



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO  
SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**



**METABOLISMO LIPÍDICO DE OÓCITOS DE VACAS DE LEITE SOB  
ESTRESSE TÉRMICO**

**MARIANE GABRIELA CESAR RIBEIRO FERREIRA**

**Campo Grande – MS  
2023**

**MARIANE GABRIELA CESAR RIBEIRO FERREIRA**

**METABOLISMO LIPÍDICO DE OÓCITOS DE VACAS DE LEITE SOB  
ESTRESSE TÉRMICO**

***LIPID METABOLISM OF DAIRY COW OOCYTES UNDER THERMAL  
STRESS***

**MARIANE GABRIELA CESAR RIBEIRO FERREIRA**

**Orientador: Ériklis Nogueira**

**Co-orientadora: *Fabiana de Andrade Melo Sterza***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

**Campo Grande – MS  
2023**



**Leibniz-Institut für Nutztierbiologie  
Institut für Ernährungsbiologie „Oskar  
Kellner“  
z. Hd. Herrn PD Dr. habil. Björn Kuhla  
Wilhelm-Stahl-Allee 2**

**18196 Dummerstorf**

Dienstgebäude: Thierfelderstraße 18  
18059 Rostock  
Telefon: 0381/4035-0  
Telefax: 0381/4035-690  
Mail: [tierversuchswesen@lallf.mvnet.de](mailto:tierversuchswesen@lallf.mvnet.de)  
Bearbeitet von: Frau Dr. Hille, Frau Wiencke  
Tel. Durchwahl: -621, -643  
Aktenzeichen: 7221.3-1-060/19  
Ort, Datum: Rostock, 25.02.2020

### **Tierschutzgesetz**

- Gemäß Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 17. 12. 2018 (BGBl. I S. 2586) und
- Verordnung zur Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22.09.2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (Tierschutz-Versuchstierverordnung) vom 01.08.2013 (BGBl. I S. 3125), zuletzt geändert durch Artikel 394 der Verordnung vom 31.08.2015 (BGBl. I S. 1474)

hier: Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren

- Ihr Antrag vom: 18.11.2019 (eingegangen am 20.11.2019)
- Ihr Schreiben vom: 14.01.2020 (eingegangen am 23.01.2020)
- Versuchsleiter/-in: Herr PD Dr. habil. Björn Kuhla
- Stellv. Versuchsleiter/-in: Frau Dr. Franziska Koch
- Auszubildende Personen: Herr Dr. Andreas Vernunft
- Auszubildende Personen: Frau Dr. Franziska Koch  
Frau Hilke Brandt
- Durchführende Personen: Frau Dr. Franziska Koch  
Herr Dr. Andreas Vernunft  
Frau Astrid Schulz  
Frau Tanja Lenke  
Herr Dirk Oswald  
Frau Hilke Brandt
- Tierart / Stamm: Rind
- Anzahl der Tiere: 30
- Grad der Belastung: mittel

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erteile ich Ihnen die Genehmigung zur Vornahme wissenschaftlicher Versuche an 30 Milchkühen im Rahmen des Versuchsvorhabens „Hitzestress-induzierte Reduktion der Darmintegrität und Aktivierung der Immunregulation bei Milchkühen“ (Kurzbezeichnung: „LeakyCow“) unter folgenden Maßgaben:

1. Die Genehmigung gilt für das im o. g. Versuchsantrag, konkretisiert durch Ihr Schreiben vom 14.01.2020 (eingegangen am 23.01.2020), dargestellte Untersuchungsspektrum. Jede beabsichtigte Abweichung vom Antrag ist mir zuvor – über den Tierschutzbeauftragten – mitzuteilen.

### **Hauptsitz**

Post: Postfach 10 20 64 18003 Rostock  
Haus: Thierfelderstr. 18 18059 Rostock  
Tel./Fax: 0381-4035-0 / 4001510

2. Die Versuche finden unter der verantwortlichen Leitung von Herrn PD Dr. habil. Björn Kuhla statt. In dieser Funktion wird er von Frau Dr. Franziska Koch vertreten. Jeder beabsichtigte Wechsel des genannten Leiters oder der genannten Vertretung ist mir zuvor unverzüglich schriftlich zu melden.
3. Die Versuchstiere werden in der Experimentieranlage Rind im Leibniz-Institut für Nutztierhaltung, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf gehalten. Die Durchführung der Tierversuche findet im Tiertechnikum des Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf statt.
4. Diese Genehmigung gilt ab Bekanntgabe bis zum 01.03.2023.
5. **Eine unterschriebene tierärztliche Empfehlung gemäß § 18 Absatz 1 Nr. 4 der Tierschutz-Versuchstierverordnung für die Wiederverwendung der Versuchstiere (Nr. 1.1.5.5 des Antrags) ist umgehend nachzureichen.**
6. Spätestens 4 Wochen nach Abschluss der Versuche ist mir die Beendigung des Vorhabens mitzuteilen. Dabei ist ein Abschlussbericht über die Ergebnisse vorzulegen. Eine rückblickende Bewertung Ihres Versuchsvorhabens ist nicht vorgesehen.
7. Die Genehmigung wird unter dem Vorbehalt des jederzeitigen entschädigungslosen Widerrufs erteilt.

Dieser Bescheid ist nicht gebührenpflichtig.

**Begründung:**

Mit o. g. Schreiben haben Sie die Genehmigung Ihres o. g. Versuchsvorhabens beantragt und mit Schreiben vom 14.01.2020 konkretisiert. Es wurde von der Tierversuchskommission am 12.12.2019 zur Genehmigung empfohlen.

Meine Zuständigkeit für die Entscheidung über Ihren Versuchsantrag ergibt sich aus § 3 Nr. 3 des Gesetzes über Zuständigkeiten auf dem Gebiet des Tierschutzrechtes (TierSchZG M-V) in der Fassung der Bekanntmachung vom 28. September 2000 (GVOBl. M-V 2000, 514).

Ihr Vorhaben wird gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt. Die verfügbaren Nebenbestimmungen dienen der Sicherstellung der gesetzlichen Voraussetzungen der Tierversuchsgenehmigung. Der Genehmigungsbescheid wird gemäß § 33 Absatz 1 Nummer 4 der Tierschutz-Versuchstierverordnung mit Nebenbestimmungen versehen.

Die erteilte Genehmigung umfasst antragsgemäß den Einsatz von maximal 30 Tieren. Damit folge ich in meiner Entscheidung auch der Empfehlung der Tierversuchskommission, da ich die beantragte Anzahl an Versuchstieren für erforderlich und Ihr Versuchsvorhaben insgesamt für ethisch vertretbar erachte.

- Zu 1 Das im Antrag dargestellte Untersuchungsspektrum ist einzuhalten, da bei Abweichungen ggf. der Versuchszweck gemäß § 8 Absatz 1 Nr. 1 in Verbindung mit § 7a Absatz 1 und 2 Nummer 1 bis 3 Tierschutzgesetz gefährdet sein kann.
- Änderungen unterliegen grundsätzlich der Genehmigungspflicht gemäß § 8 Absatz 1 Tierschutzgesetz in Verbindung mit § 34 der Tierschutz-Versuchstierverordnung. Sie bedürfen nur dann keiner Genehmigung, wenn der Zweck des Versuchsvorhabens beibehalten wird, den Versuchstieren keine stärkeren Schmerzen, Leiden oder Schäden entstehen, die Versuchstierzahl nicht wesentlich erhöht wird und mir die Änderung angezeigt wurde.
- Bitte beachten Sie bei genehmigungspflichtigen Änderungen, dass diese – ebenso wie Neuansträge von Versuchsvorhaben - von mir grundsätzlich der Tierversuchskommission zugeleitet werden und von mir gemäß § 34 Absatz 3 der Tierschutz-Versuchstierverordnung spätestens nach einer Bearbeitungsfrist von 40 Arbeitstagen beschieden werden müssen. Für die Genehmigung der Änderungen gelten § 8 Absatz 1 Satz 2 des Tierschutzgesetzes und die §§ 31 bis 33 der Tierschutz-Versuchstierverordnung entsprechend.

- Zu 2 Gemäß § 8 Absatz 1 Satz 2 Nummer 2 des Tierschutzgesetzes sind der für das Versuchsvorhaben verantwortliche Leiter und sein Stellvertreter zu benennen. Beide müssen über die erforderliche fachliche Eignung verfügen und sind gemäß § 30 Absatz 1 und 2 der Tierschutz-Versuchstierverordnung für die Einhaltung der einschlägigen tierschutzrechtlichen Regelungen sowie der Bestimmungen dieses Bescheides verantwortlich.
- Zu 3 Darüber hinaus sind die Versuchstiere nur in Räumlichkeiten, für die eine entsprechende Erlaubnis zur Haltung von Versuchstieren erteilt wurde, zu halten (§ 11 Absatz 1 Nr. 1 Tierschutzgesetz). Gemäß § 8 Absatz 1 Nr. 3 und 5 Tierschutzgesetz ist für diese Räumlichkeiten eine tierversuchsgerechte Mindestausstattung erforderlich.
- Zu 4 Diese Genehmigung gilt antragsgemäß für den o.g. Zeitraum. Die Notwendigkeit der Befristung Ihres Versuchsvorhabens ergibt sich aus § 33 Absatz 2 der Tierschutz-Versuchstierverordnung. Danach ist die Genehmigung auf höchstens fünf Jahre zu befristen. Sie kann auf formlosen, mit Gründen versehenen Antrag höchstens zweimal um jeweils ein Jahr verlängert werden, wenn die Gesamtdauer des Versuchsvorhabens einen Zeitraum von fünf Jahre nicht überschreitet.
- Zu 5 Gemäß § 18 Absatz 1 Nr. 4 der Tierschutz-Versuchstierverordnung ist für die Wiederverwendung von Versuchstieren eine tierärztliche Empfehlung vorzulegen.
- Zu 6 Wird ein Versuchsvorhaben genehmigt, so kann die Behörde gemäß § 35 der Tierschutz-Versuchstierverordnung festlegen, dass das Versuchsvorhaben nach seinem Abschluss durch die zuständige Behörde zu bewerten ist und zu welchem Zeitpunkt diese Bewertung vorgenommen wird. Eine Bewertung ist vorzusehen, wenn das Versuchsvorhaben die Durchführung von
- Tierversuchen, in denen Primaten verwendet werden,
  - Tierversuchen, die nach Artikel 15 Absatz 1 in Verbindung mit Anhang VIII der Richtlinie 2010/63/EU als „schwer“ einzustufen sind, oder
  - Tierversuchen nach § 25 Absatz 2 der Tierschutz-Versuchstierverordnung
- beinhaltet.
- Zu 7 Der Widerrufsvorbehalt dient der Beachtung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes. Es soll erreicht werden, dass ein Widerruf dieser Genehmigung zulässig ist, wenn die Voraussetzungen des § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir gesetzten Frist abgeholfen wird. Die Genehmigung kann widerrufen werden, wenn ihre Beschränkungen oder Auflagen nicht eingehalten werden oder Tierversuche entgegen einer tierschutzrechtlichen Norm durchgeführt werden.

Dieser Bescheid ist nicht gebührenpflichtig, da für Ihre Einrichtung die persönliche Gebührenfreiheit gemäß § 8 Absatz 1 des Verwaltungskostengesetzes des Landes Mecklenburg-Vorpommern in der Fassung der Bekanntmachung vom 04. Oktober 1991 (GVBl. M-V, S. 306) besteht. Eine Gebührenpflicht besteht, wenn eine Einrichtung gemäß § 8 Absatz 2 des Verwaltungskostengesetzes des Landes Mecklenburg-Vorpommern berechtigt ist, die Verwaltungsgebühren Dritten aufzuerlegen.

#### **Hinweise:**

1. Die nach § 9 Absatz 5 des Tierschutzgesetzes i. V. m. 7 Absatz 2 und § 29 der Tierschutz-Versuchstierverordnung vorgeschriebenen Aufzeichnungen sind begleitend für jeden Einzelversuch zu führen. Sie sind fünf Jahre lang nach Abschluss des Versuchsvorhabens aufzubewahren.
2. Auf die Einhaltung der arzneimittelrechtlichen Vorschriften wird hingewiesen.

3. Auf die Meldepflicht für Tierversuche nach der Versuchstiermeldeverordnung (nach dem Muster der Anlagen zu dieser Verordnung für jedes Kalenderjahr nachträglich bis spätestens 31. März des Folgejahres) erlaube ich mir hinzuweisen.
4. Ebenso weise ich Sie auf die Straf- und Bußgeldtatbestände der §§ 17 bis 20a des Tierschutzgesetzes bei Zuwiderhandlungen gegen dieses Gesetz hin.

Ich empfehle Ihnen, dieses Genehmigungsschreiben allen an der Versuchsdurchführung beteiligten Personen zur Kenntnis zu geben.

**Rechtsbehelfsbelehrung:**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Thierfelderstraße 18, 18059 Rostock eingelegt werden.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag

Dr. Sylvia Hille

Nachrichtlich:

- Tierschutzbeauftragte/r: Herr Dr. Olaf Bellmann
- Zuständiges Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt: Landkreis Rostock

Com carinho dedico esta tese a  
todos que futuramente irão poder  
usufruir dos resultados gerados pela  
mesma. Desde a redação de  
trabalhos ou estabelecimento de  
novas tecnologias

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus em primeiro lugar, sem ele não teria tido forças para concluir todos esses anos de pós graduação.

As agências de fomento CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, e dos recursos financeiros necessários para a realização da Pesquisa.

Aos meus Orientadores Érikis Nogueira e Fabiana de Andrade Melo Sterza, por todo suporte, carinho e atenção durante o período. Pelos mesmos motivos agradeço também a todos os professores, coordenadores e funcionários que atendem ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (UFMS)

Ao Leibniz-Institut Für Nutztierbiologie (Alemanha), onde foram feitas as coletas e análises de materiais biológicos.

Ao Grupo de estudos em tecnologia da reprodução animal (GENTRA-UEMS), pelo suporte e aprendizado que me acompanham desde o meu início da vida acadêmica.

