de conforto térmico do animal. Nessa situação, o calor gerado é superior à taxa de dissipação (FERRAZZA *et al.*, 2017). Nesse contexto, se a alteração da relação térmica entre o organismo e o ambiente não for compensada, resultará em um estado de hipertermia (JAMES, 2001).

Em resposta ao ETC, os animais endotérmicos apresentam sinais fisiológicos que podem ser considerados como biomarcadores do estresse, são eles: frequência

respiratória, frequência cardíaca, temperatura da pele e temperatura retal (SEJIAN *et al.*, 2019). A frequência respiratória pode atuar como um sinal de alerta precoce da condição de ETC. O aumento da frequência respiratória indica que o animal iniciou um processo de adaptação para manter a homeostase, na tentativa de dissipar o calor excedente pelo mecanismo de resfriamento evaporativo. A frequência cardíaca reflete principalmente a homeostase da circulação e o estado metabólico geral (RASHANOL *et al.*, 2018). A temperatura da pele, quando mais elevada, pode ser atribuída parcialmente ao fato de que a exposição ao ETC promove a redistribuição do fluxo sanguíneo do centro do corpo para a superfície da pele. Tal estratégia possibilita otimizar a troca de calor entre o animal e o ambiente pelos mecanismos sensíveis, dependentes de gradientes de temperatura (condução, convecção e radiação), ou por evaporação, dependendo da eficiência das glândulas sudoríparas (COLLIN, 2001). A temperatura retal é usada como uma medida representativa da temperatura central do animal. O aumento da temperatura retal acima do limite aceitável, de acordo com a espécie, sinaliza o fracasso dos mecanismos de termorregulação do animal (RASHAMOL *et al.*, 2018).

Os roedores, que são em grande parte desprovidos de glândulas sudoríparas, apresentam, em resposta ao ETC, salivação excessiva. A saliva é espalhada através de movimentos de limpeza da boca para a superfície da pele do animal. A transferência do calor excedente para o ambiente ocorre, nesse caso, por meio da evaporação da saliva espalhada pela superfície do corpo do animal (SHELTON E ALBERTS, 2018). Além das alterações fisiológicas, em resposta ao ETC, os animais apresentam mudanças comportamentais como: redução de consumo de alimentos, a fim de minimizar a produção de calor metabólico, aumento de consumo de água e criação de microambientes favoráveis à troca de calor pelos mecanismos sensíveis (SHELTON E ALBERTS, 2018; LA SALLES *et al.*, 2017).

Vários fatores ambientais, como temperatura, umidade relativa e radiação solar podem influenciar de forma a condicionar o ETC (SOUZA-CÁCARES *et al.*, 2019). Por esse motivo, os índices utilizados para quantificar a carga de calor externo geralmente incluem algumas combinações, como por exemplo, o índice de temperatura e umidade (ITU), que combina o efeito simultâneo da temperatura e umidade relativa do ar. O ITU

tem sido amplamente utilizado para avaliar o grau de ETC na pecuária (FERRAZZA *et al.*, 2017; HEINICKE *et al.*, 2018; BAENA *et al.*, 2019). O estresse, em geral, é uma parte inevitável da vida e pode, potencialmente, alterar funções imunológicas, neuroquímicas, endócrinas e reprodutivas (XU *et al.*, 2018).

1.2.1 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA REPRODUÇÃO

O ETC é um dos principais fatores que contribui para a baixa fertilidade em mamíferos (AGUIAR *et al.*, 2020). O declínio da fertilidade induzida pelo ETC durante o verão é caracterizado pela sua natureza multifatorial (HALE *et al.*, 2017). A exposição materna a temperaturas elevadas impacta em uma variedade de aspectos relacionados à reprodução. Nesse sentido, AN *et al.* (2020) relataram a supressão de hormônios reprodutivos, alteração do ciclo estral, disfunção uterina e insuficiência ovariana em ratos Sprague-Dawley fêmeas submetidas ao ETC (38 °C duas horas diárias por 90 dias). ULLAH *et al.* (2019) verificaram que camundongos fêmeas expostas ao ETC (40,5 °C, por duas horas em sete dias consecutivos) durante o início da gestação apresentaram aumento da temperatura retal, diminuição do peso corporal, redução dos locais de implantação embrionária e redução do nível sérico de progesterona.

De acordo com a literatura, a condição de saúde materna e as experiências vividas durante a gestação tem impacto substancial na saúde da prole (WAN *et al.* 2020). HAMID *et al.* (2012) demonstraram que a exposição de ratos Sprague-Dawley fêmeas gestantes à temperaturas elevadas (33 °C do segundo ao sétimo dia de gestação) reduziu o tamanho da ninhada, o peso ao nascer e alterou o perfil do desenvolvimento somático da prole. O baixo peso ao nascer, consequência do subdesenvolvimento intrauterino, é possivelmente resultado da diminuição da ingestão de alimentos pela mãe. Além disso, em resposta ao estresse em geral, ocorre o aumento dos níveis de glicocorticoides que inibe a expressão do transportador de glicose (GLUT1) na placenta, levando a uma diminuição da disponibilidade energética para o feto (GARCÍA-VARGAS *et al.*, 2019). É amplamente descrito que o comprometimento do crescimento embrionário no útero contribui para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, como alterações do metabolismo da glicose, resistência à insulina, obesidade, disfunção endócrina, cardiovasculares, pulmonares, neurológicos e reprodutivas (CHEONG *et al.*, 2016; LIMESAND *et al.*, 2018; VERSTRAETEN *et al.*, 2019; MAYVANEH *et al.*, 2020).

1.2.2 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA FOLICULOGÊNESE

Durante o desenvolvimento embrionário, as células germinativas primordiais provenientes do epiblasto, migram e colonizam as gônadas (CAI *et al.*, 2020), onde são envolvidas por uma única camada de células epiteliais achatadas, formando assim os folículos primordiais (GAYTAN *et al.*, 2015). Estes folículos, agora com o oócito central e parado na fase de diplóteno da prófase, constituem a reserva folicular ovariana (CAI *et al.*, 2020). O tamanho da reserva folicular ovariana está intimamente associado à capacidade e longevidade reprodutiva. Desta forma, é necessário que um certo número de folículos primordiais continue em estado de repouso, para prover um suprimento constante de folículos em desenvolvimento de forma a sustentar a fertilidade durante a vida reprodutiva do animal (GAYTAN *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2018). Evidências indicam que durante a gestação o tamanho da reserva folicular ovariana da prole pode sofrer influência de fatores ambientais, incluindo altas temperaturas (AKBARINEJAD *et al.*, 2017).

A transição de folículo primordial para folículo primário é caracterizada pela mudança morfológica nas células da granulosa, que passa de achatada para cuboide (GAYTAN *et al.*, 2015 KHAN *et al.*, 2020). Durante o desenvolvimento do folículo secundário as células da granulosa se proliferam progressivamente, uma membrana basal se forma ao redor da camada mais externa das células da granulosa, e uma camada adicional de células somáticas, chamadas células da teca, envolve o folículo dando origem a duas camadas celulares, a teca interna e externa. Os estágios de crescimento folicular, até então, são independentes da gonadotrofina, mas, demandam uma comunicação bidirecional entre o oócito e as células somáticas (RIMON-DAHARI *et al.*, 2016).

As células da granulosa e da teca desempenham um papel importante para o bom funcionamento do ovário; pois secretam uma série de fatores necessários para o desenvolvimento folicular ovariano normal (LUO *et al.*, 2016; WENG *et al.*, 2016; DALANEZI *et al.*, 2019). Desta forma, a competência do oócito para o crescimento, diferenciação e maturação está intimamente relacionada à proliferação e diferenciação das células da granulosa. Sendo assim, alterações da fisiologia das células da granulosa, mediado, por exemplo, por fatores ambientais como a alta temperatura, pode alterar o

destino dos folículos ovarianos (LI *et al.*, 2016). De fato, já foi descrito o comprometimento das células da granulosa, resultando em baixa atividade da aromatase com decréscimo da capacidade esteroideogênica, aumento da apoptose, e da atresia folicular em camundongos expostos ao ETC (LI *et al.*, 2016). De acordo com NABENISHI *et al.* (2012), o ETC contribui para a elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, aumento da apoptose. O estresse oxidativo mediado pelo aumento de ROS induz danos ao DNA, peroxidação lipídica e, além disso, impactam na função mitocondrial ao promover abertura de poros em sua membrana, liberando citocromo C e ativando caspases, culminando na morte celular (PÃES *et al.*, 2016; SAKATANI 2017). BEI *et al.* (2020) observaram, através de estudos histológicos de ovários de camundongos submetidos ao ETC crônico e agudo, que as células da granulosa, em resposta ao insulto térmico, apresentavam irregularidade, cariopinese, desordem e espaçamento entre as camadas celulares.

Após a formação do folículo secundário, o estágio subsequente do desenvolvimento folicular é dependente de gonadotrofinas hipofisárias: hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Durante esse processo ocorre o aparecimento de pequenas cavidades cheias de líquido intrafolicular que se unem para formar o antro, dando origem ao folículo antral ou terciário (RIMON-DAHARI *et al.*, 2016; SOBRINHO, 2018). Com a formação do antro ocorre a delimitação de duas populações distintas de células da granulosa: o *cumulus*, que envolve o oócito e as células da granulosa mural que revestem a parede folicular e são responsáveis por secretar hormônios esteroides (RIMON-DAHARI *et al.*, 2016).

As células da granulosa dos folículos que continuam o desenvolvimento passam a expressar alta concentração de receptores de LH; a aquisição de receptores de LH nas células da granulosa tem efeito funcional no processo de seleção de futuros folículos dominantes (RIMON-DAHARI *et al.*, 2016). Perturbações nesses eventos podem comprometer o grau de dominância dos folículos. Durante o ETC, ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e a inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) acarretando a supressão da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), conseqüentemente, na hipófise anterior, ocorre a redução da liberação do FSH e do LH (LA SALLES *et al.*, 2016). Níveis reduzidos de FSH e LH, durante

a fase final do desenvolvimento folicular, podem exercer efeitos substanciais no crescimento de folículos dominantes (VANSELOW *et al.*, 2016). Em decorrência disso, os eventos de retomada meiótica oocitária, expansão do *cumulus*, ruptura folicular e liberação do CCO são prejudicados (HANSEN, 2009). A redução do diâmetro e menor capacidade esteroidogênica em folículos pré-ovulatórios, que após a ovulação sofrem diferenciação para formar o corpo lúteo (CL), reflete negativamente no tamanho da estrutura lútea e na capacidade de síntese de progesterona, hormônio essencial para o sucesso da implantação e desenvolvimento embrionário (VANSELOW *et al.*, 2016; AMINTHA *et al.*, 2019) .

1.2.3 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NO OÓCITO

O crescimento do oócito é influenciado pelo microambiente folicular e ocorre de forma gradual, portanto, impactos durante o processo de foliculogênese, induzida pelo ETC, pode resultar na diminuição da competência oocitária (KHAN *et al.*, 2020). Oócitos de boa qualidade são considerados a chave para um bom desenvolvimento embrionário e reflete na saúde da prole (ZHOU *et al.*, 2014; LONERGAN *et al.*, 2019). Nesse sentido, AROYO *et al.* (2007) demonstraram que camundongos fêmeas submetidas a hipertermia apresentaram redução da competência oocitária para o desenvolvimento embrionário. Os zigotos recuperados, após o acasalamento, das fêmeas previamente estressadas apresentaram comprometimento do padrão de clivagem e menores taxas de desenvolvimento embrionário em cultivo.

Marcadores moleculares e a morfologia celular dos oócitos podem servir como critérios de qualidade para seleção dos oócitos que terão melhor capacidade no desenvolvimento embrionário após a fertilização (ZHOU *et al.*, 2014). As interações entre o oócito e as células do *cumulus* desempenham forte influência sobre a maturação oocitária. Nesse sentido, ocorre de forma bidirecional, através de projeções transzonais, a transferência de moléculas que participam do metabolismo celular, desenvolvimento e regulação da retomada da meiose. Conseqüentemente, a quantidade e a qualidade das células do *cumulus* no folículo desempenham papéis críticos no crescimento, desenvolvimento e maturação do oócito (EMANUELLI *et al.*, 2018). Desta forma, a observação quanti-qualitativa das células do *cumulus* e a homogeneidade

citoplasmática oocitária têm sido amplamente utilizadas na predição da qualidade dos oócitos.