A minha amada família pela paciência, compreensão e incentivo durante todo o período.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estresse térmico *in vivo* em vacas leiteiras sobre o metabolismo lipídico dos complexos cumulus-oócito (COCs) submetidos à MIV. 27 Vacas primíparas da raça holandesa foram mantidas em câmara climática com alimentação *ad libitum* e temperatura constante de 28°C e índice de temperatura-umidade (ITU) de 76 durante 7 dias (Estresse térmico - HS) ou sob temperatura constante de 16°C, ITU = 60 e recebendo a mesma quantidade de alimento que as vacas submetidas a stress térmico (Pair-feeding - PF) ou alimentação *ad libitum* (Controle - C), durante o mesmo período. Os Complexos cumulus oócitos (COCs) foram obtidos pela técnica de slicing dos ovários. As amostras foram preparadas para análise antes (T0) e depois (T24) da MIV. Os COCs T0 e T24 foram desnudados e as Células do cumulus (CC) e oócitos (Oo) foram submetidos separadamente a análises do conteúdo lipídico (CoLi) e da atividade mitocondrial (AM) por fluorescência e microscopia confocal, perfil lipídico por LC-MS; e expressão gênica por RT-PCR utilizando a plataforma Fluidigm. O software Metaboanalyst 5.0 (heatmap e volcano plot) foi utilizado para avaliar estatisticamente os resultados da LC-MS. Para a fluorescência e a expressão genica, os dados foram organizados em um modelo fatorial 2x3 e analisados por proc GLM (SAS ondemand). Para todas as análises, foi considerado  $P < 0,05$ . Entre as vias metabólicas avaliadas, o maior número de alterações ocorreu nas CC. A expressão de genes que participam do controle de esteroides foi afetada nos animais HS, com redução de DHCR7, e aumento de CYP11A1. Esses efeitos estão provavelmente relacionado com a menor expansão das CC observada. HS foi o único grupo que mostrou um aumento significativo de CoLi após a MIV, além de reduzir mecanismos que colaboram com o controle da lipotoxicidade, como a redução de ELOVL5, e redução geral de TG (Oo e CC), principalmente os que são constituídos por ácidos graxos (AGs) esteárico (18:0), oléico (18:1) e linolênico (18:2), além da redução de HSPE1 e HSPD1 (CC). Alguns mecanismos de sobrevivência foram acionados, como a maior expressão de MAP2K2 (CC e Oo), FABP3 (CC), SIRT1 (CC e Oo) e MTCH2 (CC e Oo). Por outro lado foram prejudicadas vias importantes para o controle homeotérmico visto que, foram reduzidas as expressões de HSPA4, HSPA5, HSPA9 (CC e Oo) e ATF4 (CC e Oo). Eventos moleculares que participam da organização da cromatina também apontam uma competência reduzida dos oócitos HS, como a redução de H2A (CC e Oo) e aumento de G6PD (CC e Oo) e SETD2 (CC). Conclui-se que o metabolismo lipídico é afetado pelo estresse térmico em vacas leiteiras, afetando a produção de esteroides, o que impacta na expansão das células do cumulus. Em resposta ao estresse térmico ocorre aumento de lipídios e atividade mitocondrial após a MIV, mas com o perfil lipídico prejudicado, com redução de AGs importantes para o controle da lipotoxicidade.

Palavras-chave: estresse oxidativo, atividade mitocondrial, beta-oxidação, lipidoma, maturação oocitária

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of in vivo heat stress in dairy cows on lipid metabolism of cumulus-oocyte complexes (COCs) undergoing IVM. 27 Primiparous Holstein cows were kept in a climate chamber with ad libitum feeding and a constant temperature of 28°C and a temperature-humidity index (THI) of 76 for 7 days (Heat stress - HS) or under constant temperature of 16°C, THI = 60 and receiving the same amount of food as cows submitted to heat stress (Pair-feeding - PF) or ad libitum feeding (Control - C), during the same period. Oocyte cumulus complexes (COCs) were obtained by ovarian slicing technique. Samples were prepared for analysis before (T0) and after (T24) IVM. T0 and T24 COCs were denuded and cumulus cells (CC) and oocytes (Oo) were separately subjected to analyses of lipid content (LiCo) and mitochondrial activity (MA) by fluorescence and confocal microscopy, lipid profile by LC-MS; and gene expression by RT-PCR using the Fluidigm platform. Metaboanalyst 5.0 software (heatmap and volcano plot) was used to statistically evaluate the LC-MS results. For fluorescence and gene expression, data were organized in a 2x3 factorial model and analyzed by proc GLM (SAS ondemand). For all analyses,  $P < 0.05$  was considered. Among the metabolic pathways evaluated, the greatest number of alterations occurred in CC. The expression of genes that participate in steroid control was affected in HS animals, with reduced DHCR7, and increased CYP11A1. These effects are probably related to the decreased expansion of the CCs observed. HS was the only group that showed a significant increase in LiCo after IVM, in addition to reduced mechanisms that collaborate with the control of lipotoxicity, such as the reduction of ELOVL5, and overall reduction of TG (Oo and CC), mainly those consisting of stearic (18:0), oleic (18:1), and linolenic (18:2) fatty acids (FAs), and reduction of HSPE1 and HSPD1 (CC). Some survival mechanisms were triggered, such as increased expression of MAP2K2 (CC and Oo), FABP3 (CC), SIRT1 (CC and Oo), and MTCH2 (CC and Oo). On the other hand, important pathways for homeothermic control were impaired, HSPA4, HSPA5, HSPA9 (CC and Oo) and ATF4 (CC and Oo) expressions were reduced. Molecular events that participate in chromatin organization also point to reduced HS oocyte competence, such as reduced H2A (CC and Oo) and increased G6PD (CC and Oo) and SETD2 (CC). It is concluded that lipid metabolism is affected by heat stress in dairy cows, affecting steroid production, which impacts cumulus cell expansion. The increase in lipids and mitochondrial activity after IVM, but with impaired lipid profile, with reduction of FAs important for lipotoxicity control.

Keywords: oxidative stress, mitochondrial activity, beta-oxidation, lipidom, oocyte maturation

## **Lista de tabelas artigo 2**

|                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 Características das estruturas de ovários de animais submetidos a estresse térmico ou restrição nutricional por sete dias.....                                                                                 | 37 |
| Tabela 2 Recuperação total e viabilidade de oócitos de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico ou restrição nutricional .....                                                                                     | 38 |
| Tabela 3 Níveis de Estradiol e Progesterona em amostras de soro sanguíneo e fluido folicular de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou estresse nutricional .....                                            | 38 |
| Tabela 4 Concentração de TG e NEFAs no plasma sanguíneo de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou restrição alimentar por sete dias. ....                                                                    | 39 |
| Tabela 5 Detecção e análise diferencial de lipídios nas células e fluidos foliculares e plasma sanguíneo de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico e restrição alimentar por sete dias. ....                    | 41 |
| Tabela 6 Moléculas lipídicas com o mesmo comportamento em células cumulus,fluidos foliculares e/ou soro sanguíneo de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou estresse nutricional .....                       | 42 |
| Tabela 7 Classes de lipídios que mais sofreram alterações, em células foliculares e soro sanguíneo de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou estresse nutricional. ....                                      | 43 |
| Tabela 8 Correlação entre a atividade mitocondrial e conteúdo lipídico de oócitos e células do cumulus de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou restrição alimentar por sete dias em câmara climática. .... | 46 |

## **Lista de tabelas artigo 3**

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 Expansão de células do cumulus após maturação in vitro, de COCs provenientes de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico e nutricional. ...                                                                                     | 69 |
| Tabela 2 Detecção e análise diferencial de lipídios após maturação in vitro em células do cumulus, oócitos e meio de cultivo. Amostras biológicas provenientes de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou estresse nutricional. .... | 72 |
| Tabela 3 Classes de lipídios que mais sofreram alterações após maturação in vitro em células do cumulus, oócitos e meio de cultivo. Amostras biológicas são provenientes de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou nutricional. .   | 73 |
| Tabela 4 Moléculas lipídicas comuns após maturação in vitro em células do cumulus, oócitos e meio de cultivo. Amostras biológicas provenientes de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico. ....                                         | 74 |

### Lista de Figuras artigo 1

Figura 1 As mitocôndrias integram o metabolismo de combustível para gerar energia na forma de ATP. As mitocôndrias oxidam o piruvato (derivado da glicose ou lactato), ácidos graxos e aminoácidos para aproveitar os elétrons nos transportadores NADH e FADH<sub>2</sub>. NADH e FADH<sub>2</sub> transportam esses elétrons para a cadeia de transporte de elétrons, na qual um gradiente eletroquímico é formado para facilitar a produção de ATP por meio da fosforilação oxidativa. VDAC, canal aniônico dependente de voltagem; IDH2, isocitrato desidrogenase 2; OGDH, α-cetoglutarato desidrogenase; SDH, succinato desidrogenase; BCAT2, aminotransferase 2 de cadeia ramificada; ACS, acil CoA sintetase. Elétrons e equivalentes redutores são mostrados em amarelo. (SPINELLI; HAIGIS, 2018)..17

Figura 2 A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é, atualmente, a técnica que possibilita a análises de diversas substâncias com ampla caracterização de polaridade e massa molecular. Na cromatografia é feita a separação dos componentes de uma mistura entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial denominada fase estacionária, e um fluido que interage com a fase fixa, chamado fase móvel. As partes principais de um cromatógrafo são bomba, o injetor, a coluna e o detector ..... 20

### Lista de Figuras artigo 2

Figura 1 Delineamento experimental: 27 vacas da raça holandesa foram confinadas por sete dias em câmara climática por sete dias, divididas entre os seguintes grupos: Estresse Térmico (HS), mantidas a 28°C e ITU=76, com alimentação ad libitum; Controle (C), mantidas a 15°C e ITU=60, e alimentação a vontade; Pair feeding (PF), mantidas a 15°C e ITU=60, recebiam exatamente a mesma quantidade de comida ingerida pelos animais HS, por essa razão eram manejadas um dia depois dos outros grupos. Após o período de confinamento, foi coletado sangue (jugular) dos animais, e os mesmos foram abatidos em abatedouro próprio do instituto FBN (Alemanha), para obtenção dos ovários. Estes foram enviados para o laboratório, onde foi feita a morfologia dos ovários, aspiração folicular, por seringa e agulha, para obtenção do líquido folicular dos folículos

pequenos. Após a aspiração foi realizada a técnica de fatiamento dos ovários e lavagem das fatias para melhor recuperação dos complexos cumulus oócitos (COCs). Os COCs recuperados foram enviados para análises de fluorescência com microscopia confocal, (para identificação de atividade mitocondrial e conteúdo lipídico), PCR fluidigm (para avaliação da expressão gênica) e LC-MS (para avaliação do perfil lipídico), além de COCs a LC-MS também foi utilizada para avaliação de soro sanguíneo e fluido folicular. O soro sanguíneo foi utilizado também para avaliação de Triglicerídeos (TG) e ácidos graxos livres não esterificados (NEFAS). Foi realizado a dosagem de hormônios E2 e P4 com soro sanguíneo e fluido folicular. .... 30

Figura 2 Vacas em câmaras climáticas. A esquerda está o animal submetido ao estresse térmico (HS). À direita estão os animais sob conforto térmico, porém com fornecimento de alimentação diferente (C e PF). .... 30

Figura 3 Média da temperatura ambiente, umidade e ITU ao longo do período experimental. Os dados foram obtidos a partir dos relatórios das câmaras climáticas..... 31

Figura 4 Ovários de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico e nutricional. HS: animais submetidos a estresse térmico; PF animais submetidos a estresse nutricional; C ..... 37

Figura 5 Painel Lipídico discriminante de amostras de soro sanguíneo, fluido folicular, células do cumulus e oócitos de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou restrição alimentar por sete dias. A esquerda gráficos de Heatmap (Cores das colunas; verde: grupo controle, vermelho: heat stress; azul: Pair-feeding) e a direita gráficos discriminantes de PCA (Cores das bolhas verde: grupo controle, vermelho: heat stress; azul: Pair-feeding). .... 40

Figura 6 Comportamento de ácidos graxos de oócitos e células cumulus em moléculas lipídicas que apresentaram regulação diferente em vacas leiteiras dos grupos HS e PF. 0= indiferente; >0 upregulated <0 downregulated..... 44

Figura 7 Conteúdo lipídico e atividade mitocondrial em oócitos imaturos de vacas leiteiras. Corante para atividade mitocondrial (vermelho): Mitotracker®. Corante para conteúdo lipídico (verde): Bodipy® ..... 45

Figura 8 Expressão de genes em oócitos imaturos de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico (HS) ou restrição alimentar (PF) por sete dias. C grupo controle;Oo: oócitos; Cc: Células do Cumulus (Tukey P<0,05);..... 47

### Lista de Figuras Artigo 3

Figura. 1 Delineamento experimental dos tratamentos in vivo ..... 62

Figura. 2 Média da temperatura ambiente, umidade e ITU ao longo do período experimental. Os dados foram obtidos a partir dos relatórios das câmaras climáticas..... 62

Figura. 3 Medição da expansão das células do cumulus após o período de 24 horas de maturação com o auxílio do Image J. A: células do cumulus compactas antes da MIV; B: células do cumulus expandidas após a MIV. O cálculo da expansão das células cumulus foi feito pela diferença entre as células expandidas e as células compactadas ..... 64

Figura. 4 Imagens representativas do Conteúdo lipídico e atividade mitocondrial em oócitos antes e após 24 horas em meio de maturação, provenientes de vacas leiteiras. Estresse térmico: com alimentação ad libitum e temperatura ambiente de 28°C, ITU = 76; Pair-feeding: receberam a mesma quantidade de alimento ingerida pelo grupo HS e condições climáticas de 15°C e ITU=60; Controle: com alimentação ad libitum e condições climáticas de 15°C, ITU = 60. Corante para atividade mitocondrial: Mitotracker®. Corante para conteúdo lipídico: Bodipy® .. 69

Figura. 5 Conteúdo lipídico e atividade mitocondrial antes e após a maturação in vitro, de oócitos provenientes de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico e nutricional após sete dias. C: grupo controle; HS: grupo estresse térmico; PF grupo pair feeding; T0: oócitos imaturos; T24: oócitos após período de maturação ..... 70

Figura. 6 Análise de Heatmap em oócitos, células do cumulus e meio de cultivo após a maturação in vitro de COCs de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou estresse nutricional por sete dias. .... 71

Figura. 7 Expressão de genes em oócitos após maturação in vitro de COCs de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico (HS) ou restrição alimentar (PF); Controle (C). Diferenças significativas foram verificadas por meio do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). ..... 75

Figura. 8 Expressão de genes em células cumulus após maturação in vitro de COCs de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico (HS) ou restrição alimentar

(PF); Controle (C). Diferenças significativas foram verificadas por meio do teste de Tukey ( $P < 0,05$ )..... 76

Figura. 9 Figura. 9 Em vacas holandesas, o estresse térmico (HS) in vivo por sete dias reduziu a qualidade de oócitos (Oo) maturados in vitro, fato observado pela menor expansão das células do cumulus (CC) após a MIV. Foi Observado que no plasma sanguíneo (BP) e no fluido folicular (FF) havia menor concentração de estradiol (E2). Entre as vias metabólicas avaliadas, o maior número de alterações ocorreu nas CC. Houve menor expressão de DHCR7 (CC e Oo), responsável pela síntese de colesterol, que por sua vez é precursor de hormônios esteroides. Houve um aumento do gene CYP11A1 (CC), contudo não houve redução de P4, mas provavelmente havia P4 suficiente para induzir um feedback negativo na hipófise e resultar na redução da produção de FSH, e como consequência reduzir também a produção de E2 e após a MIV reduzir a produção de ácido hialurônico, responsável por auxiliar na expansão das CC. Ademais, o estresse térmico in vivo contribuiu para o aumento de ROS durante a MIV, pois houve um aumento significativo do conteúdo lipídico e redução da ação dos mecanismos que auxiliam o controle da lipotoxicidade, como a redução da expressão de ELOVL5 (CC), que é mediador da formação de TAG (CC e Oo), constituídas principalmente por ácidos graxos (AGs) esteárico (18:0), oléico (18:1) e linolênico (18:2). Além disso, a redução de HSPE1 e HSPD1 (CC), marcam atividades das UPRmt, que deveriam ser reguladas positivamente em resposta a concentrações elevadas de ácidos graxos e ROS. Alguns mecanismos de sobrevivência foram acionados, como a maior expressão de MAP2K2 (CC e Oo - ativa receptores de insulina), FABP3 (CC - mediadora do transporte de AGs entre CC e Oo), SIRT1 (CC e Oo - responsável por regular o ciclo celular e a proliferação, reparo de DNA) e MTCH2 (CC e Oo - maior produção de energia e sobrevivência celular sob condições estressantes). MTCH2 também pode ter colaborado para o aumento da atividade mitocondrial apresentado, pois está envolvida na lipogênese e transmite as informações para a maquinaria de fusão mitocondrial para promover o alongamento mitocondrial. A redução da expressão dos genes relacionados à resposta ao estresse, HSPA4, HSPA5, HSPA9 (CC e Oo) e ATF4 (CC e Oo), indicam exaustão desse sistema. A redução da expressão de H2A (CC e Oo) e aumento da expressão de G6PD (CC e Oo) e SETD2 (CC), indicam menor competência dos oócitos. TAG: triglicerídeos; E2: estradiol; Eventos descritos na cor azul na figura não foram avaliados neste estudo, contudo diante dos resultados observados e a literatura, são atividades com alta chance de serem confirmadas. .... 82

## Lista de anexos

|                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Anexo 1 Detalhes de Primers usados na PCR.....                                                                                                                                                  | 89 |
| Anexo 2 Expressão de genes em oócitos imaturos de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico ou restrição nutricional por sete dias. <b>(Artigo 1)</b> .....                                 | 91 |
| Anexo 3 Expressão de genes em células do cumulus imaturos de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico ou restrição nutricional por sete dias <b>(Artigo 1)</b> ..                          | 92 |
| Anexo 4 Expressão de genes em oócitos de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico ou restrição nutricional In vivo por sete dias, e maturação in vitro <b>(Artigo 2)</b> . ....            | 94 |
| Anexo 5 Expressão de genes em células do cumulus de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico ou restrição nutricional In vivo por sete dias, e maturação in vitro <b>(Artigo 2)</b> . .... | 95 |

## Sumário

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO                                                                                                                                   | 1  |
| ABSTRACT                                                                                                                                 | 2  |
| Introdução                                                                                                                               | 11 |
| Capítulo 1. Revisão de Literatura                                                                                                        | 13 |
| Foliculogênese                                                                                                                           | 13 |
| Oogênese                                                                                                                                 | 14 |
| Importância da atividade mitocondrial no desenvolvimento de oócitos                                                                      | 15 |
| Metabolismo Lipídico nos oócitos                                                                                                         | 18 |
| Estudo de lipídios em oócitos por espectrometria de massa                                                                                | 19 |
| Estudo da expressão de genes através da técnica de Fluidigm                                                                              | 20 |
| Referências Bibliográficas                                                                                                               | 22 |
| Capítulo 2: METABOLISMO LIPÍDICO DE OÓCITOS DE VACAS DE LEITE SOB ESTRESSE TÉRMICO                                                       | 26 |
| Resumo                                                                                                                                   | 26 |
| 1. Introdução                                                                                                                            | 27 |
| 2. Material e métodos                                                                                                                    | 29 |
| 2.2 Análises                                                                                                                             | 32 |
| 2.2.1 Atividade mitocondrial e conteúdo lipídico de oócitos                                                                              | 32 |
| 2.2.2 Expressão gênica                                                                                                                   | 33 |
| 2.2.3 Cromatografia Líquida e espectrometria de massa (LC-MS)                                                                            | 34 |
| 2.2.4 Dosagem Hormonal e lipídios séricos                                                                                                | 35 |
| 2.2.5 Estatística                                                                                                                        | 35 |
| 3. Resultados                                                                                                                            | 37 |
| 4. Discussão                                                                                                                             | 47 |
| 5. Conclusões                                                                                                                            | 53 |
| 6. Referências                                                                                                                           | 54 |
| Capítulo 3: INFLUENCIA DO ESTRESSE TÉRMICO <i>IN VIVO</i> SOB A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE COMPLEXO CUMULUS OÓCITOS DE VACAS LEITEIRAS | 58 |
| Resumo                                                                                                                                   | 58 |
| 1. Introdução                                                                                                                            | 60 |
| 2. Metodologia                                                                                                                           | 61 |

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 Análises                                                  | 63 |
| 2.1.1 Expansão das células do Cumulus Oócitos                 | 63 |
| 2.1.2 Atividade mitocondrial e conteúdo lipídico de oócitos   | 64 |
| 2.1.3 Expressão gênica                                        | 65 |
| 2.1.4 Cromatografia Líquida e espectrometria de massa (LC-MS) | 66 |
| 2.1.5 Estatística                                             | 67 |
| 3. Resultados                                                 | 68 |
| 4. Discussão                                                  | 77 |
| 5. Conclusão                                                  | 83 |
| 6. Referencias                                                | 83 |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS                                          | 87 |
| IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO          | 88 |
| <b>Anexos</b>                                                 | 89 |

## Introdução

Os ovários são as glândulas sexuais femininas responsáveis por cumprir dois processos primordiais, que garantem a proliferação das espécies: a foliculogênese, que consiste na formação, crescimento e maturação folicular, com início na constituição do folículo primordial, terminando com a ovulação. E a oogênese, que consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais até a fecundação do oócito (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

A compreensão de como as diferentes condições ambientais interferem nos mecanismos básicos de aquisição de competência oocitária, podem auxiliar na busca de alternativas que otimizem a eficiência reprodutiva de animais sob situações estressantes, como por exemplo o excesso de calor.

O estresse térmico influencia negativamente o bem-estar, o crescimento, a reprodução e saúde dos animais (BROWN-BRANDL, 2018). As perdas reprodutivas variam desde a dificuldade na detecção do estro (BARBOSA et al., 2014), menor qualidade oocitária (PAULA-LOPES et al., 2012) até perdas embrionárias precoces (MACEDO et al., 2014).

As altas temperaturas influenciam diretamente no metabolismo dos animais, pelo fato de acionar a termorregulação, a qual entre outros fenômenos, promove a redução da ingestão de alimentos, perda peso e conseqüentemente alteração de vários mecanismos fisiológicos, entre eles a reprodução, especialmente no que diz respeito à qualidade oocitária (BRADLEY; SWANN, 2019).

É fato que a dieta e a saúde da mãe refletem na qualidade dos oócitos, visto que os nutrientes provenientes da alimentação passam para corrente sanguínea, e uma parte é direcionada para o fluído folicular, os quais serão responsáveis por fornecer energia, em forma de ATP, e outros substratos necessários para a maturação adequada do oócito. Qualquer desequilíbrio nesse processo pode danificar o metabolismo oocitário e posteriormente o metabolismo do embrião pré-implantação. Estudos com mamíferos demonstram que dietas ricas em lipídeos mudaram os parâmetros bioquímicos do sangue, e por conseqüência a quantidade de lipídios no fluido folicular, oócitos e embriões pré implantação (camundongos (MA; YANG; LIANG, 2012); ovinos (ZERON; SKLAN; ARAV, 2002). Em bovinos já

foi documentado que no verão os oócitos contêm fosfolipídios com 80% de ácidos graxos saturados, e no inverno essa porção cai pela metade (ZERON et al., 2001). Não estão bem definidos como os diferentes tipos de estresse, térmico ou nutricional, afetam de fato as vias e mecanismos pelos quais os lipídios atravessam da corrente sanguínea até os oócitos.

O objetivo deste estudo é investigar os mecanismos biológicos envolvidos no metabolismo lipídico de oócitos em resposta ao estresse térmico e restrição alimentar em vacas Holandesas.

## Capítulo 1. REVISÃO DE LITERATURA

### Foliculogênese

A foliculogênese se inicia na vida fetal das fêmeas mamíferas. A primeira etapa é a formação dos folículos primordiais, e a última é a ovulação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). É no ambiente folicular que o oócito encontra todos os substratos necessários para o seu crescimento e maturação, assim é possível afirmar que o folículo é a unidade básica funcional do ovário, pois além da função gametogênica, produz os hormônios que regem o ciclo estral (VAN WEZEL; RODGERS, 1996).

A foliculogênese compreende o período do crescimento do folículo pré-antral até a formação do folículo pré-ovulatório (SILVA et al., 2003). Da população total de folículos ovarianos, cerca de 95% são pré-antrais, e a maioria não é utilizada na vida reprodutiva das fêmeas (ROSSETTO et al., 2009; TARU SHARMA; DUBEY; MEUR, 2009).

O folículo primordial consiste em um oócito quiescente e com citoplasma homogêneo, circundado por uma camada de células da granulosa achatadas ou cubóides (BRAW-TAL, 2002). O folículo primordial passa por um processo de ativação que o coloca em um *pool* de folículos em crescimento, esse processo de ativação resulta na multiplicação das células foliculares, e na modificação de todas para o formato cubóide, constituindo assim o folículo primário. Nessa etapa o oócito cresce, processo notado principalmente pelo aumento do seu diâmetro (FAIR, 2003).

O desenvolvimento evolui até a formação do folículo secundário, fase caracterizada pelo oócito cercado por duas ou mais camadas de células cubóides, e formação da zona pelúcida, que consiste em uma grossa camada que envolve o oócito, e também pela formação da teca interna (KACINSKIS et al., 2005).

A transição do folículo secundário para o terciário, é marcada pela formação do antro, e diferenciação das células da teca interna e externa. A cavidade do antro é repleta de fluido folicular que é composto por água, lipídeos, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006).

O desenvolvimento final dos folículos antrais passa por três fases, chamadas de recrutamento, seleção e dominância. O recrutamento começa quando alguns folículos aumentam as concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH), e aumento do antro e fluído folicular, neste momento os folículos medem cerca de 1-3 mm. Apenas um folículo é escolhido para exercer dominância sobre os demais, reduzindo o crescimento destes, e evitando o recrutamento de novos (FAIR, 2003). Se houver a presença de um corpo lúteo durante o período de dominância, o folículo dominante entrará em atresia, devido aos altos níveis de progesterona circulante, mas se ocorrer a luteólise haverá menos progesterona, o que permite um aumento do hormônio luteinizante (LH), que levará ao crescimento final do folículo resultando em ovulação, que é a liberação do oócito maduro para a tuba uterina (GINTHER et al., 2003).

Geralmente a composição da dieta e a condição corporal do animal influenciam no conteúdo lipídico do fluido folicular e das células ovarianas, incluindo os oócitos. Por exemplo, ovelhas alimentadas com uma dieta suplementada com óleo de peixe por 13 semanas produziram oócitos com melhor morfologia e melhor integridade de membrana, além de promover alterações significativas no perfil de ácidos graxos das células do cumulus e no fluído folicular aumentando a proporção de ácidos graxos insaturados de cadeia longa nos fosfolipídios do plasma e das células cumulus em 7,4 e 12,7%, respectivamente (  $P < 0,05$ ). (ZERON; SKLAN; ARAV, 2002). Curiosamente, também há mudanças sazonais na composição de ácidos graxos dos folículos ovarianos bovinos. Foi observado que níveis de ácidos graxos saturados aumentam no fluido folicular no inverno em comparação com o verão (ZERON et al., 2001). Assim é evidente que as mudanças nutricionais e térmicas alteram significativamente o comportamento biofísico dos oócitos, mas não está claro quais são os mecanismos e vias acionadas para que tais mudanças ocorram.

## Oogênese

A oogênese é o processo pelo qual ocorre a diferenciação das células germinativas primordiais, até a formação do oócito fecundado. Esse processo tem início na vida fetal da fêmea e a conclusão ocorre após a puberdade, porém

somente alguns oócitos completam o processo, a grande maioria sofre atresia (FAIR, 2003).