O ETC, por sua vez, demonstrou potencial deletério ao causar perturbações que podem impactar na qualidade das interações oócito/células do *cumulus*. Em um estudo *in vivo*, BEI *et al.* (2020) relataram alterações estruturais em CCO caracterizado pelo destacamento do oócito da camada de células da granulosa adjacente, além da formação de inúmeros vacúolos nas células da granulosa de folículos primários em crescimento de camundongos estressados termicamente. HALE *et al.* (2017), em um estudo anterior, já havia relatado a formação de vacúolos nas células da granulosa e nos oócitos de porcas submetidas ao ETC. LI *et al.* (2016) demonstraram que células da granulosa de folículos antrais de camundongos fêmeas expostas ao ETC (43 °C por três horas durante 21 dias) apresentaram sinais apoptóticos graves. Ainda de acordo com LI *et al.* (2016), células da granulosa de camundongos colhidas de ovários expostos a alta temperatura (41°C por duas horas) tiveram redução da taxa de crescimento em cultivo, maior índice apoptótico e viabilidade celular reduzida.

Os oócitos e todos os seus componentes estruturais e organelares devem apresentar uma fisiologia adequada. Qualquer alteração que possa causar disfunção organelar ou danos estruturais em seus componentes, diminuirá a competência oocitária e terá efeitos prejudiciais na qualidade do embrião (WANG *et al.*, 2007). Entretanto, alterações ultraestruturais em CCO, mediados pelo ETC, já foram relatados. AHMED *et al.* (2017), por meio da microscopia eletrônica de transmissão, demonstraram que CCO de bovinos maturados *in vitro*, e estressados termicamente a 41 °C por 12 horas apresentaram colapso da organização citoesquelética, edema mitocondrial, alterações nos grânulos corticais e diminuição da expansão das células do *cumulus* com alterações indistinguíveis de apoptose. Da mesma forma, ULLAH *et al.* (2019) relataram alterações ultraestruturais em células esteroidogênicas lúteas de camundongos fêmeas expostas ao ETC (40,5 °C por duas horas durante sete dias consecutivos) caracterizadas pela expansão do núcleo celular, inchaço mitocondrial, cristas mitocondriais esparsas ou ausentes e apresentando vacuolização.

De acordo com SAKATANI *et al.* (2017), o ETC provoca o aumento da produção de ROS levando ao estresse oxidativo, que por sua vez, causam impactos diretos na função

celular ao promover danos no DNA e nas funções organelares. Nesse sentido, NABENISHI *et al.* (2011) demonstraram que oócitos bovinos estressados termicamente apresentaram níveis aumentados de ROS, decréscimo dos níveis de glutathione, alterações da maturação nuclear, aumento de corpos apoptóticos nas células do *cumulus*, com conseqüente diminuição da taxa de formação de blastocistos. PÃES *et al.* (2016) também relataram alterações na maturação nuclear ao observar menores taxas de oócitos bovinos em meiose II cultivados *in vitro* sob ETC. Vários autores relataram transcritos aumentados de mRNA de genes relacionados às vias apoptóticas como BAX e Caspase-3 em CCOs de camundongos expostos ao ETC (LUO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016).

Estudos foram conduzidos direcionados a investigações metodológicas e na elucidação de mecanismos celulares que possam desempenhar efeitos protetivos contra o ETC na reprodução. Nesse sentido, NABENISHI *et al.* (2011) verificaram que a suplementação do meio de cultivo com cisteína durante a maturação *in vitro*, à altas temperaturas (39,5 a 40,5 °C durante o cultivo), aumentou a capacidade antioxidante oocitária por estimular o incremento dos níveis de glutathione, promovendo a redução de ROS, decréscimo da apoptose, melhoria da maturação dos oócitos e da competência do desenvolvimento embrionário. KOYAMA *et al.* (2012) demonstraram que a suplementação do meio de cultura, durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*, com ácido fólico reduz a formação de ROS em embriões de camundongos estressado termicamente (39,5 °C). HALE *et al.* (2017) exploraram o mecanismo da autofagia como um potencial mecanismo celular pelo qual o ovário e o oócito podem mitigar os efeitos prejudiciais do ETC; tendo em vista que a autofagia é um regulador chave da homeostase celular, e foi positivamente regulada nos ovários e oócitos de suínos (HALE *et al.* 2017) e camundongos (ULLAH *et al.* 2019) estressados termicamente.

Assim como na autofagia, os genes relacionados à família HSPs, altamente conservados entre diferentes espécies, são ativados durante a resposta celular a vários estressores (LI *et al.*, 2016). Em situações adversas, os níveis de HSPs aumentam, auxiliando na síntese e maturação de novas proteínas (SOUZA-CÁCARES *et al.*, 2019). Vários autores correlacionam os níveis de expressão de HSPs com a capacidade de termotolerância animal (ROUT *et al.*, 2016; AL-ZGHOUE E EL-BAHR, 2019). Foi relatado que a superexpressão da proteína HSP70 confere citoproteção em células da granulosa

cultivadas sob ETC, pois são capazes de prevenir a morte celular bloqueando a indução da apoptose (SOUZA-CÁCARES *et al.*, 2019).

1.2.4 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A embriogênese em mamíferos inicia-se com a fusão dos pronúcleos masculino e feminino formando o zigoto (SOZEN *et al.*, 2019) e, em seguida, passa por sucessivas clivagens mitóticas (CHAZAUD E YAMANAKA 2016). Durante esse processo as organelas citoplasmáticas são redistribuídas, ocorre a reprogramação do DNA e a ativação do genoma embrionário (LU *et al.*, 2017). A ativação do genoma embrionário configura um dos principais acontecimentos durante o desenvolvimento pré-implantacional (ORON E IVANOVA, 2012). Este, ocorre a partir do estágio de duas células no camundongo (FRASER E LIN, 2016). De forma geral, em mamíferos, a ativação do genoma embrionário caracteriza a aquisição da autonomia transcricional, o desenvolvimento embrionário torna-se independente dos transcritos maternos e será conduzido pela transcrição do próprio embrião (ALONSO *et al.*, 2020).

A implantação embrionária em mamíferos é um mecanismo extremamente regulado, erros durante esse processo inicial pode resultar em perda da gestação (ADAMS E DEMAYO, 2015). Em camundongos, a implantação do embrião ocorre no quarto dia da gestação no estágio de blastocisto (CHA *et al.*, 2012). Após a implantação, a estrutura embrionária é remodelada no chamado ovo cilindro (SOZEN *et al.*, 2019). Durante esse processo, ocorre a formação do ectoderma extra-embrião e do endoderma visceral (CHISTODOULOU *et al.*, 2019). O ambiente uterino desempenha um papel crítico para o sucesso da implantação embrionária em roedores, que envolve transporte de nutrientes e secreção, pelas células epiteliais uterinas, de uma variedade de moléculas necessárias para apoiar o desenvolvimento embrionário, regulação da invasão trofoblástica e modulação da imunidade materna (ADAMS E DEMAYO, 2015). De acordo com OZAWA *et al.* (2002), a exposição materna ao ETC de camundongos nos momentos iniciais da gestação, durante o estágio de zigoto, inibe o desenvolvimento embrionário subsequente em cultura numa proporção superior aos zigotos submetidos ao ETC diretamente (fora do ambiente uterino). Isto indica que as possíveis mudanças no ambiente uterino, mediadas pelo ETC, tem forte influência na competência do

desenvolvimento embrionário de camundongos. Em adição, o impacto do ambiente uterino mediado pelo ETC pode afetar os processos de implantação embrionária.

Segundo PUSCHECK *et al.* (2015), variadas condições de estresse, incluindo o ETC, podem impactar negativamente no desenvolvimento embrionário levando ao abrandamento da embriogênese pré-implantação, proliferação de células-tronco e morfogênese. Além disso, já foi relatado que o ETC é capaz de causar redução do peso da placenta, o único canal de fornecimento de nutrientes e oxigênio ao feto, além de reduzir o fluxo sanguíneo e aumentar a resistência da placenta ao oxigênio, dificultando a difusão transplacentária do oxigênio causando hipóxia (AKBARINEJAD *et al.*, 2017). CHOI *et al.* (2015) demonstraram que embriões de camundongos expostos a uma temperatura relativamente alta (39 °C) se desenvolveram até o estágio do blastocisto sem alterações aparentes, mas, o blastocisto resultante, após a transferência para uma receptora, apresentou competência comprometida do desenvolvimento embrionário, exibindo menor evolução do trofotoderma e padrões de expressão gênica aberrantes. MONDAL *et al.* (2017) demonstraram que o ETC *in vitro* aumentou a síntese de prostaglandinas em células endometriais de ovinos. Segundo os autores, a secreção endometrial aumentada de prostaglandinas, em resposta ao ETC, diminui a sobrevivência embrionária alterando os sinais necessários para a manutenção da função do CL durante o início da gestação.

De acordo com WOLFENSON E ROTH (2019), os embriões em desenvolvimento inicial, antes da ativação do genoma embrionário, são particularmente suscetíveis ao ETC, por não possuírem plena capacidade de montar uma resposta celular efetiva para atenuar os efeitos deletérios do insulto térmico. Entretanto, segundo CHOI *et al.* (2015), embriões iniciais expostos ao ETC leve, a curto prazo, podem se desenvolver até blastocisto mesmo ocorrendo um segundo momento de ETC mais severo e longo. Porém, se a experiência inicial de ETC não ocorre, grande parte dos embriões morrem, indicando que os embriões de clivagem precoce podem adquirir termotolerância. Tal fato vai de encontro com a teoria da programação do desenvolvimento, em que, a exposição à variadas condições ambientais durante o desenvolvimento embrionário / fetal pode induzir adaptações direcionadas à sobrevivência muito antes de nascer. Essa

capacidade de alterar o fenótipo após o estabelecimento do genótipo é usualmente chamada de plasticidade do desenvolvimento (RHOADS, 2020).

1.3 ADAPTAÇÃO EPIGENÉTICA À TEMPERATURA

A maioria dos fatores ambientais e tóxicos, não tem a capacidade de alterar a sequência do DNA ou promover mutações genéticas diretamente (JIRTLE E SKINNER, 2007), apesar da capacidade de promoverem fenótipos anormais ou aumentar o risco de doenças (HANSON E SKINNER, 2016). Esses impactos ambientais sobre o fenótipo e o risco de doenças muitas vezes são mediados por mecanismos epigenéticos que podem afetar o fenótipo de descendentes ao longo de várias gerações (SKINNER, 2014). Os mecanismos epigenéticos envolvidos incluem metilação do DNA, modificações de histonas, RNAs não codificantes (ncRNAs) e estrutura da cromatina (SKINNER, 2014). As exposições ambientais que influenciam diretamente esses processos epigenéticos podem variar de nutrição, temperatura e estresse a um grande número de tóxicos ambientais (JIRTLE E SKINNER, 2007; SKINNER, 2014).

No *Glossary of terms for Thermal Physiology* (JAMES, 2001), o termo adaptação é definido como "*mudanças direcionadas à redução da tensão fisiológica produzida por componentes estressantes como um todo*". Isto pode ocorrer durante a vida de um organismo, ou ser o resultado da seleção genética em uma espécie ou subespécie. Segundo TZSCHENTKE E BASTA (2002), a adaptação à temperatura ocorre durante o desenvolvimento inicial, dentro de um período crítico em janelas de tempo curtas, por meio de alterações epigenéticas que modificam o padrão de expressão de genes relacionados a termotolerância. Dessa forma, a adaptação epigenética à temperatura em embriões pode ser induzida por alterações na temperatura ambiental durante o seu desenvolvimento, o que levaria a alterações nos mecanismos termorreguladores relacionados à adaptação.

Nessa perspectiva, LOH *et al.* (2004) demonstraram que no primeiro dia após a eclosão, patos incubados em temperaturas mais baixas que as normais produziram 56% mais calor, e apresentaram temperatura corporal interna mais alta quando submetidos ao frio (1 hora a 10 °C), em comparação aos controles não estressados pelo frio. Assim, pode-se sugerir que a alteração nos mecanismos termorreguladores relacionados à

adaptação ao frio pode ser modulada durante o desenvolvimento embrionário. Ainda nessa direção, WEYRICH *et al.* (2016) verificaram que machos de cobaias adultos expostos à alta temperatura durante a espermatogênese, promoveram respostas epigenéticas imediatas, e a modificação, hipometilação da região promotora que codifica genes relacionados à termotolerância como a HSP20, também foram encontradas nos testículos de seus descendentes. Isto sustenta a hipótese de que a experiência de estresse térmico durante o desenvolvimento pode levar a um ajuste no limiar inferior / superior da zona de conforto térmico do animal, e sugere que os efeitos epigenéticos podem ser herdados, contribuindo para um aumento da aptidão dos descendentes que terão claramente consequências evolutivas (TZSCHENTKE E NICHELMANN, 1999; HU *et al.*, 2017). Entretanto, as consequências relacionadas às alterações epigenéticas nem sempre são benéficas. Nesse sentido, WAN *et al.* (2020) verificaram que camundongos C57BL/6J expostos a alta temperatura escrotal (39°C), produziram descendentes com disfunção metabólica caracterizada pela intolerância à glicose e resistência à insulina. A hipermetilação associada à disfunção foi encontrada tanto no espermatozoide paterno quanto no fígado dos seus descendentes.

1.4 PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES

A superovulação (SOV) e produção *in vivo* de embriões têm sido uma das principais técnicas de reprodução utilizadas em bovinos, com a finalidade de aumentar a produtividade (VIEIRA, 2013). É uma ferramenta de grande importância, que possibilita incrementar o ganho genético, e melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos ao difundir o material genético de animais de alto rendimento (BARUSELLI *et al.*, 2019).

O objetivo da SOV na produção *in vivo* de embriões é obter o maior número de estruturas viáveis possíveis por meio da estimulação do crescimento de folículos antrais, e, conseqüentemente, maior número de óocitos aptos para a ovulação com qualidade para sustentar o desenvolvimento embrionário (BÓ E MAPLETOFT, 2020). Para tanto, são administradas doses exógenas de gonadotrofinas para promover, ao mesmo tempo, o crescimento de vários folículos, com características fisiológicas compatíveis com aqueles selecionados naturalmente para ovularem. Em seguida, após o tempo

necessário para o crescimento folicular, é administrado um indutor de ovulação, e posteriormente procede-se a inseminação artificial ou monta natural (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Em camundongos, o protocolo usualmente utilizado envolve a administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) para promover o crescimento folicular e, em seguida, após 46-48 h, administra-se a gonadotrofina coriônica humana (hCG) para induzir a ovulação (HASEGAWA *et al.*, 2016; KOLBE *et al.*, 2015). A SOV, além de contribuir para manutenção dos bancos de gametas e embriões de cepas de camundongos geneticamente modificados, tem papel fundamental na diminuição do uso de animais na experimentação (LUO *et al.*, 2011; TAKEO E NAKAGATA, 2015). Assim, com o aumento de oócitos e embriões de alta qualidade produzidos por animal submetidos a SOV, diminui a necessidade de um grande número de doadoras (KOLBE *et al.*, 2015).

De acordo com MA *et al.* (2019), o método comumente utilizado, não invasivo, para avaliar a qualidade e viabilidade embrionária em mamíferos baseia-se na inspeção visual da morfologia do embrião seguindo critérios predefinidos pela *International Embryo Technology Society* (IETS), como padrões de divisão celular, estágios de clivagem e características físicas (Figura 3).

Além dos critérios morfológicos, a expressão gênica e o índice de células apoptóticas também são utilizados como preditores de qualidade embrionária. Nesse sentido, para detecção de células apoptóticas, o teste de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) é amplamente utilizado e baseia-se na detecção da fragmentação do DNA de fita simples e dupla, ao incorporar nucleotídeos modificados (marcados com um corante fluorescente) diretamente no local fragmentado (LI E FLOYD, 2020). Após a incorporação dos nucleotídeos modificados, o sinal fluorescente é amplificado por reações enzimáticas secundárias e mensurados por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo (MARTINS *et al.*, 2007).



Figura 3. Classificação de embriões bovinos de acordo com a qualidade morfológica (adaptado de VIANA 2009).

A produção *in vivo* de embriões possui boa eficiência, no que tange a qualidade dos embriões produzidos (BARUSELLI *et al.*, 2019). Entretanto, alguns fatores podem contribuir para o declínio da sua eficácia, como por exemplo, a diminuição da fertilidade do animal associada ao ETC (VIEIRA, 2013; VARGAS *et al.*, 2018). Nesse sentido, o uso de técnicas *in vivo* resulta em menores números de recuperação de embriões, devido a uma

resposta superovulatória reduzida, menor taxa de fertilização, e redução da qualidade dos embriões durante os meses do ano em que a temperatura ambiente é maior (VARGAS *et al.*, 2018). Além dos impactos diretos do ETC sobre a capacidade reprodutiva em mamíferos, inclusive reduzindo a eficiências de biotécnicas reprodutivas, estudos preliminares indicam que o ETC durante a gestação pode impactar negativamente na capacidade reprodutiva da prole. Entretanto, pouco se sabe sobre a extensão desses efeitos, inclusive em relação a resposta superovulatória.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ETC durante o desenvolvimento embrionário/fetal em diferentes momentos do período gestacional na população F1 feminina de camundongos da linhagem C57BL/6.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do ETC durante diferentes fases da gestação na progênie feminina (geração F1) nos seguintes parâmetros:

- Taxa de gestação, prolificidade, peso ao nascimento;
- Desenvolvimento somático até dois meses de vida;
- População folicular ovariana aos dois meses de idade;
- Produção quanti-qualitativa de embriões coletados após superovulação, aos dois meses de idade.

3. METODOLOGIA

3.1. ÉTICA E LOCAL DO ESTUDO

O presente estudo obteve aprovação do Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo 003/2018 (Apêndice 1), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG.

A indução do ETC, SOV, coleta dos embriões e análises histológicas dos ovários foram conduzidas no laboratório de reprodução animal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG.

3.2. DESENHO EXPERIMENTAL

Para avaliar o efeito do ETC durante a gestação, 40 camundongos fêmeas, com idade entre cinco e seis semanas, foram acasaladas com 40 machos da mesma idade numa proporção de 1:1. A presença do plugue vaginal (dia 1) foi utilizada como indicativo da ocorrência do acasalamento. As fêmeas acasaladas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais: i) ETC durante a primeira metade da gestação (gestação inicial, EGI, dias 1-10), ii) ETC durante a segunda metade da gestação (gestação final, EGF, do dia 11 ao parto), iii) ETC durante o período total da gestação (gestação total, EGT, do dia 1 ao parto) e iv) gestação na ausência de ETC, grupo controle (CONT). Os camundongos do grupo CONT foram mantidos em condições normotérmicas (25 °C e 45% de umidade relativa) durante todo o experimento. Após o parto, o peso ao nascimento da população F1 de cada tratamento foi registrado e o desenvolvimento somático da progênie foi monitorado até os dois meses de idade. Aos dois meses, as fêmeas foram superovuladas e submetidas ao acasalamento com machos do grupo controle, num total de quatro combinações experimentais: Grupo 1 (♀ EGI × ♂ CONT); Grupo 2 (♀ EGF × ♂ CONT); 3 (♀ EGT × ♂ CONT); Grupo 4 (♀ CONT × ♂ CONT). Às 72 horas após a confirmação do acasalamento, foi realizada a coleta de embriões. Os embriões recuperados foram classificados quanto à qualidade morfológica e estágio de desenvolvimento. Os ovários de todas as fêmeas superovuladas foram coletados após a eutanásia e foram submetidos à análise histológica para determinação da população folicular ovariana.

3.3 INDUÇÃO DO ESTRESSE TÉRMICO

A indução do ETC foi realizada conforme a metodologia descrita por AROYO *et al.* (2007), diariamente por 2 horas, durante todo o período experimental. De acordo com os autores, a exposição de camundongos a uma temperatura de 40 °C e UR de 65% por 1,5 – 2 horas foi suficiente para induzir o ETC (fisiologicamente relevante). Em resumo, uma gaiola padrão com 2 cm de serragem contendo os camundongos foi colocada dentro de uma câmara ambiental (70 cm x 80 cm x 50 cm), com acrílico transparente de 4 mm de espessura na parte superior e duas portas para acesso frontal (Figura 4). A câmara foi aquecida por duas lâmpadas vermelhas de *siccatherm*, de modo que os camundongos não foram expostos ao calor radiativo. Um recipiente com água foi mantido no interior da câmara para proporcionar a umidade relativa requerida. A temperatura e a umidade na câmara ambiental (41 °C, 65% UR) foram mensuradas por dois termômetros UNI-T UT330B mantidos no interior da câmara. Durante todo o período os animais tinham acesso a alimentos e água.

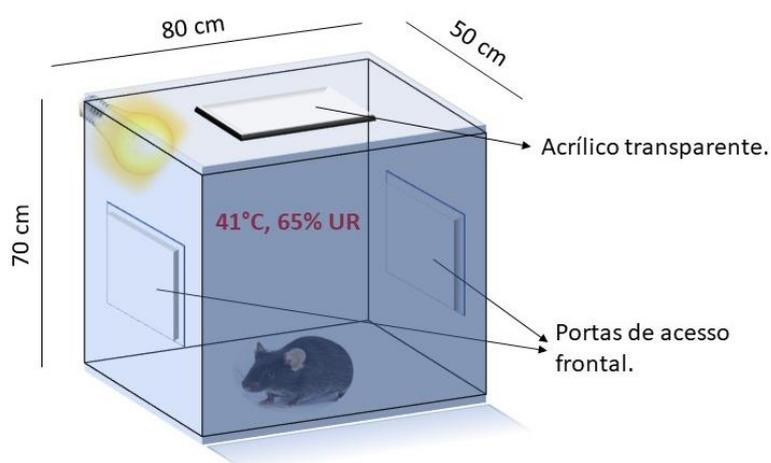


Figura 4. Esquema ilustrativo da câmara ambiental utilizada para indução do ETC em camundongos C57BL/6 fêmeas, em diferentes momentos do período gestacional de acordo com o grupo experimental.

3.4 DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO DA PROGÊNIE

Após o parto, o número de crias nascidas vivas por fêmea foi registrado. A progênie total (machos e fêmeas) foi monitorada quanto ao desenvolvimento somático

da primeira à oitava semana de idade. Após a terceira semana de idade, quando foi possível distinguir com clareza fêmeas de machos, a progênie feminina foi paralelamente avaliada, no período da terceira à oitava semana de idade. Em todos os momentos, foi utilizada uma balança analítica (Gehaka® BG2000) para aferição do peso corporal (BATISTA *et al.*, 2010).

3.5 SUPEROVULAÇÃO E COLETA DE EMBRIÕES

As fêmeas foram superovuladas pela administração intraperitoneal de 5 UI de eCG (Folligon®, Intervet, São Paulo, SP, Brasil), seguida de uma injeção de 5 UI de hCG (Chorulon®, Intervet, São Paulo, SP, Brasil) após 48 horas, ambas diluídas em 0,1 mL de solução salina estéril (BATISTA *et al.*, 2010). Após a última aplicação, as fêmeas foram acasaladas com machos durante a noite. 72 horas após a cópula, as fêmeas foram eutanasiadas por deslocamento cervical, e, em seguida, submetidas à retirada do trato reprodutivo. Os cornos uterinos foram perfundidos com 0,5 mL de tampão fosfato-salino (PBS) acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) para recuperação das estruturas. O meio recuperado foi colocado em placas de Petri quadradas e a busca e seleção dos embriões realizada sob estereomicroscópio. As estruturas foram classificadas de acordo com o manual da *International Embryo Technology Society* (STRINGFELLOW E GIVENS, 2010).

3.6 HISTOLOGIA OVARIANA

Os ovários foram fixados em paraformaldeído, desidratado na solução crescente de etanol (50-100%), diafanizados em xilol, incorporados em parafina e cortado em seções de 5 µm. As lâminas foram montadas e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Após a montagem e secagem das lâminas, as seções foram avaliadas em microscópio Zeiss Axioskop® com uma objetiva de 40 X. A estimativa da população folicular por ovário foi realizada conforme a metodologia descrita por CAMPOS-JUNIOR *et al.* (2012). Em resumo, cada terceira seção foi analisada, a contagem e classificação do folículo foi realizada de acordo com o seu estado funcional. Apenas foram considerados folículos aqueles que apresentaram o núcleo do oócito visível. Os folículos foram classificados de acordo com a morfologia e o número de camadas de células da granulosa em: i) folículos primordiais, onde o oócito era circundado por uma única camada de células achatadas;

ii) folículo primário, presença de camada única de células cuboides ao redor do oócito; iii) folículo secundário, presença de uma segunda camada de células cuboides ao redor do oócito e iv) folículo terciário (antral), com presença de antro folicular. A quantificação total de cada grupo folicular por ovário foi estimada segundo GOUGEON E CHAINY (1987) utilizando o fator de correção a seguir:

$$PF = \frac{NF \times NS \times EC}{NSO \times DNOoc}$$

Onde: PF = População folicular; NF = Número de folículos, que será estimado, contados no ovário (primordial, primário, secundário e terciário); NS = Número de secções; EC = Espessura do corte histológico; NSO = Número de secções observadas; DNOoc = Diâmetro médio do núcleo do oócito do folículo que será estimado (primordial, primário, secundário e terciário).

O cálculo da taxa de recrutamento folicular foi realizado de acordo como descrito por CAMPOS-JUNIOR *et al.* (2012), utilizando a seguinte fórmula:

$$TAF = \frac{FPa + FS + FT}{TF} \times 100$$

Onde: TAF = Taxa de ativação folicular; FPa = Folículos primários; FS = Folículos secundários; FT = Folículos terciários (antrais); TF = Total de folículos.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de prenhez foram analisadas pelo teste de qui-quadrado. Os dados de crias nascidas por fêmea, peso ao nascimento, desenvolvimento somático, população folicular e ativação folicular foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, antes de serem submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste Tukey HSD. Os parâmetros da superovulação ovariana: estruturas recuperadas por fêmea estruturas veíveis por fêmea, número de estruturas não fecundadas e estruturas degeneradas foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado como diferença entre os grupos $P < 0,05$. Valores de P acima de 0,05 até 0,06 foram considerados como tendência.