Esse processo pode ser dividido em sete passos: 1) geração de células germinativas primitivas (CGPs); 2) migração das CGPs para as gônadas; 3) colonização das gônadas pelas CGPs; 4) Diferenciação das CGPs em oogônias; 5) Proliferação das oogônias; 6) início da meiose; 7) Parada da meiose no estágio de diplóteno da prófase I, ou vesícula germinativa (VG) (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Permanecem em VG até pouco antes da ovulação, quando, por ação hormonal, são estimulados a retomar a meiose.

A retomada da meiose é desencadeada pelo pico pré-ovulatório de LH. Os principais eventos desta retomada são a quebra da VG e o progresso da meiose até a metáfase II, resultando na expulsão do primeiro corpúsculo polar, quando então ocorre a segunda interrupção da meiose. O oócito permanece assim até ser fecundado pelo espermatozóide, quando então a segunda divisão meiótica é finalizada, e o segundo corpúsculo polar é expulso (LONERGAN et al., 1994).

O oócito é responsável por armazenar energia suficiente para que o futuro embrião consiga se desenvolver, e ter autonomia para produzir suas próprias reservas (DUMOLLARD; DUCHEN; CARROLL, 2007). Assim, os mecanismos de desenvolvimento embrionário estão ligados a alterações no metabolismo energético. Os oócitos dos folículos primordiais (parados em prófase I) já possuem pequenas gotículas de lipídeos (LDs) que estão ligadas ao retículo endoplasmático e as mitocôndrias, formando as chamadas “unidades metabólicas”. Conforme o antro folicular aumenta essas unidades metabólicas se multiplicam até o momento da maturação, além disso as LDs são consideradas centros de metabolismo e homeostase celular. São diversas moléculas e lipídeos, de variadas classes, que além de serem cruciais na produção de ATP, também são precursores de hormônios e mensageiros secundários (WARZYCH et al., 2017).

### Importância da atividade mitocondrial no desenvolvimento de oócitos

As mitocôndrias são verdadeiras usinas para as funções celulares, e apoiam a transcrição e tradução durante a maturação e fertilização dos oócitos, além do desenvolvimento embrionário inicial. Dessa forma, a qualidade das mitocôndrias

determina a qualidade do oócito e do futuro embrião (VAN DER REEST et al., 2021).

As mitocôndrias são heranças exclusivas das mães, assim a população mitocondrial presente no oócito dará origem a todas as futuras mitocôndrias da prole (JANSEN; DE BOER, 1998), enquanto as mitocôndrias paternas são degradadas após a entrada do espermatozóide no oócito (DUMOLLARD; DUCHEN; CARROLL, 2007). Acredita-se que o motivo desta degradação, seja para proteger o embrião de anomalias deletérias, produto de exposição a altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ocorrem durante a espermatogênese (TILLY; SINCLAIR, 2013).

O número de mitocôndrias aumenta significativamente de menos de 10, em células germinativas pré-migratórias para 200 em oogônias (BABAYEV; SELI, 2015), 6 mil em oócitos primários e mais de 100 mil, durante a maturação citoplasmática (TRIMARCHI et al., 2000), mas não há síntese de novas mitocôndrias entre metáfase II e blastocistos (BABAYEV; SELI, 2015).

Após a ovulação os oócitos de mamíferos dependem predominantemente do ATP de suas ~100.000 mitocôndrias para sobreviver até que, o embrião na fase de mórula compacta, comece a glicólise, antes da implantação do blastocisto no útero (DUMOLLARD; DUCHEN; CARROLL, 2007).

As mitocôndrias são responsáveis por várias sinalizações metabólicas, epigenéticas e REDOX (redução radical do estresse oxidativo). Tais processos são essenciais para as funções celulares (DUMOLLARD et al., 2009). Novos estudos apontam que, disfunções nas mitocôndrias são o principal fator do envelhecimento do oócito (VAN DER REEST et al., 2021).

As mitocôndrias produzem moléculas precursoras, que atuam como blocos para construir proteínas, lipídios, DNA e RNA, além de manter a homeostase de transportadores de elétrons (NADH e o FADH<sub>2</sub>) e de gerenciar o metabolismo de resíduos (SPINELLI; HAIGIS, 2018).

As células consomem combustíveis como açúcares, aminoácidos e ácidos graxos para gerar energia na forma de ATP e GTP (WALSH; TU; TANG, 2018). A glicose é metabolizada via glicólise no citosol, gerando o piruvato, que é transportado para a mitocôndria para sofrer fosforilação oxidativa no ciclo do ácido

tricarboxílico (TCA), e, por meio de oxidações iterativas, os elétrons são armazenados nos equivalentes redutores NADH e FADH<sub>2</sub>. Esses transportadores depositam elétrons na cadeia de transporte de elétrons (ETC), na membrana mitocondrial interna (IMM), e utilizam esse fluxo para impulsionar prótons para o espaço intermembranar, o que gera o gradiente eletroquímico que impulsiona a produção de ATP. Algumas fontes alternativas de carbono ao piruvato são o acetato glutamina, BCAA e ácidos graxos (SPINELLI; HAIGIS, 2018). Na figura 1 está ilustrado como as mitocôndrias transformam o substrato em energia para as células, abrangendo as fontes clássicas e as não convencionais.

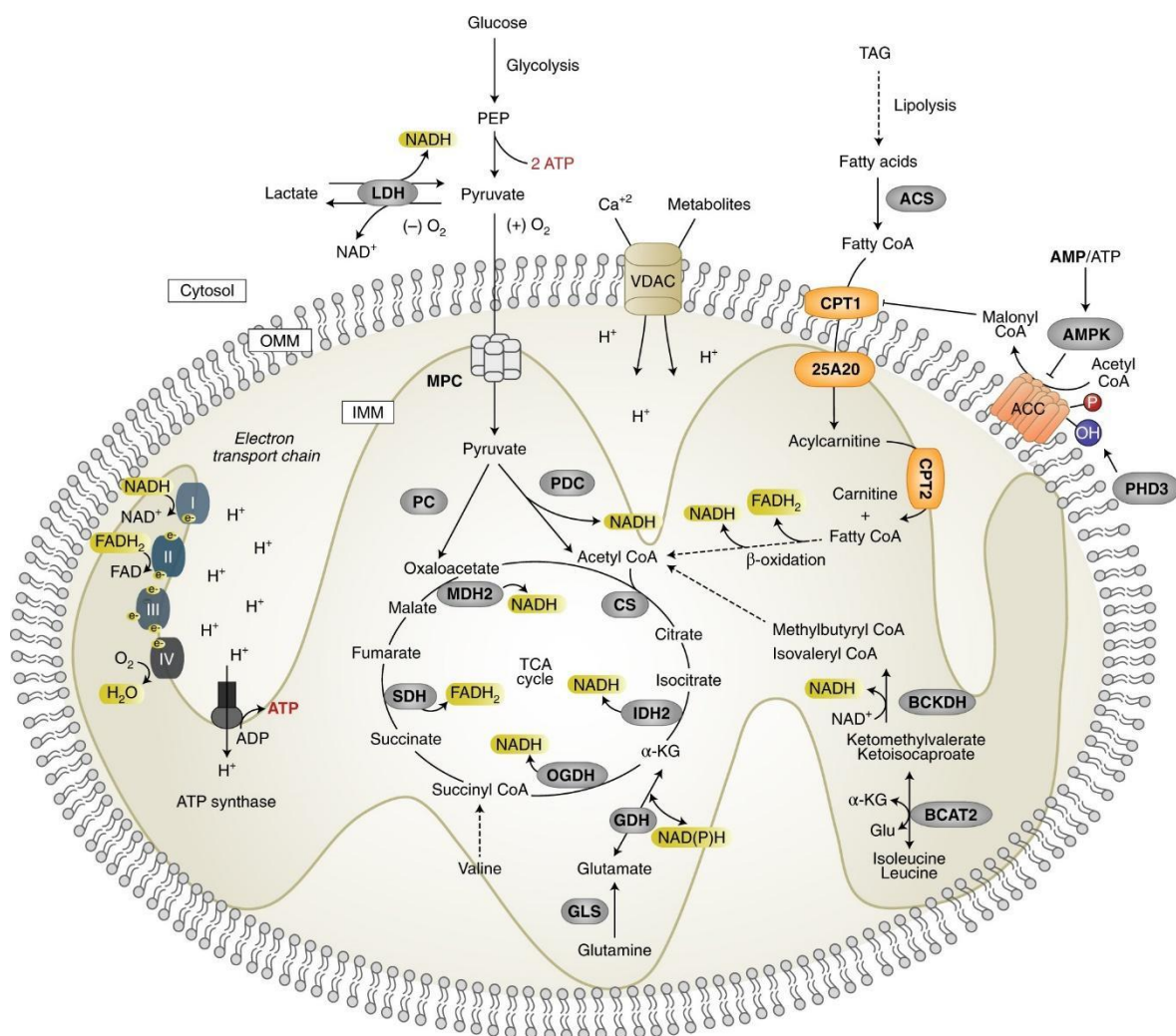


Figura 1 As mitocôndrias integram o metabolismo de combustível para gerar energia na forma de ATP. As mitocôndrias oxidam o piruvato (derivado da glicose ou lactato), ácidos graxos e aminoácidos para aproveitar os elétrons nos transportadores NADH e FADH<sub>2</sub>. NADH e FADH<sub>2</sub> transportam esses elétrons para a cadeia de transporte de elétrons, na qual um gradiente eletroquímico é formado para facilitar a produção de ATP por meio da fosforilação oxidativa. VDAC, canal aniônico dependente de voltagem; IDH2, isocitrato desidrogenase 2; OGDH, α-cetoglutarato desidrogenase; SDH, succinato desidrogenase; BCAT2, aminotransferase 2 de cadeia

ramificada; ACS, acil CoA sintetase. Elétrons e equivalentes redutores são mostrados em amarelo. (SPINELLI; HAIGIS, 2018).

## Metabolismo Lipídico nos oócitos

Os ácidos graxos são estocados como gotículas lipídicas, que são liberadas no citoplasma como ácidos graxos livres e absorvidos nas mitocôndrias para o metabolismo celular. Faltam informações sobre até que ponto os ácidos graxos permanecem livres no citoplasma ou são absorvidos pelas mitocôndrias para o metabolismo. Quantificar o consumo de oxigênio ou o teor de acylCoA permitiria a avaliação da real absorção de ácidos graxos pelas mitocôndrias, mas essa mensuração é muito difícil de ser feita. O que se sabe é que um grande número das moléculas lipídicas é ativamente esterificado a uma molécula de glicerol catalisada pela enzima diacilglicerol aciltransferase (DGAT) e armazenado como triacilgliceróis (TAG) neutros (BRADLEY; SWANN, 2019). Em oócitos conhecendo o conteúdo de TAG e a fração fosfolipídica (PL) do conteúdo total de ácidos graxos dos oócitos, é possível estimar a porcentagem de ácidos graxos livres do citoplasma do oócito (MCEVOY et al., 2000), mas dependendo das condições ambientais essas porções podem sofrer variações.

O processo pelo qual as mitocôndrias utilizam os lipídios, entre outros substratos, é a oxidação. Alguns complexos de proteínas durante a oxidação ocasionam o vazamento de elétrons e volta da matriz mitocondrial, como consequência reduzindo o oxigênio molecular, produzindo o que é conhecido como radical superóxido ( $O_2^-$ ), uma molécula altamente reativa que é prontamente convertida em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e outras espécies reativas de oxigênio (ROS). A produção prolongada de ROS em excesso causa estresse oxidativo, que é um precursor das vias celulares apoptóticas e, portanto, a produção de ROS deve ser mantida em um mínimo possível (QUINLAN et al., 2013).

Técnicas que caracterizem o perfil lipídico e a análise da expressão de genes ligados às funções mitocondriais podem ajudar na compreensão dessas características nos oócitos.

## Estudo de lipídios em oócitos por espectrometria de massa

O estudo de características metabólicas em oócitos foi por tempos um grande desafio, pela disponibilidade limitada de material para amostra (CHEN et al., 2020). Estudos utilizando a cromatografia em camada delgada (TLC), e a cromatografia gasosa (GC) encontraram um total de 24 ácidos graxos em oócitos de bovinos e suínos. Porém, para a realização dessas técnicas havia a necessidade de reunir mais 1000 oócitos por amostra experimental, o que dificultava a realização dos estudos (MCEVOY et al., 2000).

A espectrometria de massa (MS) proporciona uma detecção mais sensível e seletiva em comparação a TLC e a GC. Essa técnica ainda permite obter informações mais estruturais. Dessorção/ionização a laser assistida por matriz MS (MALDI-MS), tem sido muito utilizada para analisar oócitos de mamíferos, aplicada para detectar esfingomielinas (SM), fosfatidilcolinas (PC) e triacilgliceróis (TAG) em oócitos únicos e embriões, também permite a análise de oócitos individuais, evitando o agrupamento de dezenas a centenas de gametas para uma única medição. Esses fatos tornam a técnica mais útil para analisar oócitos e embriões de mamíferos (APPARICIO et al., 2012; FERREIRA et al., 2012). Entre as restrições dessa técnica está o fato de que não é possível colocar padrões internos nessas abordagens, limitando a análise qualitativa ou semiquantitativa.

Para superar essas limitações, foi proposto o uso de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a MS de alta resolução (LC-MS), permitindo separação cromatográfica e quantificação absoluta, bem como a identificação autêntica com a composição de ácidos graxos. Usualmente a técnica é utilizada para investigar a lipidômica no leite de vaca, colostro e soro (FARKE et al., 2011), e recentemente está sendo utilizada para investigação de perfis lipídicos de oócitos, possibilitando a separação de diferentes espécies moleculares e a identificação detalhada de seus ácidos graxos, além de ajudar na classificação efetiva de oócitos normais e degenerados. Explorar as diferenças entre as classes lipídicas pode servir para estabelecer biomarcadores lipídicos de qualidade oocitária. (CHEN et al., 2020).