4. RESULTADOS

4.1 TAXA DE GESTAÇÃO, PROLIFICIDADE E PESO AO NASCIMENTO

Dos 40 camundongos C57BL/6 fêmeas com plugue vaginal indicativo de cópula, 24 camundongos foram confirmados como gestantes, resultando no nascimento de 163 crias (76 fêmeas e 87 machos). A taxa de gestação, média de crias nascidas e peso ao nascimento estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - Taxa de prenhez, média de crias nascidas e peso ao nascimento da população F1 de camundongos C57BL/6 fêmeas submetidas ao ETC em diferentes momentos do período gestacional (Média \pm EP).

Grupos	Taxa de gestação (%)	Crias nascidas	Peso ao nascimento (g)
CONT*	80 (8/10) ^a	7,0 \pm 1,0 ^a	2,2 \pm 0,1 ^a
EGL**	40 (4/10) ^a	6,0 \pm 1,5 ^a	1,1 \pm 0,2 ^c
EGF***	60 (6/10) ^a	6,5 \pm 1,5 ^a	1,8 \pm 0,1 ^b
EGT****	60 (6/10) ^a	5,1 \pm 1,5 ^a	1,2 \pm 0,1 ^c

*CONT: controle; **EGL: estresse térmico gestação inicial; ***EGF: estresse térmico gestação final; ****EGT: estresse térmico gestação total. Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos de uma mesma coluna ($P < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças na taxa de gestação e média de crias nascidas entre os grupos. Entretanto, o ETC, independentemente do momento da indução, afetou o desenvolvimento intrauterino, peso ao nascimento, das proles nos grupos submetidos ao ETC em relação ao grupo CONT ($P < 0,0001$). A comparação entre os grupos submetidos ao ETC demonstrou que o impacto no desenvolvimento intrauterino foi mais proeminente durante a primeira metade da gestação, resultando na diferença ($P < 0,05$) entre os grupos EGL e EGT em comparação com o grupo EGF.

4.2 DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO

De acordo com os resultados da análise do desenvolvimento somático da progênie total (machos e fêmeas), o ETC, experimentado durante o período gestacional, impactou na dinâmica de crescimento da prole (Tabela 2). Na primeira semana do nascimento, os grupos de EGL e EGT apresentaram peso corporal abaixo dos grupos CONT e EGF ($P =$

0,0001). Com duas semanas de idade, o peso da prole dos grupos EGI e EGT foi inferior ao do grupo CONT ($P < 0,0001$), o grupo EGT foi mais proeminentemente afetado, resultando na diferença ($P < 0,05$) na comparação com os grupos EGI e EGF. Na terceira semana após o nascimento, o peso do grupo EGI e EGT foi menor em relação ao CONT ($P = 0,006$ e $P < 0,0001$) respectivamente; ainda nessa análise, o grupo EGT apresentou peso inferior ao grupo EGF ($P = 0,011$). Na quarta semana de idade, o peso dos grupos EGI e EGT foi inferior ao CONT ($P = 0,01$ e $P = 0,0006$), respectivamente. Na quinta e sexta semana não foram encontradas diferenças de peso entre os grupos. Na sétima semana, o grupo EGT foi mais leve do que o CONT ($P < 0,019$) e na oitava semana todos os grupos experimentais apresentaram peso corporal similar ao CONT.

Tabela 2 - Análise do desenvolvimento somático, evolução do peso (em gramas), da população F1 (machos e fêmeas) de camundongos C57BL/6 submetidos ao ETC durante diferentes momentos do período gestacional (Média \pm EP).

Idade (semanas)	CONT *	EGI **	EGF ***	EGT ****
1	6,2 \pm 0,9 ^a	5,2 \pm 0,5 ^b	6,4 \pm 0,9 ^a	5,5 \pm 0,8 ^b
2	8,2 \pm 0,7 ^a	7,5 \pm 0,3 ^b	7,7 \pm 0,7 ^{ab}	7,1 \pm 0,9 ^c
3	11,6 \pm 1,9 ^a	10,5 \pm 1,1 ^b	11,3 \pm 1,7 ^a	10,0 \pm 1,4 ^b
4	15,3 \pm 2,6 ^a	14,0 \pm 1,9 ^b	15,2 \pm 1,3 ^a	13,6 \pm 1,5 ^b
5	18,0 \pm 2,8 ^a	16,5 \pm 2,5 ^a	17,1 \pm 2,6 ^a	16,8 \pm 3,1 ^a
6	19,7 \pm 2,5 ^a	19,0 \pm 3,3 ^a	19,1 \pm 2,9 ^a	18,9 \pm 2,3 ^a
7	21,5 \pm 2,4 ^a	20,6 \pm 3,4 ^{ab}	20,5 \pm 2,3 ^{ab}	19,6 \pm 3,3 ^b
8	23,2 \pm 2,8 ^a	22,6 \pm 3,2 ^a	23,0 \pm 2,4 ^a	22,8 \pm 3,5 ^a

*CONT: controle (n = 52); **EGI: estresse térmico gestação inicial (n = 45); ***EGF: estresse térmico gestação final (n = 24); ****EGT: estresse térmico gestação total (n = 42). Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos de uma mesma linha ($P < 0,05$).

A análise do desenvolvimento somático da progênie feminina a partir da terceira semana de idade, quando foi possível realizar a sexagem com clareza, está representada na Tabela 3. Na terceira semana de idade, a progênie feminina do grupo EGT apresentou peso inferior em relação ao grupo CONT e EGF ($P < 0,0001$) e o grupo EGI foi mais leve em relação ao grupo EGF ($P = 0,0483$). Na quarta semana, o peso do grupo EGT foi menor em relação aos grupos CONT e EGF ($P < 0,05$). Na quinta semana, o grupo EGI foi o único a divergir apresentando menor peso em relação ao grupo CONT ($P < 0,05$). Na sexta, sétima e oitava semanas não foram encontradas diferenças de peso entre os grupos.

Tabela 3 - Análise do desenvolvimento somático, evolução do peso (em gramas), da população F1 (fêmeas) de camundongos C57BL/6 submetidos ao ETC durante diferentes momentos do período gestacional (Média ± EP).

Idade (semanas)	CONT*	EGI**	EGF***	EGT****
3	10,2 ± 1,7 ^{ab}	9,2 ± 0,7 ^{bc}	10,4 ± 1,2 ^a	8,2 ± 1,2 ^c
4	14,0 ± 1,8 ^a	13,2 ± 1,4 ^{ab}	14,4 ± 1,7 ^a	12,3 ± 1,3 ^b
5	16,7 ± 1,1 ^a	15,2 ± 1,8 ^b	15,3 ± 1,8 ^a	15,5 ± 1,7 ^a
6	17,4 ± 0,9 ^a	17,3 ± 1,9 ^a	17,3 ± 1,3 ^a	16,6 ± 1,7 ^a
7	19,2 ± 1,4 ^a	18,3 ± 1,9 ^a	18,3 ± 1,8 ^a	17,8 ± 1,8 ^a
8	20,9 ± 2,2 ^a	20,3 ± 2,3 ^a	20,2 ± 2,2 ^a	19,9 ± 2,8 ^a

*CONT: controle (n = 22); **EGI: estresse térmico gestação inicial (n = 22); ***EGF: estresse térmico gestação final (n = 12); ****EGT: estresse térmico gestação total (n = 20). Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos de uma mesma linha (P < 0,05).

4.3 POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA

As imagens representativas das diferentes fases foliculares e o resultado da quantificação da população folicular ovariana estão representados na Figura 5. Não foram observadas diferenças na quantificação folicular dos grupos experimentais em relação ao CONT. Entretanto, na comparação entre os grupos expostos ao ETC observou-se que o grupo EGI apresentou redução da população de folículos primordiais quando comparado aos grupos EGF e EGT (P < 0,05).

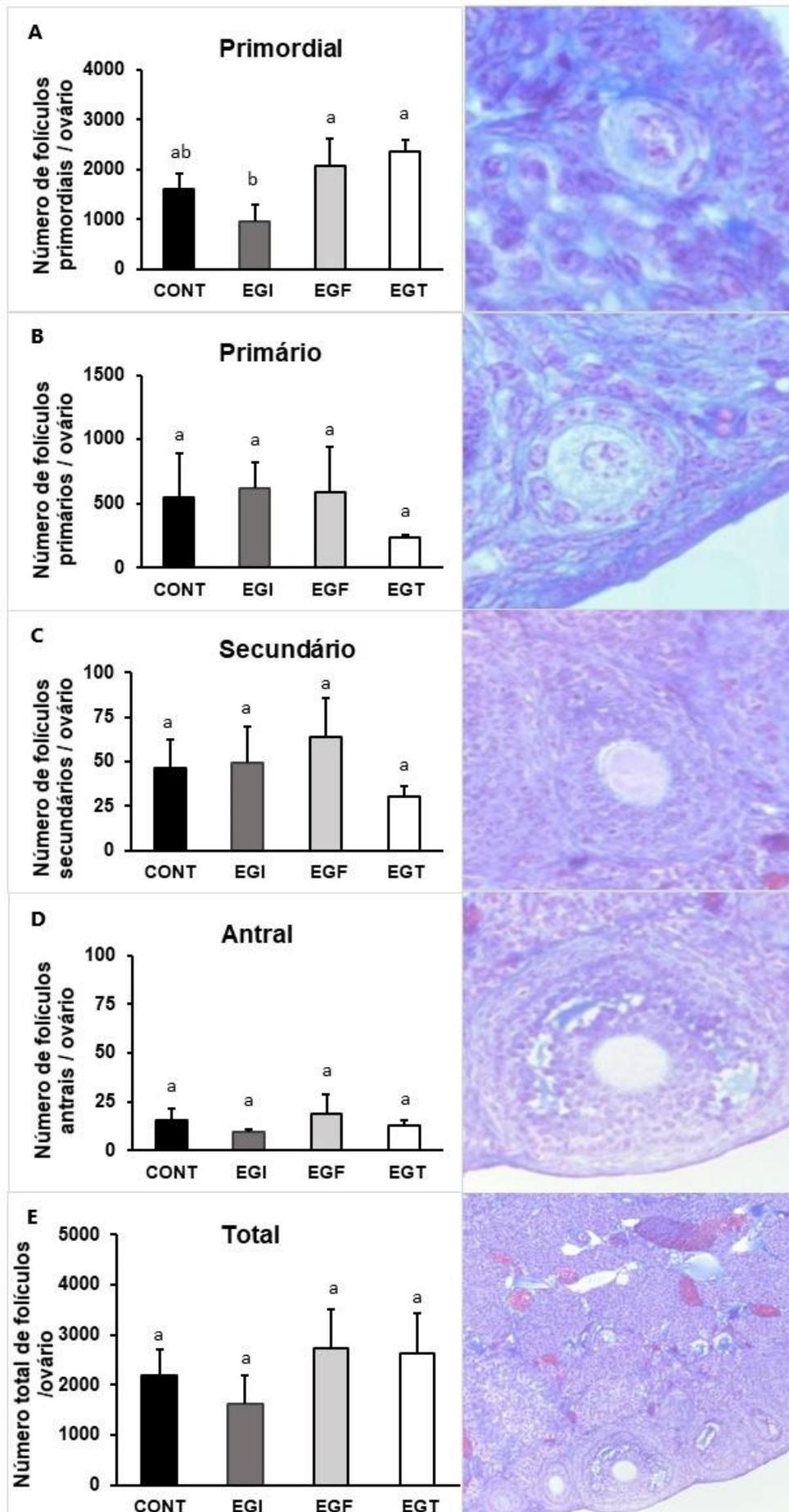


Figura 5. Quantificação da população folicular ovariana da progênie feminina (população F1) de camundongos C57BL/6 expostas ao ETC durante o desenvolvimento embrionário em diferentes momentos do período gestacional (n = 5 por grupo). (A) análise quantitativa da população de folículos primordiais; (B) análise quantitativa de folículos primários; (C) análise quantitativa da população de folículos secundários; (D) análise quantitativa de folículos anuais; (E) análise quantitativa da população total de folículos. CONT: controle; EGI: estresse térmico gestação inicial; EGF: estresse térmico gestação final; EGT: estresse térmico gestação total. Os dados são apresentados em Média ± EP, letras distintas indicam diferença estatística (P < 0,05).

A análise da taxa de ativação folicular está representada na Figura 6. De acordo com o resultado não foi evidenciado diferença no perfil de ativação folicular entre os grupos de ETC em relação ao CONT. Entretanto, o grupo EGT apresentou redução da ativação folicular quando comparado ao grupo EGI (P = 0.0021).