A seguir na figura 2, uma ilustração sobre o funcionamento da LC-MS

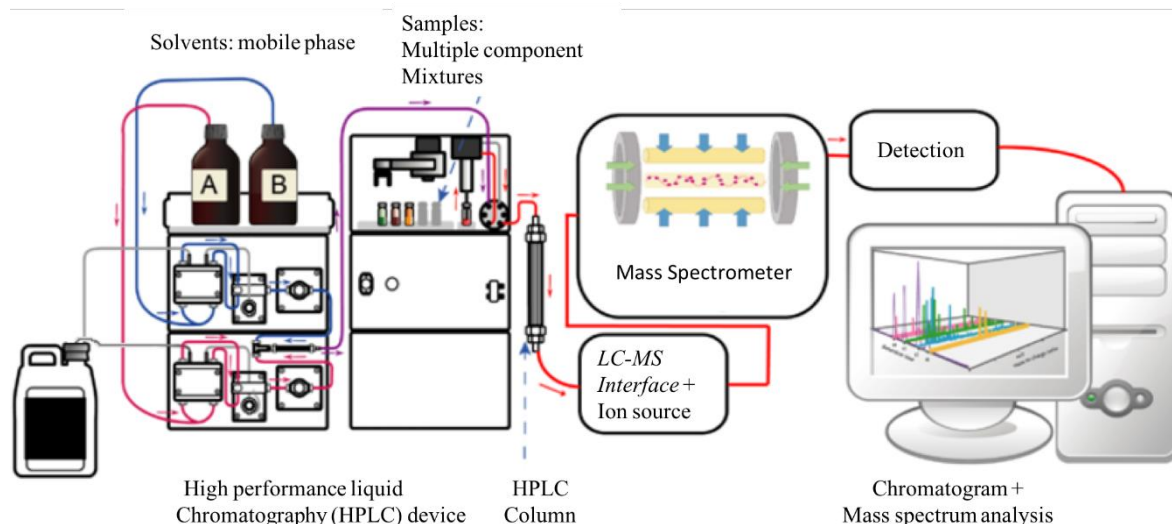


Figura 2 A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é, atualmente, a técnica que possibilita a análises de diversas substâncias com ampla caracterização de polaridade e massa molecular. Na cromatografia é feita a separação dos componentes de uma mistura entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial denominada fase estacionária, e um fluido que interage com a fase fixa, chamado fase móvel. As partes principais de um cromatógrafo são bomba, o injetor, a coluna e o detector

## Estudo da expressão de genes através da técnica de Fluidigm

A PCR quantitativa em tempo real foca em genes específicos ou conjuntos de genes e é uma técnica bastante sensível. Além disso a técnica permite ser utilizada junto com a tecnologia microfluídica (C1) para analisar a expressão de até 96 genes em 96 amostras usando a plataforma microfluídica Biomark desenvolvida pela Fluidigm (KOLODZIEJCZYK; LÖNNBERG, 2018).

O Fluidigm C1 realiza transcrição reversa e amplificação de cDNA por PCR em chip. Uma grande vantagem é que todas essas reações ocorrem em volumes de nanolitros, reduzindo os custos dos reagentes. É importante ressaltar que esta plataforma permite a inspeção microscópica de cada célula na captura, o que permite a identificação de posições onde várias células ou detritos são capturados. Esse método de captura é muito mais suave do que a microtitulação usando separação de células ativadas por fluorescência (FACS) e, portanto, é adequado para tipos de células delicadas, como gametas, células embrionárias, neurônios, megacariócitos, entre outros (KOLODZIEJCZYK; LÖNNBERG, 2018). Em blastocistos, a análise através do fluidigm indicou a expressão de alguns genes previamente relatados como não sendo expressos, possivelmente por estarem em níveis de expressão tão baixa, que fossem imperceptíveis por outras técnicas

(NEGRÓN-PÉREZ; ZHANG; HANSEN, 2017), fato que reforça a precisão da técnica, mesmo com genes expressos em níveis baixos em populações de células específicas.

Em resumo a ferramenta Fluidigm C1 permite: descobrir perfis genéticos de populações celulares específicas; desvendar com profundidade o conteúdo genético populacional, com menor viés e baixa taxa de erro; realização de estudos de triagem e validação subsequentes a diversas aplicações; redução significativa dos reagentes com seu protocolo simplificado e otimizado.

## Referências Bibliográficas

APPARICIO, M. et al. Chemical Composition of Lipids Present in Cat and Dog Oocyte by Matrix-Assisted Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI- MS). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 113–117, dez. 2012.

BABAYEV, E.; SELI, E. Oocyte mitochondrial function and reproduction. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, v. 27, n. 3, p. 175, 6 jun. 2015.

BARBOSA, B. R. P. et al. Tolerância ao calor em bovinos das raças Nelore branco, Nelore vermelho e Pantaneira. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, p. 854–865, 2014.

BARNETT, K. R. et al. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, p. 537–555, 1 set. 2006.

BRADLEY, J.; SWANN, K. Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. **International Journal of Developmental Biology**, v. 63, n. 3–5, p. 93–103, 2019.

BRAW-TAL, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1–2, p. 11–18, 22 fev. 2002.

BROWN-BRANDL, T. M. Understanding heat stress in beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, 2018.

CHEN, Z. et al. Lipidomic profiling of dairy cattle oocytes by high performance liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry for developmental competence markers. **Theriogenology**, v. 144, p. 56–66, 1 mar. 2020.

DUMOLLARD, R. et al. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 3, p. 346–353, 1 maio 2009.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77, p. 21–49, 2007.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 203–216, 15 out. 2003.

FARKE, C. et al. Bovine Colostrum: Determination of Naturally Occurring Steroid Hormones by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC–MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 1423–1427, 23 fev. 2011.

FERREIRA, C. R. et al. Single oocyte and single embryo lipid analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 1, p. 29–33, 1 jan. 2012.

GIL, A. et al. One- vs two-phase extraction: re-evaluation of sample preparation procedures for untargeted lipidomics in plasma samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 23, p. 5859–5870, 1 set. 2018.

GINTHER, O. J. et al. Associated and Independent Comparisons Between the Two Largest Follicles Preceding Follicle Deviation in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 2, p. 524–529, 1 fev. 2003.

IRELAND, J. J.; COULSON, P. B.; MURPHREE, R. L. Follicular Development during Four Stages of the Estrous Cycle of Beef Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 1261–1269, 1 nov. 1979.

JANSEN, R. P. S.; DE BOER, K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1–2, p. 81–88, 25 out. 1998.

KACINSKIS, M. Á. et al. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 1–2, p. 45–57, 1 jun. 2005.

KOŁODZIEJCZYK, A. A.; LÖNNBERG, T. Global and targeted approaches to single-cell transcriptome characterization. **Briefings in Functional Genomics**, v. 17, n. 4, p. 209, 1 jul. 2018.

LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 1, p. 48–53, 1 jan. 1994.

MA, W.; YANG, X.; LIANG, X. Obesity does not aggravate vitrification injury in mouse embryos: A prospective study. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, 31 ago. 2012.

MACEDO, G. G. et al. O estresse por calor diminui a fertilidade de fêmeas bovinas por afetar o desenvolvimento oocitário eo embrionário. **Rev Bras Reprod Anim.[internet]**, v. 38, n. 2, p. 80–85, 2014.

MCEVOY, T. G. et al. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 163–170, 2000.

MCMANUS, C. M. et al. **Physiology and genetics of heat stress in cattle. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**CABI International, , 11 maio 2020.

NEGRÓN-PÉREZ, V. M.; ZHANG, Y.; HANSEN, P. J. Single-cell gene expression of the bovine blastocyst. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 154, n. 5, p. 627, 2017.

PAULA-LOPES, F. F. et al. **Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects**Anim Reprod. [s.l: s.n.].

QUINLAN, C. L. et al. The Determination and Analysis of Site-Specific Rates of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. **Methods in Enzymology**, v. 526, p. 189–217, 1 jan. 2013.

ROSSETTO, R. et al. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, n. 2, p. 112–123, ago. 2009.

SILVA, J. et al. Establishment of histone H3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. **Developmental Cell**, v. 4, n. 4, p. 481–495, 1 abr. 2003.

SPINELLI, J. B.; HAIGIS, M. C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. **Nature Cell Biology** 2018 20:7, v. 20, n. 7, p. 745–754, 27 jun. 2018.

TARU SHARMA, G.; DUBEY, P. K.; MEUR, S. K. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. **Livestock Science**, v. 123, n. 2–3, p. 300–305, 1 ago. 2009.

TILLY, J. L.; SINCLAIR, D. A. Germline energetics, aging and female infertility. **Cell metabolism**, v. 17, n. 6, p. 838, 6 jun. 2013.

TRIMARCHI, J. R. et al. Oxidative Phosphorylation-Dependent and-Independent Oxygen Consumption by Individual Preimplantation Mouse Embryos 1. **1866 BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 62, p. 1866–1874, 2000.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 1 abr. 2005.

VAN DER REEST, J. et al. Mitochondria: Their relevance during oocyte ageing. **Ageing Research Reviews**, v. 70, p. 101378, 1 set. 2021.

VAN WEZEL, I. L.; RODGERS, R. J. Morphological Characterization of Bovine Primordial Follicles and Their Environment In Vivo'. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 55, p. 1003–1011, 1996.

WALSH, C. T.; TU, B. P.; TANG, Y. Eight Kinetically Stable but Thermodynamically Activated Molecules that Power Cell Metabolism. **Chemical reviews**, v. 118, n. 4, p. 1460–1494, 28 fev. 2018.

WARZYCH, E. et al. Prepubertal heifers versus cows—The differences in the follicular environment. **Theriogenology**, v. 87, p. 36–47, 1 jan. 2017.

ZERON, Y. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, p. 447–454, 2001.

ZERON, Y.; SKLAN, D.; ARAV, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 271–278, 2002.

## Capítulo 2: METABOLISMO LIPÍDICO DE OÓCITOS DE VACAS DE LEITE SOB ESTRESSE TÉRMICO

Autores: Mariane Gabriela Cesar Ribeiro<sup>a</sup>; Ralf Poehland<sup>b</sup>; Bianka Drawert<sup>b</sup>; Beate Fuchs<sup>c</sup>; Christina Galuska<sup>c</sup>; Franziska Koch<sup>d</sup>; Érikliis Nogueira<sup>a</sup> Fabiana de Andrade Melo Sterza <sup>a,e</sup>

Correspondência

<sup>a</sup> CIVET, FAMEZ, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Reproductive Biology, Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany

<sup>c</sup> Core facility Metabolomics, Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany

<sup>d</sup> Metabolism Efficiency Unit, Institute of Nutrition Physiology, Research Institute for Farm Animal Biology, Dummerstorf, Germany

<sup>e</sup> PGZOO, State University of Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brazil

Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira (Corresponding Author)

### Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os mecanismos biológicos envolvidos no metabolismo lipídico de oócitos imaturos em resposta ao estresse térmico e restrição alimentar em vacas Holandesa. Para o estudo foram utilizadas 27 vacas leiteiras da raça Holandesa. Os animais permaneceram confinados em câmaras climáticas por sete dias, divididos em grupos da seguinte maneira: Controle (K) - com alimentação ad libitum e temperatura ambiente de 15°C (ITU = 60); Estresse térmico (HS) - com alimentação ad libitum e temperatura ambiente de 28°C (ITU = 76); Pair-feeding (PF) - receberam a mesma quantidade de alimento ingerida pelo grupo HS e temperatura ambiente de 15°C (ITU = 60). Após esse período foram abatidos para recuperação dos COCs (complexo cumulus oócitos). Além dos COCs foram utilizadas amostras de soro sanguíneo (SS) e fluido folicular (FF) para realização das seguintes análises: dosagem de TG e NEFAS (no SS), E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub> (SS e FF), avaliação do perfil lipídico (SS, FF, células do cumulus e oócitos), conteúdo lipídico e atividade mitocondrial, e a expressão de genes (células do cumulus e

oócitos). O estresse térmico não alterou a morfologia ovariana e a recuperação total de oócitos, mas alterou a taxa de viabilidade oocitária. Também reduziu tanto a quantidade de NEFAS no soro sanguíneo quanto, a quantidade de lipídeos no fluido folicular, células do cumulus e oócitos. Também ocasionou a menor expressão de genes relacionados com o controle de formação de gotas lipídicas, e estresse oxidativo, aliada com a regulação negativa de moléculas importantes para a formação de gotas lipídicas (TG), e constituição de membrana (PC), além de uma menor atividade mitocondrial, porém apresentou uma correlação positiva entre a atividade mitocondrial e conteúdo lipídico. Concluímos que as vias de resposta ao estresse térmico e nutricional são claramente diferentes. Foi demonstrado que o conteúdo lipídico e as alterações do perfil lipídico estão positivamente correlacionados com a viabilidade oocitária, fato respaldado pela menor concentração de estradiol no líquido folicular e soro sanguíneo, menor quantidade de TGs e PCs, menor quantidade de AG insaturados, menor atividade mitocondrial, maior expressão de genes relacionados a modificações epigenéticas ligadas a heterocromatina e menor expressão dos genes relacionados a esteroidogênese, a função mitocondrial, estresse oxidativo em amostras de animais HS.

Keywords: ácidos graxos, oogênese, estresse oxidativo, atividade mitocondrial em oócitos

## 1. Introdução

O estresse térmico altera não somente as vias de controle da termorregulação, mas também afeta inúmeros mecanismos que podem reduzir os índices reprodutivos em bovinos. Animais em estresse térmico reduzem a sua produção metabólica de calor e aumentam a capacidade de perda de calor através da pele para o ambiente, regulando assim a temperatura corporal (MCMANUS et al., 2020).

Paralelamente, o estresse térmico reduz a ingestão de alimentos e como consequência o ganho de peso, a produção de leite e eficiência reprodutiva também são reduzidos. Essas reduções são ainda mais drásticas quando se trata de

animais de alta produção, pois a correlação entre o efeito genético aditivo para produção com a termotolerância é negativa (FINOCCHIARO et al., 2005).