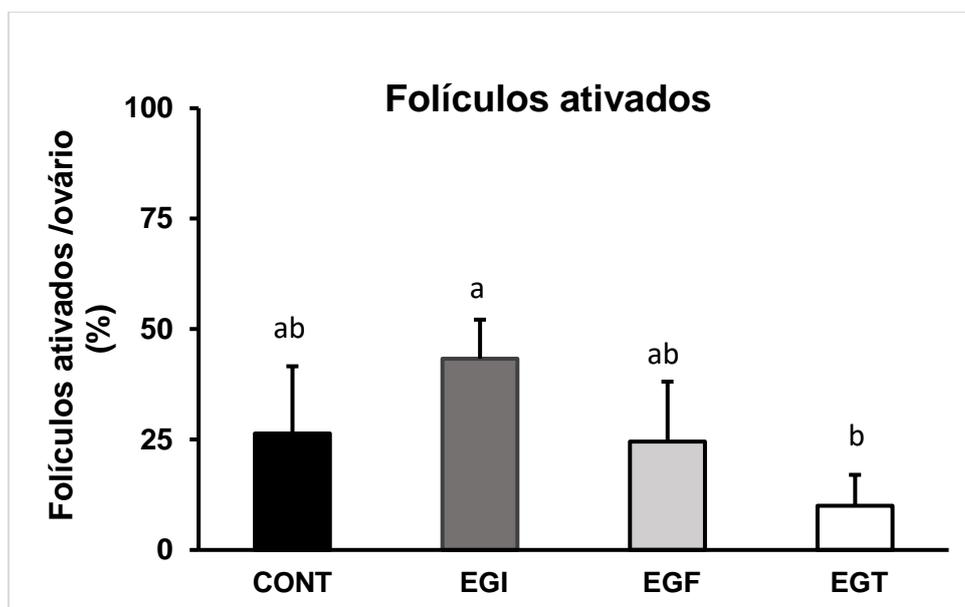


Figura 6. Taxa de folículos ativados contabilizados a partir das análises histológicas da população folicular ovariana, da progênie feminina (população F1) de camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas expostas ao ETC durante o desenvolvimento embrionário e submetidas ao protocolo de superovulação (n = 5 por grupo). CONT: controle; EGI: estresse térmico gestação inicial; EGF: estresse térmico gestação final; EGT: estresse térmico gestação total. Os dados são apresentados em Média ± EP, letras distintas indicam diferença estatística (P < 0,05).

4.4 RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA

O total de estruturas recuperadas e viabilidade embrionária estão representados na Tabela 4. O número de estruturas viáveis do grupo EGT foi inferior ao controle (P = 0,03). Não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao controle nos demais parâmetros avaliados, entretanto, uma tendência de redução do número de estruturas totais foi observada no grupo EGT (P = 0,058).

Tabela 4 – Produção de embriões da população F1, após a superovulação, por fêmea de camundongos C57BL/6 submetidas ao ETC durante o desenvolvimento embrionário em diferentes momentos do período gestacional (Média ± EP)

Grupos	Nº de fêmeas superovuladas	Total de estruturas	Estruturas viáveis	Estruturas não-fecundadas	Estruturas degeneradas
CONT*	10	11,8 ± 5,0 ^a	9,5 ± 4,6 ^a	1,6 ± 2,0 ^a	0,7 ± 0,9 ^a
EGI**	10	7,6 ± 2,4 ^a	5,8 ± 2,4 ^{ab}	0,9 ± 1,0 ^a	0,7 ± 0,9 ^a
EGF***	10	10,8 ± 5,5 ^a	8,1 ± 4,3 ^{ab}	1,0 ± 1,0 ^a	2,3 ± 1,6 ^a
EGT****	10	6,9 ± 3,1 ^a	4,3 ± 2,7 ^b	0,7 ± 0,9 ^a	1,9 ± 1,9 ^a

*CONT: controle; **EGI: estresse térmico gestação inicial; ***EGF: estresse térmico gestação final; ****EGT: estresse térmico gestação total. Letras distintas indicam diferença estatística em uma mesma coluna (P < 0,05).

5. DISCUSSÃO

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram submetidas ao ETC em diferentes momentos da gestação. Independente do momento da indução, o ETC foi capaz de comprometer o desenvolvimento intrauterino (peso ao nascimento) da prole, quando comparados ao grupo controle. Corroborando com os relatos de MAYVANEH *et al.* (2020), que demonstraram que a exposição de camundongos a temperaturas subótimas, incluindo 40°C e 42°C, 1 hora por dia durante a segunda e terceira parte da gestação promoveram não só a redução do peso fetal, mas também do peso e diâmetro da placenta. Anteriormente, CHOI *et al.* (2015) demonstraram que a exposição prolongada de embriões de camundongos a temperaturas elevadas, afetou o desenvolvimento embrionário durante a gestação ao atenuar a evolução do trofotoderma. O trofotoderma é um tecido extraembrionário que se apresenta subdividido em trofotoderma polar e mural. Durante o desenvolvimento embrionário, na implantação, o trofotoderma polar, multipotente, dará origem ao ectoderma extraembrionário que contribuirá para formação da placenta (CHRISTODOULOU *et al.*, 2019). Segundo AKBARINEJAD *et al.* (2017), a redução da maturação e crescimento placentário, impacta negativamente no fluxo sanguíneo comprometendo as trocas gasosas e o transporte de nutrientes para o feto. Portanto, a interrupção da função placentária, em resposta ao ETC, pode causar desnutrição fetal.

De acordo com os resultados, os grupos EGI e EGT apresentaram os menores índices de desenvolvimento intrauterino (peso ao nascimento) quando comparados ao CONT, indicando que o ETC na primeira metade da gestação representa um período crítico para o desenvolvimento embrionário de camundongos. É consenso que embriões em estágios iniciais são mais susceptíveis aos efeitos negativos induzidos pelo ETC; essa vulnerabilidade é relatada em uma ampla gama de espécies incluindo o camundongo (OZAWA *et al.*, 2002). De fato, altas temperaturas podem causar ruptura de microfilamentos e microtúbulos, inchaço mitocondrial, desorganização organelar, elevação de ROS e aumento do número de células apoptóticas, comprometendo a competência do desenvolvimento embrionário (SAKATANI, 2017). Além disso, é amplamente descrito na literatura que o comprometimento do crescimento embrionário no útero contribui para o desenvolvimento de comorbidades na vida adulta

que podem levar à subfertilidade (CHEONG *et al.*, 2016; LIMESAND *et al.*, 2018; VERSTRAETEN *et al.*, 2019; MAYVANEH *et al.*, 2020).

No presente estudo, o tamanho da ninhada não foi afetado pelo ETC. Entretanto, os grupos EGI e EGT, tanto na avaliação global (machos e fêmeas) quanto na avaliação individual das fêmeas, apresentaram alterações do desenvolvimento somático durante o período avaliado. Esse resultado corrobora com os relatos de HAMID *et al.* (2012) que verificaram que ratos expostos ao ETC durante o período inicial da gestação e durante toda gestação apresentaram redução do desenvolvimento somático. O mesmo não ocorreu com o grupo exposto ao ETC durante a segunda metade da gestação, apesar da redução do desenvolvimento intrauterino, indicando que o efeito adverso do ETC sobre o crescimento da prole é mais proeminente quando ocorre no início da gestação.

Além da possível repercussão do subdesenvolvimento intrauterino mais fortemente pronunciado nos grupos EGI e EGT, o menor peso da prole dos referidos grupos durante a fase lactacional pode estar relacionado, em parte, pela redução da quantidade e qualidade do leite produzido. De acordo com a literatura, a exposição materna a uma grande variedade de agentes estressores inclusive o ETC, durante o período não lactante, deprime a proliferação das células da glândula mamária responsáveis pela produção do leite, além de alterar o balanço energético do animal que terá, inevitavelmente, consequências na eficiência produtiva (SKIBIEL *et al.*, 2018; DADO-SENN *et al.*, 2019). Isto é condizente com os relatos de BERGHÄNEL *et al.* (2017), dados meta-analisados, em que, quando a prole de um mesmo grupo de tratamento foi amamentada por mães de diferentes grupos, aqueles amamentados por mães que sofreram estresse durante a gestação cresceram menos em comparação com os amamentados por mães do grupo não estressado. Em reforço a isso, observa-se que após o período lactacional (21 dias) ocorre, gradativamente, a recuperação do peso dos animais dos diferentes grupos, e no final de oito semanas, na análise total (machos e fêmeas), e a partir da sexta semana, na análise que considera apenas as fêmeas, o peso dos animais dos grupos EGI e EGT não apresentou diferença entre os tratamentos e o CONT.

Na análise da população folicular ovariana o grupo EGI apresentou redução da população de folículos primordiais quando comparado com os grupos EGF e EGT,

demonstrando que o efeito do ETC é dependente do momento em que ocorre a exposição, tendo em vista a assimetria dos acontecimentos durante o desenvolvimento embrionário. Esse resultado corrobora com os relatos de SUCCU *et al.* (2020) que verificaram que bezerras expostas ao ETC pré-natal durante o primeiro trimestre da gestação, apresentaram menores concentrações de hormônio anti-mulleriano. Este hormônio é secretado principalmente pelas células da granulosa de folículos iniciais em desenvolvimento e é frequentemente utilizado como indicador do tamanho da reserva folicular ovariana. Isto demonstra que a exposição materna ao ETC durante a fase inicial da gestação pode influenciar negativamente o tamanho da reserva folicular ovariana da prole, tanto em bovinos como em camundongos.

O aumento do número de folículos primordiais nos grupos EGF e EGT quando comparado com o grupo EGI parece ter um denominador comum. De acordo com PFEIFFER *et al.* (2018) a exclusão da proteína HSP90 durante o desenvolvimento embrionário de peixes-zebra afeta negativamente a migração e retidão das células germinativas primordiais em direção às gônadas. O mesmo ocorreu com camundongos expostos a geldanamicina, um potente inibidor funcional da proteína HSP90, resultando em diminuição da população de células germinativas primordiais nas gônadas (LEJONG *et al.*, 2018). Esses resultados apontam para um papel importante da proteína HSP90 no estabelecimento da reserva folicular ovariana. Além disso, a HSP90 é fundamental para a eficiência da progressão do ciclo celular (PFEIFFER *et al.*, 2018). É sabido que as proteínas do choque térmico, altamente conservadas entre diferentes espécies, incluindo a HSP90 são expressas em resposta a vários agentes estressores, incluindo o ETC (AL-ZGHOUE E EL-BAHR, 2019). Desta forma, é possível que o ETC experimentado durante a gestação tenha promovido um incremento na expressão de HSP90, que pode ter contribuído para o aumento da taxa migratória e ou aumento da proliferação das células germinativas primordiais nos grupos EGF e EGT.

Em condições naturais, o início da atividade migratória das células germinativas primordiais ocorre por volta do dia 8,5 e passam por sucessivas divisões mitóticas entre os dias 10,5 e 14,5 após a fertilização em roedores (MASSIMO DE FELICI, 2016; WATANABE *et al.*, 2020). É importante salientar que em condições de ETC os padrões temporais dos acontecimentos durante o desenvolvimento embrionário podem mudar.

De acordo com AROYO *et al.* (2007), a hipertermia materna causa atraso no tempo de clivagem embrionária levando a redução da taxa de desenvolvimento total. Além disso, a exposição a temperaturas elevadas durante o início da gestação pode retardar a implantação embrionária em ratos (HAMID *et al.*, 2012).

Sabe-se que a população de folículos primordiais sofre uma redução importante no período pós-parto em camundongos (FAIRE *et al.*, 2015). Durante a transição do ambiente uterino para o neonatal ocorre uma mudança brusca da interface de fornecimento nutricional, de placentário para a lactação. Essa transição resulta em um estresse nutricional devido a menor disponibilidade de nutrientes, que pode ter um aspecto importante na perda de células germinativas primordiais (SUN *et al.*, 2018).

Foi proposto que a autofagia funciona como um importante mecanismo responsável pela manutenção da sobrevivência das células germinativas primordiais no período pós-parto em camundongos (RODRIGUES *et al.*, 2009). Logo, tendo em vista que a autofagia representa uma resposta adaptativa ao estresse nutricional do recém-nascido à privação de nutrientes da placenta, e é positivamente regulada em condições de ETC (HALE *et al.*, 2017), é possível supor que os grupos EGF e EGT com a autofagia ativada, mediada pelo ETC nos momentos finais da gestação, tenham sofrido menor impacto da mudança de interface nutricional no pós-parto. Adicionalmente, não se descarta a possibilidade de que os grupos EGF e EGT tenham sofrido adaptações epigenéticas para suportar um ambiente de fome, pois, a desnutrição fetal também é uma das consequências do ETC. Nessa perspectiva, uma possível adaptação direcionada à expressão positiva de genes relacionados a autofagia pode ter contribuído para o maior número de folículos primordiais nos grupos EGF e EGT. Segundo WATANABE *et al.* (2020), a regulação positiva da autofagia em camundongos neonatais aumenta o *pool* de folículos primordiais e confere melhora da fertilidade ao alongar a vida reprodutiva do animal. No presente estudo, o grupo EGT apresentou aumento do número de folículos primordiais e redução da ativação folicular em relação ao grupo EGI. Essa combinação pode ter repercussão positiva na expectativa da fertilidade ao longo da vida reprodutiva do animal.