Os efeitos do estresse sobre o desempenho reprodutivo estão intimamente ligados à qualidade do oócito, uma vez que é nos oócitos que é produzida, pelas mitocôndrias, a maior parte de ATP que o futuro embrião vai utilizar para o seu desenvolvimento. O crescimento da população de mitocôndrias, que são consideradas “casa de força” é descontínuo, e ocorre muito rapidamente durante o crescimento oocitário, seguido de uma pausa da replicação mitocondrial durante as fases de clivagem até a fase de gástrula, quando a replicação é retomada (DUMOLLARD; DUCHEN; CARROLL, 2007). No entanto, os mecanismos que controlam o metabolismo energético em oócitos bovinos ainda não estão totalmente claros.

Estudar a função energética pode ajudar a entender o processo das vias metabólicas para controlar a qualidade dos oócitos e/ou folículos através do metabolismo lipídico. Acredita-se que as diferenças no perfil lipídico dos oócitos, ou seja, entre as classes lipídicas que o compõe, podem ser considerados biomarcadores da qualidade oocitária (CHEN et al., 2020). Considerando que há indícios de que a reserva de lipídios está relacionada à resposta ao estresse térmico (MAYA-SORIANO; TABERNER; LÓPEZ-BÉJAR, 2013), o estudo do metabolismo lipídico de oócitos bovinos de vacas leiteiras sob estresse térmico é um excelente modelo para esclarecer como a reserva lipídica está relacionada aos processos que levam à redução da competência oocitária sob condições de estresse (CHEN et al., 2020).

A atividade mitocondrial, tanto nos oócitos como nas células do cumulus, pode ser usada como referência para avaliar a qualidade do oócito, pois alterações na fisiologia das mitocôndrias durante a maturação podem levar a produção excessiva de ROS, e após alguns mecanismos sequentes desencadear a apoptose (NABENISHI et al., 2012).

Em bovinos a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo estão sendo associados a exposição a elevados níveis de ácidos graxos livres (MAREI et al., 2017). Porém, ainda há controvérsias a esse respeito, visto que estudos que utilizaram substâncias delipidantes durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos,

apresentaram resultados diferentes em relação a qualidade e criotolerância de oócitos/embriões, bem como da taxa de prenhez dos mesmos (GHANEM et al., 2014; HELD-HOELKER et al., 2017; TAKAHASHI et al., 2013; ZOLINI et al., 2019).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os mecanismos biológicos envolvidos no metabolismo lipídico de oócitos imaturos em resposta ao estresse térmico e restrição alimentar em vacas Holandesa.

## 2. Material e métodos

Para o estudo foram utilizadas 27 vacas leiteiras da raça Holandesa na 1<sup>a</sup> lactação ( $173 \pm 49$  dias com leite). Os grupos foram divididos da seguinte maneira: Controle (C) - com alimentação ad libitum e temperatura ambiente de 16°C em câmara climática (ITU = 60); Estresse térmico (HS) - com alimentação ad libitum e temperatura ambiente de 28°C em câmara climática (ITU = 76); Pair-feeding (PF) - receberam a mesma quantidade de alimento ingerida pelo grupo HS no dia anterior e temperatura ambiente de 16°C em câmara climática (ITU = 60). Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética animal do governo estadual em Mecklenburg-West, Alemanha, (LALLF MV/TSD/7221.3-1.1-60/19).

Inicialmente, os animais passaram por um período de adaptação de 6 dias a 15°C. Posteriormente, as câmaras climáticas foram ajustadas de acordo com a condição climática definida para cada grupo experimental por um período de 7 dias (Figura 1; Figura 2). Os animais do grupo PF passaram por todos os procedimentos experimentais (com exceção do período de adaptação) um dia após os outros, pois receberam a quantidade de alimento (kg/peso vivo) ingerida pelo animal submetido ao estresse térmico.



Em todas as coletas, durante o período experimental foram aferidos diariamente os parâmetros fisiológicos dos animais, bem como conferidos os dados climatológicos obtidos pelos relatórios das câmaras climáticas (figura 3).

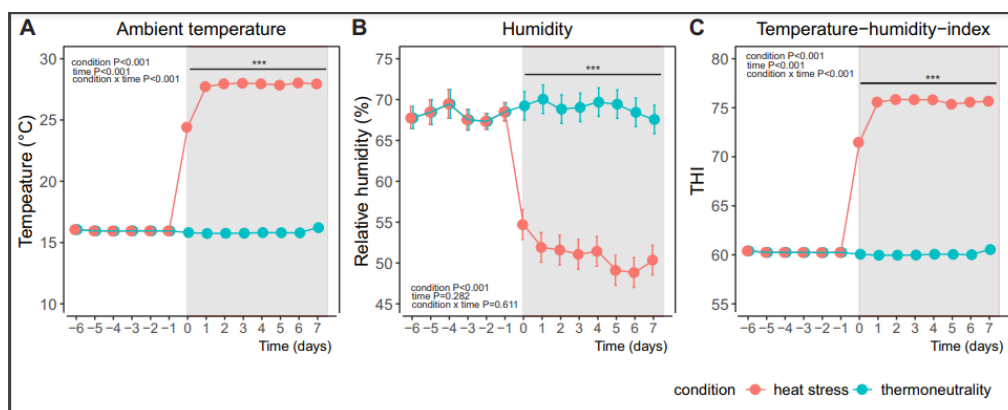


Figura 3 Média da temperatura ambiente, umidade e ITU ao longo do período experimental. Os dados foram obtidos a partir dos relatórios das câmaras climáticas.

Ao final de cada período experimental *in vivo* os animais foram abatidos no abatedouro do próprio instituto, onde foi realizada a coleta dos ovários. Os ovários foram transportados até o laboratório imediatamente após, em solução tampão fosfato (PBS), acrescido de penicilina e estreptomicina, à 36 °C.

Os ovários foram avaliados morfológicamente e a fase do ciclo estral foi classificada, (IRELAND; COULSON; MURPHREE, 1979), todos os animais analisados estavam em fase luteínica. Posteriormente foram aspirados aproximadamente 5 folículos por ovário para a coleta do líquido folicular dos folículos pequenos, para a análise hormonal e do perfil lipídico por espectrometria de massas (MS). A punção dos folículos foi feita com seringa de 5 mL e agulha 40 x 12 mm. Após a busca dos complexos cumulus oócitos (COCs), o líquido folicular dos folículos pequenos (2 a 8 mm) foi colocado imediatamente em -4 °C até a centrifugação (10 minutos, à 10 mil rpm, em temperatura ambiente) e o sobrenadante foi armazenado em tubo de 0,8 µl em freezer - 70 °C.

Para melhorar a recuperação de COCs, após a aspiração dos 5 folículos, foi realizado também o fatiamento individual dos ovários com lâmina de bisturi em placa de petri 110x15mm, técnica denominada de Slicing. Os fragmentos dos

ovários foram lavados com solução de dPBS e o conteúdo foi filtrado para a recuperação dos COCs. Foram classificados como viáveis os COCs com pelo 5 camadas compactas de células cumulus, citoplasma homogêneo e escuro e com tamanho compatível com a fase antral. A taxa de viabilidade oocitária foi determinada considerando os COCs viáveis em relação ao total, que inclui os desnudos, degenerados, muito pequenos e com células cumulus esparsas.

## 2.2 Análises

### 2.2.1 Atividade mitocondrial e conteúdo lipídico de oócitos

Os COCs foram desnudados em placas de 4 poços com solução de tripsina / EDTA (0,05% / 0,02% p/v em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ; Biochrom GmbH, Berlim, Alemanha) por meio de sucessivas pipetagens sob estereomicroscópico, até que os oócitos permanecessem com poucas células cumulus ao seu redor, para não prejudicar a coloração do oócito. Em seguida, os COCs foram lavados duas vezes em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco -094) + polivinilpirrolidona - PVA (0,3%) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) antes de serem submetidos ao protocolo de coloração. As mitocôndrias foram coradas com o corante ativo MitoTracker® Orange CMTMRos (Mitotracker Orange; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) em concentração final de 500nM em PBS + BSA (0,4 %) durante 40 min a 38,8 °C em 6% de  $\text{CO}_2$ . Este corante mostra uma forte sensibilidade ao potencial de membrana mitocondrial e afinidade para a proteína mitocondrial (grupos tiol) que exhibe alta retenção na organela devido à alta co-localização com citocromo C oxidase (POOT et al. 1996). Após a coloração com Mitotracker, os COCs foram transferidos para uma solução de PBS + BSA (0,4%) contendo 3 µg / mL do corante lipídico específico 4,4-difluoro 1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-díaza-s-indaceno (Bodipy 493/503; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) para corar gotículas lipídicas citoplasmáticas, solução na qual permaneceram por 10 min. a 38,8 °C em 6% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, as estruturas coradas foram lavadas 2 vezes em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e depois fixadas pelo menos 15 min em paraformaldeído - PAF (3%) e sacarose (2%). Após a fixação, as estruturas foram lavadas uma vez em PBS + PVA (0,3%) e duas vezes em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e então colocadas em lâminas de vidro com gotas de 2,5µg / mL-1 Hoechst 33342 (Sigma Chemical Co.,

St. Louis, MO, EUA) + glicerina / PBS. As gotas foram sobrepostas pela lamínula de modo a homogeneizar o conteúdo. Para evitar danos à morfologia de oócitos desenhou-se o formato da lamínula com silicone. As lâminas permaneceram incubadas à temperatura ambiente. As estruturas coradas foram analisadas com um microscópio confocal de varredura a laser (LSM 5 Pa) acoplado a um microscópio invertido Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). A intensidade de fluorescência (IF) foi quantificada usando o programa Image J 1.47 (versão 1.60\_65, Wayne Rasband; National Institutes of Health, Washington DC, USA). As regiões de interesse (ROIs) foram definidas em torno das estruturas coradas e quantificadas em pixels. A intensidade da fluorescência foi corrigida com o seguinte cálculo: intensidade corrigida = Densidade Integrada - (Área da célula selecionada X coloração média das leituras de background).

### 2.2.2 Expressão gênica

Os COCs foram desnudados em placas de 4 poços onde as células do cumulus (CC) foram completamente removidas por sucessivas pipetagens sob estereomicroscópio. Em seguida, os oócitos (Oo) e CC foram, separadamente, lavados duas vezes em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  + PVA (0,3%) e uma vez em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Em seguida as amostras eram colocadas em tubo RNAase free de 0,5 mL (Eppendorf) em um volume máximo de 5  $\mu\text{L}$ . Cada repetição continha 5 oócitos ou CC correspondentes a 5 COCs. Os tubos devidamente identificados foram colocados imediatamente em gelo seco e depois armazenados em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

Para a análise da expressão gênica, cada solução de amostra preparada consistia de 2,25  $\mu\text{L}$  cDNA (produtos pré-amplificados), 2,5  $\mu\text{L}$  de TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e 0,25  $\mu\text{L}$  de 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm); e a solução de ensaio foi 2,5  $\mu\text{L}$  de 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) e 2,5  $\mu\text{L}$  de 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm). O chip 96.96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm) foi utilizado para coletar os dados. Depois de preparado, o chip foi carregado com 5  $\mu\text{L}$  de cada solução de ensaio e 5  $\mu\text{L}$  de cada solução de amostra. O ciclo térmico do qPCR foi realizado no Biomark HD System (Fluidigm) utilizando o protocolo

TaqMan GE 96x96 Standard, que consistia em um estágio de Thermal Mix (50°C por 2 min, 70°C por 20 min e 25°C por 10 min) seguido de Hot Start (50°C por 2 min e 95°C por 10 min), seguido de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 s), anelamento e extensão do primer (60°C por 60 s).

Foram selecionados genes relacionados ao metabolismo lipídico, atividade mitocondrial e estresse oxidativo (anexo 1).

### 2.2.3 Cromatografia Líquida e espectrometria de massa (LC-MS)

Os COCs foram desnudados em placas de 4 poços onde as CC foram removidas por sucessivas pipetagens sob estereomicroscópio. Cada repetição era composta por 5 oócitos, ou CC correspondentes à 5 COCs. Os tubos devidamente identificados foram colocados imediatamente em gelo seco e depois armazenados em freezer a 70C negativos até o momento da análise.

Foram submetidos a essa análise também amostras de soro sanguíneo, líquido folicular dos folículos pequenos. LC-MS é capaz de identificar a maior parte das classes de lipídios conhecidas em uma matriz biológica. Foi utilizado o sistema de extração em uma fase para análise de lipídios baseado na mistura solvente de MeOH/MTBE/CHCl<sub>3</sub> (MMC). As amostras foram analisadas de acordo com os protocolos estabelecidos no FBN Core Facility Metabolomic. Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas antes de serem separadas para extração (GIL et al., 2018).

Para minimizar possíveis efeito da técnica, utilizamos uma alíquota de cada amostra biológica de cada grupo com um padrão interno (SPLASH LIPIDOMIX®). Às amostras de CC, de oócitos, soro sanguíneo e fluído folicular foram adicionados 3µl, 2,5 µl, 9 µl e 10 µl de padrão interno, respectivamente. O cálculo da quantidade corrigida das amostras foi calcula da seguinte maneira: média da área da molécula / média da área do padrão interno = valor quantitativo para cada molécula de lipídio em ng.

As camadas polares e apolares foram separadas e secas sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente e armazenadas até a análise. Após a reconstituição, a fase apolar e a fase polar foram analisadas no modo de ionização positiva e negativa por RP cromatografia líquida de alta performance e

espectrometria de massas em conjunto (UHPLC-MS/MS) (Vanquish UHPLC-System com ionização por eletrospray aquecida (HESI) QExactive mais espectrômetro de massa Orbitrap; Thermo Scientific, Waltham, EUA). A identificação e quantificação relativa de espécies lipídicas individuais foram realizadas em nível de produção (fragmentação MS/MS) usando o software LipidSearch (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), e a anotação metabólitos foi realizada usando o software Compound Discoverer 3.2 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### 2.2.4 Dosagem Hormonal e lipídios séricos

Amostras séricas e do fluido folicular foram submetidas a dosagem de progesterona ( $P_4$ ) e estradiol ( $E_2$ ), triglicerídeos e ácidos graxos não esterificados (NEFA). As amostras de plasma (EDTA) foram centrifugadas a 2.700 rpm por 20 min a 4°C. Soro e fluidos foram centrifugados imediatamente após a coleta e armazenados a -70 C até a análise.

As concentrações de  $E_2$  e  $P_4$  foram determinadas através da utilização de Kit RIA Beckman Counter. A análise foi realizada em microplaca de 96 poços, por meio da adição de 2 µL de soro e adicionados 200 µL do reagente. Após incubação da placa por 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 490nm em leitor de ELISA (HumareaderHS 16670). O ensaio foi realizado em duplicata. As concentrações de triglicerídeos e NEFA foram medidas com o analisador de química clínica ABX Pentra C400 (HORIBA Europe GmbH, Oberursel, Alemanha) usando o kit A11101-640 para triglicerídeos (HORBIA ABX SAS, Montpellier, França) e 434-94.795/346-91.995 para análise de NEFA (FujFilm Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, Alemanha).

#### 2.2.5 Estatística

Medições repetidas periodicamente no mesmo animal foram analisadas por ANOVA de medição repetida usando o procedimento MIXED de SAS (Versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Para temperatura ambiente, ITU e umidade, o modelo continha o tratamento de efeitos fixos (HS, C, PF), tempo (dia), bloco (1 a 9), e a interação tratamento x tempo; e DIM serviu como covariável. Medidas

repetidas no mesmo animal foram consideradas pela declaração repetida de proc MIXED (variável repetida: tempo) usando um tipo autorregressivo ou simetria composta (com base no menor AIC) para a matriz de covariância residual diagonal do bloco.

As características morfológicas dos ovários, os hormônios e lipídios do sangue, viabilidade oocitária, e conteúdo lipídico e atividade mitocondrial (imunofluorescência) foram analisados utilizando o modelo misto linear generalizado (GLIMMIX) procedimento com o pacote de software estatístico SAS ondemand versão acadêmica. Para a viabilidade, cada oócito foi considerado uma observação com resposta binária (0 = não viável, 1 = viável). Para a coloração de conteúdo lipídico e atividade mitocondrial, cada oócito foi considerado uma observação.

Para análise da expressão gênica, utilizou-se um gene housekeeping (GAPDH), determinado através do software BestKeeper (PFAFFL et al, 2004), as médias geométricas do housekeeping, foram calculadas e usadas para obter os valores delta Ct dos demais genes. Os efeitos do tratamento na expressão gênica foram determinados por análise de variância usando o modelo misto linear generalizado (GLIMMIX) do SAS ondemand versão acadêmica.

Para análise dos dados da LC-MS, utilizou-se o software MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Inicialmente realizou-se um Cluster Analysis através de HeatMap, para identificar as 20 moléculas mais diferentes significativamente, estas moléculas foram utilizadas para análise estatística multivariada, PCA. Outras análises estatísticas, com caráter exploratório foram realizadas usando o teste plot volcano que combina resultados da análise Fold Change (FC) e testes T em um único gráfico que permite selecionar recursos significativos com base na significância biológica, estatística ou em ambas. Para o PCA, ou plot volcano os dados foram previamente normalizados, utilizando um escalonamento automático.

Para todas as análises  $P < 0,05$  foi considerado como significativo.

### 3. Resultados

Quanto a presença das estruturas ovarianas, não sofreu variação entre os grupos analisados (tabela 1; figura 4).

Tabela 1 Características das estruturas de ovários de animais submetidos a estresse térmico ou restrição nutricional por sete dias.

|                   | CL                  | CA                | DF                | SF                    |
|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| HS (n=8)          | 0,875 ( $\pm 1,0$ ) | 1,3 ( $\pm 1,2$ ) | 1,5 ( $\pm 0,5$ ) | 50,25 ( $\pm 42,2$ )  |
| PF (n=8)          | 1,0 ( $\pm 0,5$ )   | 1,9 ( $\pm 1,2$ ) | 1,5 ( $\pm 0,9$ ) | 38,875 ( $\pm 16,3$ ) |
| C (n=7)           | 1,4 ( $\pm 0,5$ )   | 1,0 ( $\pm 0,6$ ) | 2,1 ( $\pm 0,8$ ) | 31,3 ( $\pm 21,6$ )   |
| <b>Valor de P</b> | 0,3313              | 0,2701            | 0,1826            | 0,4653                |

CL: corpo lúteo; CA: Corpo albicans; DF: Folículo dominante; SF: Folículos pequenos; HS: animais submetidos a estresse térmico; PF animais submetidos a estresse nutricional; K: animais sem estresse.

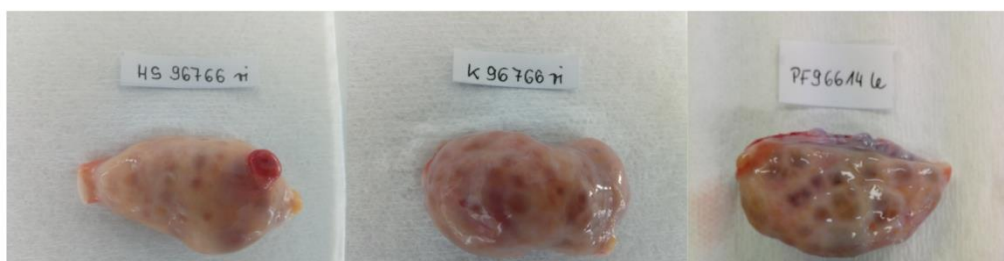


Figura 4 Ovários de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico e nutricional. HS: animais submetidos a estresse térmico; PF animais submetidos a estresse nutricional; C

: animais sem estresse.

Não houve diferença entre os grupos, quanto a quantidade de COCs total recuperados, mas houve diferença na viabilidade dos mesmos, de acordo com a sua morfologia. O estresse térmico levou a uma menor porcentagem de oócitos viáveis (tabela 2).

Tabela 2 Recuperação total e viabilidade de oócitos de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico ou restrição nutricional

|            | Média da recuperação<br>total de oócitos (erro<br>padrão) | Viabilidade dos<br>oócitos (%) |
|------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------|
| HS (n=605) | 75,6 (17,07)                                              | 53% (301/605) a                |
| PF (n=410) | 55,3 (17,07)                                              | 59% (242/410) b                |
| C (n=443)  | 68,3 (18,25)                                              | 54% (241/443) ab               |
| Valor de P | 0,6744                                                    | 0,0142                         |

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ). HS: animais submetidos a estresse térmico; PF animais submetidos a estresse nutricional; K: animais sem estresse.

No plasma sanguíneo (todos os animais avaliados estavam em fase lútea), o E<sub>2</sub> apresentou uma concentração menor nos animais que sofreram o estresse térmico, comparado aos demais grupos, por outro lado, a progesterona não diferiu entre os grupos. Este padrão se repetiu no fluido folicular (folículos pequenos) (tabela 3).

Tabela 3 Níveis de Estradiol e Progesterona em amostras de soro sanguíneo e fluido folicular de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou estresse nutricional

| Grupo      | Fluido folicular    |                     | Soro Sanguíneo      |                     |
|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|            | P <sub>4</sub> (EP) | E <sub>2</sub> (EP) | P <sub>4</sub> (EP) | E <sub>2</sub> (EP) |
| HS (n=21)  | 189,1 (45,5)        | 43,6 (60,9) b       | 4,38(1,54)          | 7,3(1,59) b         |
| PF (n=19)  | 182,8 (47,8)        | 79 (64) ab          | 4,93(1,67)          | 14,18(1,71) a       |
| C (n=18)   | 254,6 (49,1)        | 267,8 (65) a        | 4,55(2,04)          | 10,7(2,10) ab       |
| Valor de P | 0,511               | 0,037               | 0,97                | 0,04                |

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) HS: Animais em estresse térmico; C: animais grupo controle; PF: Animais do grupo Pair-feeding. P<sub>4</sub>: Progesterona (ng/mol); E<sub>2</sub>: Estradiol (pg/mol); EP: erro padrão.

O estresse, térmico ou nutricional aumentou os níveis de triglicerídeos no sangue dos animais em relação ao tratamento controle, mas apenas o tratamento PF apresentou maiores níveis de NEFAs (ácidos graxos livres não esterificados)

plasmáticos em relação aos demais tratamentos (tabela 4). No grupo HS foi observada correlação positiva entre a quantidade de TG e NEFA, o que indica que o estresse por calor pode modificar a composição química dos lipídios.

Tabela 4 Concentração de TG e NEFAs no plasma sanguíneo de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou restrição alimentar por sete dias.

|                   | TG -mmol/L<br>(erro padrão) | NEFA ( $\mu$ mol/L- (erro<br>padrão) | Correlação<br>Pearson TG/NEFA<br>(p-value) |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------|
| HS (N=8)          | 0,16 (0.019) ab             | 230.00 (50.2540) b                   | 0.71908 (0.044)                            |
| PF (n=8)          | 0,18 (0.015) a              | 500.83 (58.0284) a                   | 0.54408 (0.2644)                           |
| C (n=5)           | 0,11 (0.017) b              | 140.60 (63.5669) b                   | 0.85394 (0.0655)                           |
| <b>Valor de P</b> | 0.0293                      | 0.0015                               |                                            |

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A fim de procurar o painel lipídico discriminante do lipidoma do oócito e células do cumulus, de forma separada, empregamos o HeatMap e o PCA (figura 5). É possível observar que há uma maior distância entre os grupos de HS comparado ao PF.

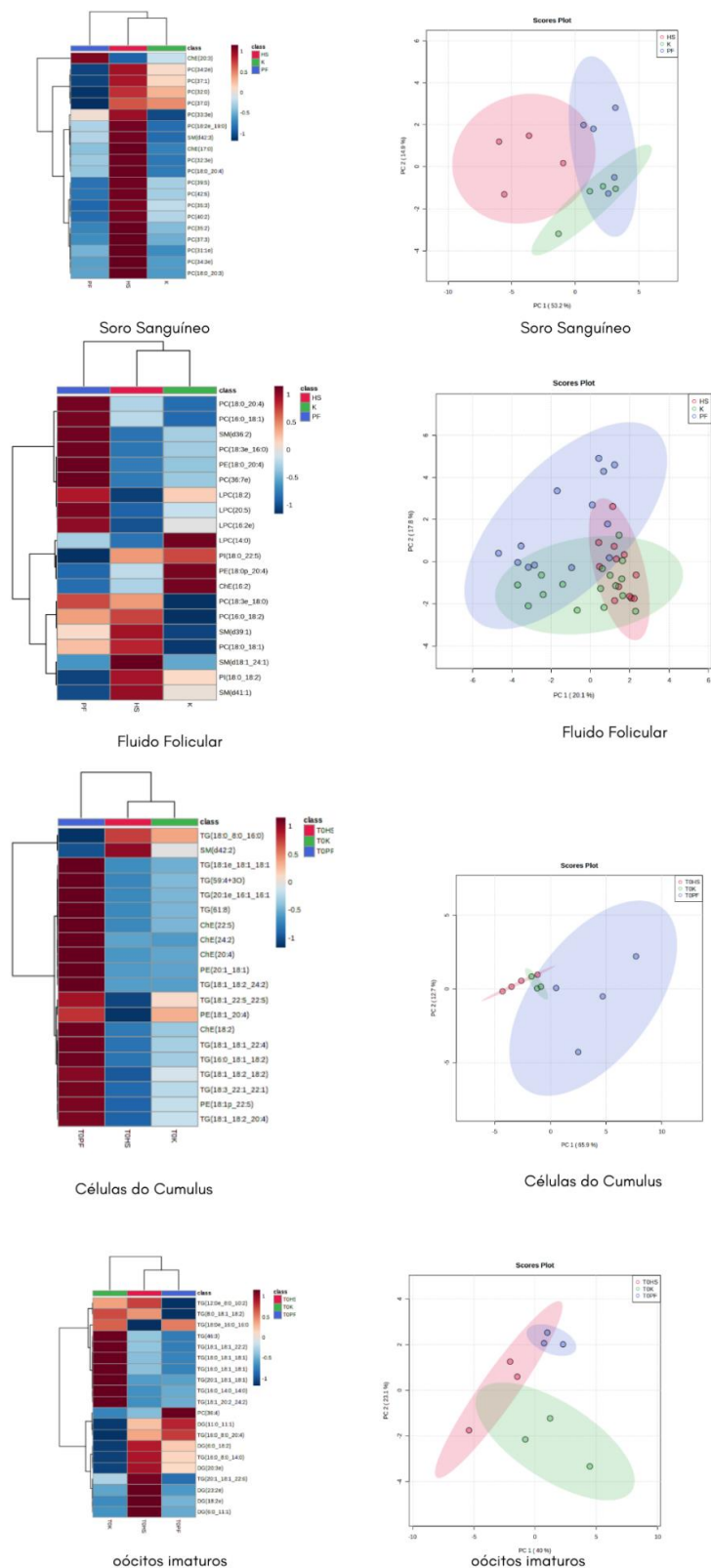


Figura 5 PaineL Lipídico discriminante de amostras de soro sanguíneo, flúido folicular, células do cumulus e oócitos de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou restrição alimentar por sete dias. A esquerda gráficos de Heatmap (Cores das colunas; verde: grupo controle, vermelho: heat

stress; azul: *Pair-feeding*) e a direita gráficos discriminantes de PCA (Cores das bolhas verde: grupo controle, vermelho: heat stress; azul: *Pair-feeding*).

Para uma análise mais detalhada das moléculas lipídicas, adotamos então as comparações apenas entre os grupos HS e PF, através da análise de Plot volcano. As moléculas (picos) diferencialmente abundantes entre os grupos estão descritas na tabela 5. Podemos notar que nas células do cumulus foi detectada a maior quantidade de moléculas lipídicas.

Tabela 5 Detecção e análise diferencial de lipídios nas células e fluidos foliculares e plasma sanguíneo de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico e restrição alimentar por sete dias.

| Compartimento<br>Folicular | Número de<br>moléculas<br>detectados | Moléculas<br>diferencialmente<br>abundantes, n | Tipos de regulação em<br>HS |                             |
|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                            |                                      |                                                | Up-<br>Regulate<br>d (n)    | Down-<br>Regulated<br>( n ) |
| Oócitos                    | 260                                  | 65                                             | 24                          | 41                          |
| Células cumulus            | 508                                  | 170                                            | 72                          | 98                          |
| Fluido Folicular           | 437                                  | 119                                            | 69                          | 50                          |
| Soro sanguíneo             | 407                                  | 66                                             | 15                          | 51                          |

HS: animais expostos ao estresse térmico; As diferenças significativas entre as abundâncias de moléculas, tanto quanto ao tipo de regulação (up ou down regulated) foram verificados pelo Plot volcano FC:2.0 e Tukey:0.5; \*segundo o teste de volcano os resultados de PF, quanto aos tipos de regulação são exatamente opostos ao de HS, aqui apresentados.