Tanto os genes relacionados à expressão das proteínas do choque térmico, quanto os relacionados à ativação da autofagia, altamente conservados entre diferentes

espécies, estão relacionados a mecanismos de manutenção da homeostase celular e podem sofrer alterações epigenéticas em resposta a estímulos ambientais. De acordo com RHOADS (2020), um embrião ou feto em desenvolvimento pode preparar adaptações para sobreviver a um ambiente pós-natal potencialmente hostil muito antes de nascer. Vale ressaltar que mudanças no epigenoma podem ocorrer em vários momentos durante o desenvolvimento embrionário, principalmente nas situações em que o DNA se encontra desmetilado (FRASER E LIN, 2016). Nesse contexto, a programação epigenética das células germinativas primordiais ocorre durante o desenvolvimento embrionário, no momento do processo migratório, quando são submetidas à desmetilação do DNA e poderão, futuramente, transmitir as informações epigenéticas adquiridas para as gerações subsequentes (HUBER *et al.*, 2020).

Ao comparar os grupos EGI e EGT é notável um comportamento oposto em relação à ativação folicular. O grupo EGI apresentou redução do número de folículos primordiais e aumento da ativação folicular, enquanto o grupo EGT apresentou maior número de folículos primordiais e redução da ativação folicular. Os motivos que levaram a esse resultado não estão claros, mas podemos considerar a seguinte hipótese: o destino dos folículos em repouso pode ser explicado pelas diferenças do microambiente local, onde a aglomeração folicular em repouso atua como um fator que influencia a taxa de recrutamento folicular. O aglomerado de folículos em repouso seria a fonte de sinais inibitórios locais que reduzem a probabilidade de ativação de folículos adjacentes (GAYTAN *et al.*, 2015). Logo, condições que envolvam diminuição do volume ovariano, ou aumento da reserva de folículos primordiais, resultaria em maior aglomeração folicular e, conseqüentemente, menor taxa de recrutamento de folículos em repouso. Por outro lado, condições que envolvam aumento do volume ovariano ou redução da reserva de folículos primordiais, diminuiriam a aglomeração folicular levando a uma maior taxa de ativação (GAYTAN *et al.*, 2015).

De acordo com a literatura, a exposição materna à altas temperaturas ambientais durante a gestação, tem sido amplamente associada à redução do peso da prole ao nascer (LIMESAND *et al.*, 2018; COLOMA-GARCÍA *et al.*, 2020; MAYVANEH *et al.*, 2020). Isto também pode estar associado ao subdesenvolvimento de órgãos. Nessa perspectiva, é possível que o grupo EGT tenha sofrido maior impacto no processo de

organogênese, tendo em vista o seu perfil de exposição ao ETC, abrangendo tanto o início da organogênese, durante a primeira metade da gestação, quanto a finalização durante a segunda metade da gestação, que é caracterizada pelo crescimento e maturação dos órgãos em mamíferos (SKIBIEL *et al.*, 2018b). Sendo assim, pode-se especular que uma possível redução do tamanho do ovário no grupo EGT, somado ao aumento de folículos primordiais, resultaria em uma combinação perfeita para sustentar a hipótese da aglomeração de folículos atuando como fator inibitório da ativação folicular.

Não se pode considerar, entretanto, que uma maior ou menor taxa de ativação folicular represente eficiência ovariana. De acordo com AKBARINEJAD *et al.* (2017), qualquer fator que possa aluir a formação de folículos primordiais, que agilize ou retarde a sua transição para folículos primários, tem potencial de causar o esgotamento da reserva folicular ou inatividade ovariana, impactando adversamente na capacidade reprodutiva de um indivíduo. Geralmente animais com maior taxa de ativação folicular apresentam, em contrapartida, maiores índices de perda folicular por apoptose.

De acordo com a análise da produção embrionária em F1, após a superovulação, o número de estruturas viáveis foi reduzido no grupo EGT. Isto indica que a frequência em que ocorre o ETC durante a gestação pode determinar os efeitos na prole. É bem relatado que o ETC durante a gestação impacta na saúde global dos descendentes, muitas vezes levando a uma redução da capacidade reprodutiva, que, na fêmea, pode estar relacionada com o declínio da qualidade oocitária, que por sua vez, compromete o desenvolvimento embrionário subsequente à fertilização (HUBE *et al.*, 2020).

BARRA *et al.* (2014) relataram que o estresse térmico induzido pela exposição à baixa temperatura durante o pré-natal, 4 °C por três horas ao dia durante toda a gestação, impactou na população folicular ovariana da prole de ratas Sprague-Dawley ao reduzir o número de folículos primários e secundários. Além disso, reduziu a capacidade de resposta ovariana ao FSH, resultando no declínio do desenvolvimento de folículos secundários sob estimulação de gonadotrofina. Entretanto, no presente estudo, possivelmente devido as diferenças metodológicas utilizadas para a indução do estresse térmico, intensidade, e modelo experimental, não foram observadas diferenças na média de folículos primários, secundários e antrais entre os grupos experimentais,

indicando que os folículos que foram ativados tiveram igual capacidade de desenvolvimento durante a foliculogênese. Tomando essa observação, é possível que a redução de estruturas embrionárias viáveis verificada no grupo EGT esteja relacionada a falhas ou comprometimento das funções uterinas mediado, por exemplo, pela redução dos níveis locais de progesterona. A progesterona é fundamental para o desenvolvimento embrionário inicial, responsável por regular a secreção de uma série de fatores de crescimento pelo útero, essenciais para o desenvolvimento pré-implantacional (HUANG *et al.*, 2014). Em reforço, nota-se que além da redução de estruturas viáveis, o grupo EGT também apresentou tendência de redução no número total de estruturas.

É bem conhecido que uma variedade de agentes estressores induz o aumento da expressão de IL-1 β (interleucina 1 beta) em mamíferos, inclusive o ETC (TANEBE *et al.*, 2000; LEON *et al.*, 2006; GOSHEN E YIRMIYA, 2009; LEE *et al.*, 2015; KOCH *et al.*, 2019). Recentemente foi relatado que o tratamento materno com IL-1 β (estresse imunológico) em ratas Long-Evans gestantes induziu a regulação negativa da expressão uterina dos genes STAT5b e Zeb2, relacionados ao metabolismo local da progesterona na prole (VERSTRAETEN *et al.*, 2019). Este resultado indica que o estresse materno durante a gestação pode causar implicações na capacidade reprodutiva da prole em roedores, ao comprometer as funções uterinas mediado por modificações da expressão gênica, possivelmente por mecanismos epigenéticos. Nesse sentido, não se pode descartar a hipótese de que o grupo de EGT, devido a sua maior carga alostática, tenha sofrido maiores impactos de uma possível superexposição à IL-1 β , que, em teoria, poderia afetar as funções uterinas da prole e reduzir viabilidade e sobrevivência embrionária. Entretanto, estudos adicionais são necessários para verificar se os efeitos observados por VERSTRAETEN *et al.* (2019) em ratas Long-Evans se repetem em camundongos, e se o ETC repetido aumenta os níveis de IL-1 β o suficiente para causar o mesmo efeito do tratamento materno com administração direta do agente estressor.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÕES

A exposição materna ao ETC durante a gestação afetou negativamente o desenvolvimento intrauterino da prole de todos os grupos experimentais, com efeito mais pronunciado quando a exposição ocorreu na primeira metade da gestação. O ETC afetou ainda o desenvolvimento somático da prole e alterou o perfil da população folicular ovariana, e, além disso, comprometeu a eficiência da produção de embriões no grupo EGT. Em conjunto, os resultados indicam que a primeira metade da gestação representa um período crítico para desenvolvimento embrionário de camundongos, e traz consequências para o desenvolvimento da prole no período pós-parto, e que o ETC prolongado (durante toda a gestação) demonstrou comprometer a eficiência da resposta ovariana à superovulação e produção de embriões viáveis.

6.2 PERSPECTIVAS

Considerando as inúmeras projeções de aumento da temperatura global, aprimorar os conhecimentos dos efeitos do ETC na ótica transgeracional é de suma importância. Nesse sentido, uma perspectiva futura é analisar os efeitos da exposição materna ao ETC na prole à luz da Biologia Molecular, por meio de estudos de expressão gênica com foco na identificação de modificações epigenéticas entre sucessivas gerações (F1, F2, F3...).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, e com respaldo da literatura, ficou claro que o efeito da exposição materna ao ETC na prole é dependente do momento em que ocorre e do tempo de exposição, e a resposta ao insulto pode ser específica conforme o tecido ou tipo celular. Desta forma, uma abordagem interessante seria mapear estrategicamente intervalos de tempo em que ocorre determinado evento durante o desenvolvimento embrionário, como por exemplo, o período pré-implantacional, o momento da migração das células germinativas primordiais, o intervalo em que ocorre a colonização e multiplicação das oogônias nas gônadas, entre outros. A indução do ETC em momentos pontuais pode gerar informações importantes com menor sobreposição de resultados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.1 OBRAS CITADAS

- ABIEC. Beefreport - Perfil da pecuária no Brasil 2020. ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne; 2020.
- Adams NR, DeMayo FJ. The role of steroid hormone receptors the establishment of pregnancy in rodents in: regulation of implantation and establishment of pregnancy in mammals tribute to 45 year anniversary of roger v. short's "maternal recognition of pregnancy". *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, Springer 2015.
- Aguiar LH, Hyde KA, Pedroza GH, Denicol AC. Heat stress impairs in vitro development of preantral follicles of cattle. *Animal Reproduction Science* 213, 2020.
- Ahmed JÁ, Nashiruddullah N, Dutta D, Biswas RK, Borah P. Cumulus cell expansion and ultrastructural changes *in vitro* matured bovine oocytes under heat stress. *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University Vol. 18, No. 3, Ser. No. 60, Pag 203-207; 2017.
- Akbarinejad V, Gharagozlau F, Vojgani M. Temporal effect of maternal heat stress during gestation on the fertility and anti-Müllerian hormone concentration of offspring in bovine. *Theriogenology* 99, 69 -78, 2017.
- Alonso BR, Sánchez JM, González E, Lonergan P, Rizos D. Challenges in studying preimplantation embryo-maternal interaction in cattle. *Theriogenology*, 2020.
- Al-Zghou MB, El-Bah SM. Basal and dynamics mRNA expression of muscular HSP108, HSP90, HSF-1 and HSF-2 in thermally manipulated broilers during embryogenesis. *BMC Veterinary Research* 15:83; 2019.
- Amitha JP, Krishnan G, Bagath M, Sejian V, Bhatta R. Heat stress impact on the expression patterns of diferente reproduction related genes in Malabari goats. *Theriogenology* 131, 169e176; 2019.
- An GH, Chen XW, Li C, Zhang L, Wei MF, Chen JJ, Ma Q, Yang DF, Wang J. Pathophysiological Changes in Female Rats with Estrous Cycle Disorder Induced

by Long-Term Heat Stress. BioMed Research International. Article ID 4701563, 10 pages; 2020.

Aroyo A, Yavin s, Arav A, Roth Z. Maternal hyperthermia disrupts developmental competence of follicle-enclosed oocytes: *In vivo* and *ex vivo* studies in mice. *Theriogenology* 67, 1013-1021; 2007.

Baena MM, Costa AC, Vieira GR, Rocha RFB, Ribeiro ARB, Ibelli AMG, Meirelles SLC. Heat tolerance responses in a *Bos taurus* cattle herd raised in a Brazilian climate. *Journal of Thermal Biology* 81, 162–169; 2019.

Barra R, Cruz G, Mayerhofer A, Paredes A, Lara HE. Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring. *Reproduction*. 4 148(2):137-45; 2014.

Baruselli PS, Elliff FM, Silva L, Catussi BLC, Bayeux BM. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019); Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.

Bastin JF, Clark E, Elliott T, Hart S, Hoogen JVD, Hordijk I, Ma H, Majumder S, Manoli G, Maschler J, Mo L, Routh D, Yu K, Zohner C, Crowther TW. Understanding climate change from a global analysis of city analogues. *PLoS ONE* 14(7), 2019.

Batista RI, Viana S, Pinto IS, Maffill VV, Viana JH. Somatic development and embryo yield in crossbred F1 mice generated by different mating strategies. *Braz J Biol*. 2010 Feb;70(1):145-9.

Beale PK, Marsh KJ, Foley WJ, Moore BD. A hot lunch for herbivores: physiological effects of elevated temperatures on mammalian feeding ecology. *Biol. Rev.* v. 93 p. 674-692; 2017.

Bei M, Wang Q, Yu W, Han L, Yu J. Effects of heat stress on ovarian development and the expression of HSP genes in mice. *Journal of Thermal Biology* 89, 102532, 2020.

Berghänel A, Heistermann M, Schülke O, Ostner J. Prenatal stress accelerates offspring growth to compensate for reduced maternal investment across mammals. *PNAS*. 114 (50); 2017.

- Bó GA, Mapletof RJ. Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology* 150, 353e359; 2020.
- Brust V, Schindler PM, Lewejohann L. Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). *Front Zool.* 24;12 Suppl 1(Suppl 1):S17; 2015.
- Byers SL; Wiles MY; Dunn SL; Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE* 7(4): e35538, 2012.
- Cabanac M. Adjustable set point: to honor Harold T. Hammel. *J Appl Physiol* 100: 1338 – 1346; 2006.
- Cai H, Liu B, Wang H, Sun G, Feng L, Chen Z, Zhou J, Zhang J, Zhang T, He M, Yang T, Guo Q, Teng Z, Xin Q, Zhou B, Zhang H, Xia G, Wang C. SP1 governs primordial folliculogenesis by regulating pregranulosa cell development in mice. *Journal of Molecular Cell Biology.* 24;12(3):230-244, 2020.
- Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience* A.41.1-A.41.8, July 2009.
- Campos-Junior PH, Marinho AC, Carvalho BC, Batista RI, Garcia RM, Viana JH. Follicular populations, recruitment and atresia in the ovaries of different strains of mice. *Reprod Biol.* 2012 Mar;12(1):41-55.
- Canning J, Takai Y, Tilly JL. Evidence for genetic modifiers of ovarian follicular endowment and development from studies of five inbred mouse strains. *Endocrinology.* 144(1):9-12; 2003.
- Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *nature medicine* 18(12):1754-67; 2012.
- Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development (Cambridge, England).* 143(7):1063-1074; 2016.
- Cheong JN, Cuffe JS, Jefferies AJ, Anevskaja K, Moritz KM, Wlodek ME. Sex-Specific Metabolic Outcomes in Offspring of Female Rats Born Small or Exposed to Stress During Pregnancy. *Endocrinology.* 157(11):4104-4120; 2016.

- Choi I, Dasari A, Kim NH, Campbell KHS. Effects of prolonged exposure of mouse embryos to elevated temperatures on embryonic developmental competence. *Reproductive BioMedicine Online*. V. 31, p. 171–179; 2015.
- Christodoulou N, Weberling A, Strathdee D, Anderson KI, Timpson P, Zernicka-Goetz Z. Morphogenesis of extra-embryonic tissues directs the remodelling of the mouse embryo at implantation. *Nature Communications*. 10:3557, 2019.
- Collier RJ, Dahl GE, VanBaale MJ. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *Journal of Dairy Science* Vol. 89 No. 4, p. 1244-1253; 2006.
- Collin A, Lebreton Y, Fillaut M, Vincent A, Thomas F, Herpin P. Effects of exposure to high temperature and feeding level on regional blood flow and oxidative capacity of tissues in piglets. *Experimental Physiology*. 86.1, 83–91, 2001.
- Coloma-García WC, Mehaba N, Lionch P, Caja G, Such X, Salama AAK. Prenatal heat stress effects on gestation and postnatal behavior in kid goats. *PLoS ONE* 15(2); 2020.
- Dado-Senn B, Skibieli AL, Fabris TF, Dahl GE, Laporta J. Dry period heat stress induces microstructural changes in the lactating mammary gland. *PLOS ONE* 14(9), 2019.
- Dalanezi FM, Garcia HDM, Ferrazza RA, Franchi FF, Fontes PK, Castilho ACS, Nogueira MFG, Schimidt SEM, Sartori R, Ferreira JC. Extracellular vesicles of follicular fluid from heat-stressed cows modify the gene expression of in vitro-matured oocytes. *Animal Reproduction Science* 205, 94–104, 2019.
- Emanuelli IP, Costa CB, Marinho LSR, Seneda MM, Meirelles FV. Cumulus-oocyte interactions and programmed cell death in bovine embryos produced in vitro. *theriogenology*. 126, 81-87, 2018.
- Faire M, Skillern A, Arora R, Nguyen DH, Wang J, Chamberlain C, German MS, Fung JC, Laird DJ. Follicle dynamics and global organization in the intact mouse ovary. *Developmental Biology* 403(1); 69–79; 2015.

- Ferrazza RA, Garcia HDM, Aristizábal VHV, Nogueira CS, Veríssimo CJ, Sartori JR, Sartori R, Ferreira JCP. Thermoregulatory responses of Holstein cows exposed to experimentally induced heat stress. *Journal of Thermal Biology* 66, 68–80; 2017.
- Festing MFW. The Choice of Animal Model and Reduction. *Altern Lab Anim*, 32 (Suppl 2):59–64; 2004.
- Findlay JK, Dunning KR, Gilchrist RB, Hutt KJ, Russell DL, Walters KA. Follicle Selection in Mammalian Ovaries. *The Ovary* (third Edition), 3-21; 2019.
- Fraser R, Lin CJ. Epigenetic reprogramming of the zygote in mice and men: on your marks, get set, go! *Reproduction*; 152(6): R211–R222; 2016.
- Gaytan F, Morales C, Leon S, Galiano DG, Roa J, Tena-Sempere M. Crowding and follicular fate: spatial determinants of follicular reserve and activation of follicular growth in the mammalian ovary. *PLoS ONE* 10(12). 2015.
- García-Vargas D, Juárez-Rojas L, Rojas Maya S, Retana-Márquez S. Prenatal stress decreases sperm quality, mature follicles and fertility in rats. *Syst Biol Reprod Med*. 65(3):223-235; 2019.
- Goshen I, Yirmiya R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Front Neuroendocrinol*.30(1):30-45; 2009.
- Gougeon e Chainy. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J. Reprod. Fert.* 81, 433-442; 1987.
- Gougoula C; Bielfeld AP; Pour SJ; Krussel JS; Gotte M; Benten WPM; Bust DMB. Physiological and anatomical aspects of the reproduction of mice with reduced Syndecan-1 expression. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 17:18, 2019.
- Hale BJ, Hager CL, Seibert JT, Selsby JT, Baumgard LH, Keating AF, Ross JW. Heat stress induces autophagy in pig ovaries during follicular development. *Biology of Reproduction*, 97(3), 426–437, 2017.
- Hamid HY, Zakaria MZAB, Meng GY, Haron AW, Mustapha NM. Effects of elevated ambient temperature on reproductive outcomes and offspring growth depend on exposure time. *The Scientific World Journal*, V. 2012 P.6, 2012.

- Han J, Shao J, Chen Q, Sun H, Guan L, Li Y, Liu J, Liu H. Transcriptional changes in the hypothalamus, pituitary, and mammary gland underlying decreased lactation performance in mice under heat stress. *The FASEB Journal*, Vol. 33, pp. 12588-12601, 2019.
- Hansen PJ. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364, 3341–3350; b 2009.
- Hanson MA, Skinner MK. Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. *Environ Epigenetic.* 2(1); 2016
- Hasegawa A, Mochida K, Inoue H, Noda Y, Endo T, Watanabe G, Ogura A. High-yield superovulation in adult mice by anti-inhibin serum treatment combined with estrous cycle synchronization. *Biology of Reproduction* 94(1):21, 1–8; 2016.
- Heinicke J, Hoffmann G, Ammon C, Amon B, Amon T. Effects of the daily heat load duration exceeding determined heat load thresholds on activity traits of lactating dairy cows. *Journal of Thermal Biology.* 77, 67–74; 2018.
- Henry BK, Eckard RJ, Beauchemin KA. Review: Adaptation of ruminant livestock production systems to climate changes. *Animal*, 12(S2), S445-S456, 2018.
- Hoffmann I. Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetics resources. *animal genetics.* 41(1):32-46; 2010.
- Hoole C, Czenze ZJ, Bennett NC, Mckechnie AE. Thermal physiology of three sympatric small mammals from southern Africa. *Journal of Zoology* 307, 28–35; 2019.
- Hu J, Barrett RDH. Epigenetics in natural animal population. *Journal of Evolutionary Biology*, 30, 1612-1632; 2017.
- Huang Z, Wang TS, Qi QR, Zuo RJ, Liang XH, Zhao XY, Yang ZM. Progesterone regulates secretin expression in mouse uterus during early pregnancy. *Reprod Sci.* 21(6):724-32; 2014.
- Huber E, Notaro US, Recce S, Rodríguez FM, Ortega HH, Salvetti NR, Rey F. Fetal programming in dairy cows: Effect of heat stress on progeny fertility and

- associations with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions. *Animal Reproduction Science* 216; 106348; 2020.
- IPCC (intergovernmental panel on climate change) 2018. *climate change 2018. Special Report*. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, 32 pp.
- Jackson Laboratory. *Breeding strategies for maintaining colonies of laboratory mice*, A Jackson Laboratory Resource Manual. The Jackson Laboratory 2009.
- James MC. Glossary of terms for thermal physiology Third Edition, *The Japanese Journal of Physiology* Vol. 51, No. 2, 2001.
- Jirtle, RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* 8(4), 253–262. 2007.
- Khan A, Khan MZ, Umer S, Khan IM, Xu H, Wang Y. Cellular and molecular adaptation of bovine granulosa cells and oocytes under heat stress. *Animals*, 10, 110; 2020.
- Koch F, Thom U, Albrecht E, Weikard R, Nolte W, Kuhla B, Kuchn C. Heat stress directly impairs gut integrity and recruits distinct immune cell populations into the bovine intestine. *PNAS*. vol. 116, no. 21; 2019.
- Kolbe T, Landsberger A, Manz S, Na E, Urban I, Michel G. Productivity of superovulated C57BL/6J oocyte donors at different ages. *LabAnimal*, V 44, N^o 9; 2015.
- Koyama H, Ikeda S, Sugimoto M, Kume S. Effects of folic acid on the development and oxidative stress of mouse embryos exposed to heat stress. *Reprod Domest Anim.* 47(6):921-7; 2012
- Kuhl NM, Rensing L. Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell Mol Life Sci* 57(3): 450–463, 2000.
- La Salles AYF, Batista LF, Souza BB, Silva AF, Correia ELB. Growth and reproduction hormones of ruminants subjected to heat stress. *J Anim Behav Biometeorol* 5:7-12, 2017.
- Lee W, Moon M, Kim HG, Lee TH, Oh MS. Heat stress-induced memory impairment is associated with neuroinflammation in mice. *J Neuroinflammation.* 23;12:102; 2015

- Lejong M, Duterre MC, Vanmuylder N, Louryan S. Geldanamycin administration reduces the amount of primordial germ cells in the mouse embryo. *Morphologie*. 102, 219(338)—224; 2018.
- Leon LR, Blaha MD, DuBose DA. Time course of cytokine, corticosterone, and tissue injury responses in mice during heat strain recovery. *J Appl Physiol* 100(4):1400-9; 2006.
- Li J, Gao H, Tian Z, Wu Y, Wang Y, Fang Y, Lin L, Han Y, Wu S, Haq I, Zen S. Effects of chronic heat stress on granulosa cell apoptosis and follicular atresia in mouse ovary. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. Sep 29; 7:57, 2016.
- Li L, Wu J, Luo M, Sun Y, Wang G. The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. *Cell Stress and Chaperones*. 21(3): 467–475; 2016.
- Li MW, Floyd KCK. DNA fragmentation index (DFI) as a measure of sperm quality and fertility in mice. *Scientific Reports* 2;10(1):3833; 2020.
- Limesand SW, Camacho LE, Kelly AC, Antolic AT. Impact of thermal stress on placental function and fetal physiology. *Anim. Reprod.*, v.15, (Suppl.1), p.886-898. 2018
- Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55: 1151–1191, 1986.
- Loh B, Maier I, Winar A, Janke O, Tzschentke B. Prenatal development of epigenetic adaptation processes in poultry: Changes in metabolic and neuronal thermoregulatory mechanisms. *Avian Poult. Biol. Rev.* 15 (3-4):119–128; 2004.
- Lonergan P, Sánchez JM, Mathew DJ, Passaro C, Fair T. Embryo development in cattle and interactions with the reproductive tract. *Reproduction, Fertility and Development*, 31, 118–125, 2019.
- Lu, X, Gao Z, Qin D, Li L. A maternal functional module in the mammalian oocyte-to-embryo transition. *Trends in Molecular Medicine*. Vol. xx, No. yy, 2017.
- Luo C, Zuñiga J, Edison E, Palla S, Dong W, Thornburg JP. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. Vol 50, No 4; 2011.

- Luo M, Li L, Xiao C, Sun Y, Wang G. Heat stress impairs mice granulosa cell function by diminishing steroids production and inducing apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 412:81–90; 2016.
- Ma N, Mochel NRd, Pham PD, Yoo TY, Cho KWY, Digman MA. Label-free assessment of pre-implantation embryo quality by the Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)-phasor approach. *Sci Rep* 9, 13206, 2019.
- Martins CF, Dode MN, Báo SN, Rumpf R. Método de TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozoides bovinos. *Embrapa Cerrados*, p26, 2007.
- Massimo De Felici. The formation and migration of primordial germ cells in mouse and man, in: *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development, Results and Problems in Cell Differentiation* v. 58. Springer International Publishing Switzerland 2016.
- Mayvaneh F, Entezari A, Sadeghifar F, Baaghideh M, Guo Y, Atabati A, Zhao Q, Zhang Y. Exposure to suboptimal ambient temperature during specific gestational periods and adverse outcomes in mice. *Environ Sci Pollut Res*, 2020.
- Mondal S, Mor A, Reddy IJ, Nandi S, Gupta PP. Heat stress induced alterations in prostaglandins, ionic and metabolic contents of sheep endometrial epithelial cells in vitro. *Biomed J Sci & Tech Res*. Volume 1- Issue 4: 2017.
- Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. The effects of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote* 20, pp. 249–259, 2011.
- Nabenishi H, Takagi S, Kamata H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. *Mol Reprod Dev*, v.79, p. 31–40, 2012
- Nóbrega GH, Silva EMN, Souza BB. Manguiera, J. M. A produção animal sob a influência do ambiente nas condições do semiárido nordestino. *revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável*. vol. 06, n. 01, p. 67-73, 2011.

- Oliveira CS, Sarapião RV, Quintão CCR. Biotécnicas da reprodução em bovinos. embrapa gado de leite, ISSN 1516-7453, 2014.
- Oron e Ivanova. Cell fate regulation in early mammalian development. *Phys. Biol.* 9 045002 (17pp), 2012.
- Ozawa M, Hirabayashi M, Kanai Y. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. *Reproduction.*124(5):683-9; 2002.
- Pães VM, Vieira LA, Correia HHV, As NAR, Moura AAA, Sales AD, Rodrigues APR, Padilha DM, Santos FW, Apgar GA, Campello CC, Camargo LSA, Figueiredo JR. Effect of heat stress on the survival and development of in vitro cultured bovine preantral follicles and on in vitro maturation of cumulus–oocyte complex. *Theriogenology* 86, 994–1003; 2016.
- Pallubinsky H, Schellen L, Lichtenbelt WDVM. Exploring the human thermoneutral zone – A dynamic approach. *Journal of Thermal Biology.* 79, 199–208; 2019.
- Pavani K, Carvalhais I, Faheem M, Chaveiro A, Reis FV, Moreira SF. Reproductive performance of holstein dairy cows grazing in dry-summer subtropical climatic conditions: effect of heat stress and heat shock on meiotic competence and in vitro fertilization. *asian australas j. anim. sci.* 28, 334–42; 2015.
- Pfeiffer J, Tarbashevich K, Bandemer J, Palm T, Raz E. Rapid progression through the cell cycle ensures efficient migration of primordial germ cells – The role of Hsp90. *Developmental Biology.* 436, 84–93; 2018.
- Pritchett K, Taft RA. Reproductive biology of the laboratory mouse. In: *The mouse in biomedical research.* second ed., Burlington: Elsevier; p. 91–122, 2007.
- Puscheck EE, Awonuga AO, Jiang YYZ, Rappolee DA. Molecular biology of the stress response in the early embryo and its stem cells in: *Cell Signaling During Mammalian Early Embryo Development.* *Advances in Experimental Medicine and Biology* 843. Springer. 2015.

- Rashamol V, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Achana PR, Bhatta R. Physiological adaptability of livestock to heat stress: an updated review. *J Anim Behav Biometeorol.* 6:62-71, 2018.
- Renaudeau D, Collin A, Yahav S, Basilio V, Gourdine JL, Collier RJ. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6:5, pp 707-728; 2012.
- Rhoads ML. Effects of periconceptional heat stress on primiparous and multiparous daughters of holstein dairy cows. *Theriogenology*, v. 150 P. 458-463; 2020.
- Rimon-Dahari N, Heinemann LY, Alyagor L, Dekel N. Ovarian folliculogenesis in: *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development, Results and Problems in Cell Differentiation* v. 58. Springer International Publishing Switzerland 2016.
- Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE, Albertini D. Multiple mechanisms of germ cell loss in the perinatal mouse ovary. *Reproduction*, 137 709–720; 2009.
- Rout PK, Kaushik R, Ramachandran N. Differential expression pattern of heat shock protein 70 genes in tissues and heat stress phenotypes in goats during peak heat stress period. *Cell Stress and Chaperones* 21:645–651; 2016.
- Sakatani M. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, vol.63, N 4, 2017.
- Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Rashamol VP, Pragna P, Devaraj C, Bratta R. Genes for resilience to heat stress in small ruminants: A review. *Small Ruminant Research* 173, 42–53; 2019.
- Shelton D, Alberts J. Development of behavioral responses to thermal challenges. *Dev Psychobiol.* 60(1): 5–14; 2018.
- Skibieli AL, Peñagaricano F, Amorín R, Ahmed BM, Dahl GE, Laporta J. In utero heat stress alters the offspring epigenome. *Scientific Reports* 8:14609; 2018.

- Skibieli AL, Senn BD, Fabris TF, Dahl GE, Laporta J. In utero exposure to thermal stress has longterm effects on mammary gland microstructure and function in dairy cattle. *PLoS ONE* 13(10), 2018a.
- Skinner MK. Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol Cell Endocrinol.* 398:4–12; 2014.
- Sobrinho CMF. Avaliação da técnica de vitrificação de ovários de camundongos da linhagem B6D2F1 pertencente ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – ICTB/Fiocruz-RJ. Dissertação de Mestrado, Programa de Pósgraduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos–FIOCRUZ, 2018.
- Souza-Cácares MB, Filhado ALL, Silva WAL, Cardoso CJT, Martins MIM, Melo-Sterza FA. Oocyte quality and heat shock proteins in oocytes from bovine breeds adapted to the tropics under different conditions of environmental thermal stress. *Theriogenology.* 130:103-110, 2019.
- Sozen B, Cox AL, De Jonghe J, Bao M, Hollfelder F, Glover DM, Zernicka-Goetz M. Self-Organization of Mouse Stem Cells into an Extended Potential Blastoid. *Dev Cell.* 16;51(6):698-712.e8; 2019
- Stringfellow DA, Givens MD. *Manual of the International Embryo Transfer Society*, fourth ed. International Embryo Society, Champaign, 2010.
- Succu S, Sale S, Ghirello G, Ireland JJ, Evans ACO, Atzori AS, Mossa F. Exposure of dairy cows to high environmental temperatures and their lactation status impairs establishment of the ovarian reserve in their offspring. *J Dairy Sci.* 103(12):11957-11969; 2020.
- Sun YC, Wang WW, Sun XF, Cheng SF, Li L, Zhao Y, Shen W, Chen H. The role of autophagy during murine primordial follicle assembly. *AGING*, Vol. 10, No. 2; 2018.
- Taft RA. Virtues and limitations of the preimplantation mouse embryo as a model system. *Theriogenology* 69 10-16; 2008.

- Takeo T, Nakagata N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6J female mice. *PLoS ONE* 10(5); 2015.
- Tanebe K, Nishijo H, Muraguchi A, Ono T. Effects of chronic stress on hypothalamic Interleukin-1beta, interleukin-2, and gonadotrophin-releasing hormone gene expression in ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol.* 12(1):13-21; 2000.
- Tingen CM, Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE, Wellington JT, Shea L, Woodruff TK. Prepubertal Primordial Follicle Loss in Mice Is Not Due to Classical Apoptotic Pathways. *Biology of Reproduction.* 81, 16–25; 2009.
- Tzschentke B, and basta D. Early development of neuronal hypothalamic thermosensitivity in birds: Influence of epigenetic temperature adaptation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Volume 131, Issue 4, 2002.
- Tzschentke B, Nichelmann M. Development of avian thermoregulatory system during the early postnatal period: Development of avian set-point. *Ornis Fennica* 76: 189-198; 1999.
- Ullah S, Zhang M, Yu H, Mustafa S, Shafiq M, Wei Q, Wang W, Jan M, Mao D. Heat exposure affected the reproductive performance of pregnant mice: Enhancement of autophagy and alteration of subcellular structure in the corpus luteum. *Reprod Biol. Sep;19(3):261-269; 2019.*
- Vanselow J, Vernunft A, Koczan D, Spitschak M, Kuhla B. Exposure of Lactating Dairy Cows to Acute PreOvulatory Heat Stress Affects Granulosa Cell-Specific Gene Expression Profiles in Dominant Follicles. *PLoS ONE* 11(8); 2016.
- Vargas JC, Jahnke MM, Dohlman TM, Rothschild MF, Gunn PJ. Climatic factors affecting quantity and quality grade of in vivo derived embryos of cattle. *Animal Reproduction Science.*192:53-60, 2018.
- Verstraeten BSE, MacCreary JK, Weyers S, Metz GAS, Olson DM. Prenatal two-hit stress affects maternal and offspring pregnancy outcomes and uterine gene expression in rats: match or mismatch? *Biol Reprod.* 1;100(1):195-207; 2019.

- Viana JHM. Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo*. Embrapa, comunicado técnico nº 59. 2009.
- Vieira LM. Fatores associados à produção e à sobrevivência embrionária em programas de superovulação e transferência de embriões em fêmeas de raça holandesa em clima tropical. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, FMVZ/SUP. 2013.
- Wan X, He X, Liu Q, Wang XT, Ding X, Li H. Frequent and mild scrotal heat stress in mice epigenetically alters glucose metabolism in the male offspring. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 319:2, E291-E304; 2020.
- Wang Q, Sun QY. Evaluation of oocyte quality: Morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev*. 19(1):1-12, 2007.
- Watanabe R, Sasaki S, Kimura N. Activation of autophagy in early neonatal mice increases primordial follicle number and improves lifelong fertility. *Biology of Reproduction*, 14;102(2):399-411; 2020.
- Weng Q, Liu Z, Li B, Liu K, Wu W, Liu H. Oxidative stress induces mouse follicular granulosa cells apoptosis via JNK/FoxO1 Pathway. *PLoS ONE* 11(12), 2016.
- West JW. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. *J. Dairy Sci*. 2:21–35; 1999.
- Weyrich A, Lenz D, Jeschek M, Chung TH, Rubensam k, Goritz F, Jewgenow K, Fickel J. Paternal intergenerational epigenetic response to heat exposure in male Wild guinea pigs. *Molecular Ecology* 25, 1729–1740; 2016.
- Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science* 60-61, 535-347; 2000.
- Wolfenson D, Roth Z. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animal Frontiers*, Volume 9, Issue 1, January, Pages 32–38, 2019.
- Xu M, Sun J, Wang Q, Zhang Q, Wei C, Lai D. Chronic restraint stress induces excessive activation of primordial follicles in mice ovaries. *PLoS ONE* 13(3); 2018.

Zhou HX, Ma YZ, Liu YL, Chen Y, Zhou CJ, Wu SN, Shen J, Liang CG. Assessment of Mouse Germinal Vesicle Stage Oocyte Quality by Evaluating the Cumulus Layer, Zona Pellucida, and Perivitelline Space. PLoS ONE 9(8); 2014.

8. APÊNDICES E ANEXOS

8.1 ANEXO I FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Diamantina, 14 de março de 2018

Certificamos que o projeto intitulado " **Efeito do estresse térmico durante a gestação no desenvolvimento somático, parâmetros reprodutivos e nível de termotolerância da progênie em camundongos da linhagem C57BL/6**", protocolo nº **003/2018**, sob a responsabilidade de **Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em reunião de **14/03/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	18/04/2018 a 10/12/2018
Espécie/linhagem	Camundongos isogênico C57BL/6
Nº de animais	80
Peso/Idade	20±5g/3 – 6 meses
Sexo	40 Machos e 40 fêmeas
Origem	Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (Biotério/CBR/UFJF). Campus de Juiz de Fora – MG

O prazo de validade desse Certificado é equivalente a vigência do Projeto prorrogável por mais 1 ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA/UFVJM durante a vigência do projeto.

Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.

Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa 1, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.

Gustavo Henrique de Frias Castro
Vice-Coordenador da CEUA/UFVJM

Campus JK
Comissão de Ética no Uso de Animais/ UFVJM
Prédio da Reitoria-PRPPG- Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000n/Alto da Jacuba -
Diamantina/MG – CEP 39100-000 Telefone: +55 (38) 3532-1200

CEUA Comissão de Ética
no Uso de Animais
UFVJM