Algumas moléculas que se diferiram entre os tratamentos (HS x PF) em um compartimento folicular específico, apresentaram o mesmo comportamento nos demais compartimentos, por exemplo: o ester de colesterol (ChE 18:2) e a esfingomielina (SM d34:1) estavam down-regulated (no grupo HS) tanto no sangue, quanto do fluído folicular, nas células do cumulus e nos oócitos, estas foram as únicas moléculas presentes em mais de dois compartimentos. Outras semelhanças, podem ser observadas na tabela 7.

O éster de colesterol (ChE 18:2) e a esfingomielina (SM d34:1) apresentaram-se diferentemente abundantes entre HS e PF no sangue, nas células

do cumulus e nos oócitos e estavam down-regulated (no grupo HS). Outras semelhanças, podem ser observadas na tabela 6.

Tabela 6 Moléculas lipídicas com o mesmo comportamento em células cumulus, fluidos foliculares e/ou soro sanguíneo de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou estresse nutricional

| Moléculas Lipídicas | Soro sanguíneo | Fluido Folicular | Células Cumulus | Oócitos |
|---------------------|----------------|------------------|-----------------|---------|
| ChE(18:2)           | ↓              |                  | ↓               | ↓       |
| DG(18:0_20:0)       | ↓              | ↓                |                 |         |
| ChE(18:1)           | ↓              |                  | ↓               |         |
| SM(d34:1)           | ↓              |                  | ↓               | ↓       |
| DG(18:0_16:0)       | ↓              |                  | ↓               |         |
| ChE(18:3)           | ↓              |                  | ↓               |         |
| ChE(22:5)           | ↓              |                  | ↓               |         |
| TG(16:1_14:0_16:1)  | ↑              | ↓                |                 |         |
| TG(15:0_16:0_18:1)  | ↑              |                  |                 | ↓       |
| TG(16:0_14:0_14:0)  | ↑              |                  | ↑               |         |
| TG(18:1_18:2_18:2)  | ↑              |                  | ↓               |         |
| TG(16:1_14:0_14:0)  | ↑              |                  |                 | ↓       |
| TG(18:0_18:1_18:1)  |                | ↓                | ↓               |         |
| TG(18:1_18:1_18:1)  |                | ↓                | ↓               |         |
| TG(18:1_17:1_18:1)  |                | ↓                | ↓               |         |
| TG(18:1_20:2_22:4)  |                |                  | ↓               | ↓       |
| TG(18:1e_18:1_18:1) |                |                  | ↓               | ↓       |
| TG(20:1_18:1_18:1)  |                |                  | ↓               | ↓       |
| TG(25:0_14:0_16:1)  |                |                  | ↓               | ↓       |
| TG(17:0_18:1_22:4)  |                |                  | ↓               | ↓       |

Setas ↑: up-regulated; setas ↓: down-regulated. Os tipos de regulação apresentados na tabela referem-se ao grupo HS. \*Segundo o teste de volcano os resultados de PF, quanto aos tipos de regulação são exatamente opostos ao de HS.

A variação das classes lipídicas e seus tipos de regulação (up ou down regulated) no perfil lipídico do soro sanguíneo, no fluido folicular, células do cumulus e oócitos de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou restrição alimentar está descrita na tabela 7.

Tabela 7 Classes de lipídios que mais sofreram alterações, em células foliculares e soro sanguíneo de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou estresse nutricional.

| Classe lipídica | Soro Sanguíneo | Fluido Folicular | Células do Cumulus | Oócitos       |
|-----------------|----------------|------------------|--------------------|---------------|
| ChE             | 20% (13↓ 0↑)   | 3% (0↓ 3↑)       | 5% (8↓ 0↑)         | 2% (1↓ 0↑)    |
| DG              | 3% (2↓ 0↑)     | 4% (4↓ 1↑)       | 16% (2↓ 25↑)       | 14% (4↓ 5↑)   |
| PC              | 30% (15↓ 5↑)   | 30% (5↓ 31↑)     | 7% (8↓ 4↑)         | 11% (7↓ 0↑)   |
| SM              | 15% (10↓ 0↑)   | 11% (0↓ 13↑)     | 2% (2↓ 1↑)         | 2% (1↓ 0↑)    |
| TG              | 32% (11↓ 10↑)  | 18% (10↓ 11↑)    | 66% (70↓ 42↑)      | 71% (27↓ 19↑) |
| LPC             | -              | 24% (29↓ 0↑)     | -                  | -             |
| PS              | -              | -                | 1% (1↓ 0↑)         | -             |
| PI              |                | 7% (0↓ 8↑)       |                    |               |
| PE              | -              | 3% (2↓ 2↑)       | 4% (7↓ 0↑)         | 2% (1↓ 0↑)    |

Setas para cima: up-regulated; setas para baixo: down-regulated. Os tipos de regulação apresentados na tabela referem-se ao grupo HS. \*Segundo o teste de volcano os resultados de PF, quanto aos tipos de regulação são exatamente opostos ao de HS.

Alguns ácidos graxos (AGs) foram investigados em lipídios que se diferiam entre os grupos HS e PF, considerando o comportamento desses AGs em oócitos normais e em degeneração, como anteriormente descrito por CHEN et al., 2020. A maioria dos AGs analisados em oócitos e células do cumulus apresentaram-se reduzidos no grupo HS, exceto para 14:1, que nos oócitos estava up-regulated, e 16:2 que estava up-regulated nas células do cumulus (figura 6).

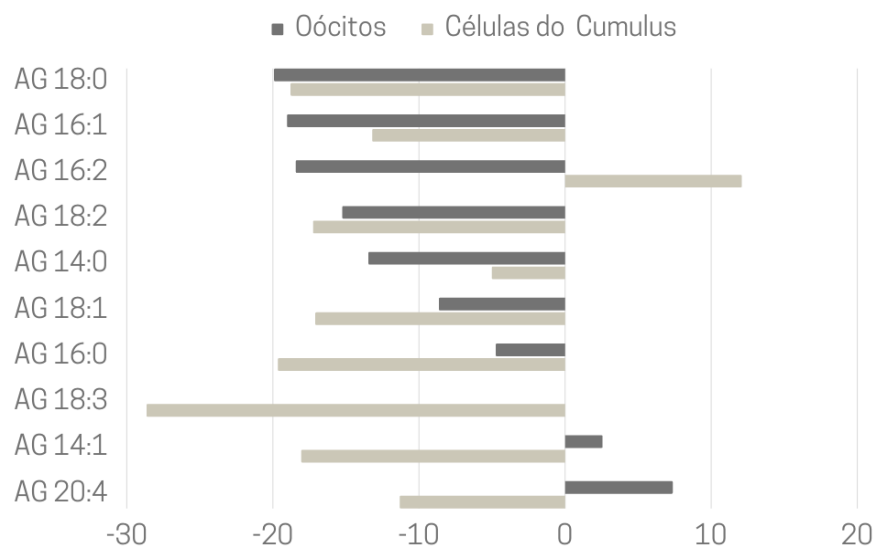


Figura 6 Comportamento de ácidos graxos de oócitos e células cumulus em moléculas lipídicas que apresentaram regulação diferente em vacas leiteiras dos grupos HS e PF. 0= indiferente; >0 upregulated <0 downregulated.

Segundo a análise de fluorescência, todos os grupos se diferem entre si, tanto em oócitos quanto em células do cumulus. O grupo C apresenta a maior atividade mitocondrial e maior conteúdo lipídico, seguido do grupo PF e grupo HS (tabela 9). Nos oócitos há uma forte correlação positiva entre a atividade mitocondrial e conteúdo lipídico no grupo HS, e no grupo PF uma correlação fraca e negativa entre as variáveis (tabela 8; figura 7). Deste modo, podemos supor que o estresse por calor aciona vias metabólicas diferentes das vias do estresse nutricional.

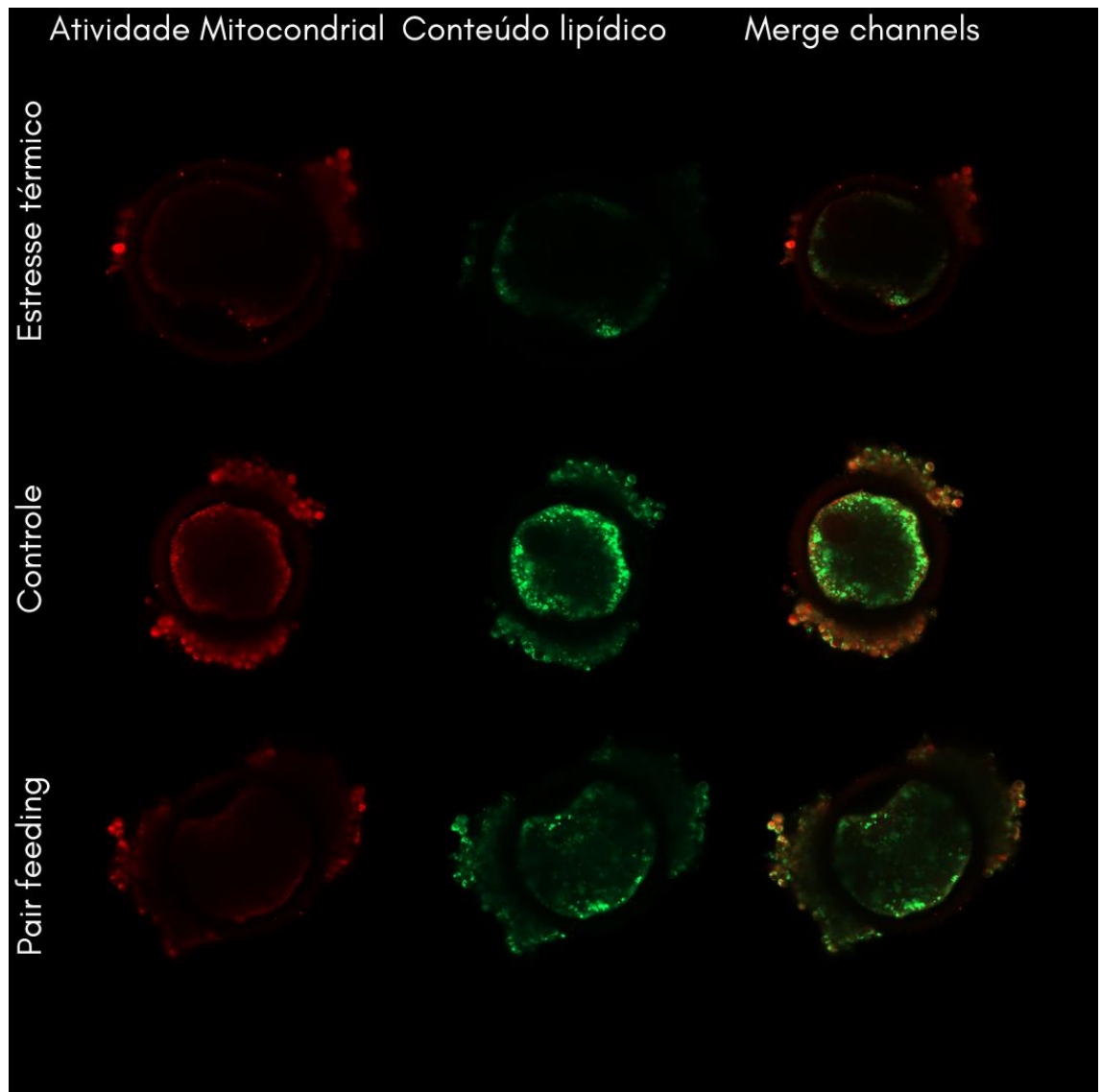


Figura 7 Conteúdo lipídico e atividade mitocondrial em oócitos imaturos de vacas leiteiras. Corante para atividade mitocondrial (vermelho): Mitotracker®. Corante para conteúdo lipídico (verde): Bodipy®

Tabela 8 Correlação entre a atividade mitocondrial e conteúdo lipídico de oócitos e células do cumulus de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou restrição alimentar por sete dias em câmara climática.

| Grupo           | Estimativa<br>Atividade<br>Mitocondrial<br>(erro padrão) | Estimativa<br>Conteúdo<br>lipídico (erro<br>padrão) | Correlação entre<br>atividade<br>mitocondrial e<br>conteúdo lipídico<br>(valor P) |
|-----------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| C (n=36) (Oo)   | 18,4 (0.1) a                                             | 19,2 (0.09) a                                       | 0,1 (0.3)                                                                         |
| PF (n=42) (Oo)  | 17,6 (0.1) b                                             | 18,2 (0.09) b                                       | -0,09 (0.5)                                                                       |
| HS (n=12) (Oo)  | 12,8 (0.2) c                                             | 12,1 (0.1) c                                        | 0.93 (<.0001)                                                                     |
| C(n=432) (cc)   | 13.96 (0.036) a                                          | 13.77(0.041) a                                      | 0.75 (<.0001)                                                                     |
| PF (n=379) (cc) | 13.73 (0.039) b                                          | 13.33 (0.044) b                                     | 0.34 (<.0001)                                                                     |
| HS (n=69) (cc)  | 8.33 (0.091)c                                            | 6.28(0.10) c                                        | 0.75 (<.0001)                                                                     |

Oo= oócitos; cc= células do cumulus. Letras minúsculas na mesma coluna indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey  $P < 0,05$ . As correlações foram testadas dentro dos grupos de forma individual, aceita-se correlação positiva quando  $P < 0,05$ . C: grupo de animais controle; PF: grupo de animais em restrição alimentar, ou pair feeding; HS: grupo de animais expostos ao estresse térmico.

Os genes que se apresentaram diferentemente expressos entre os grupos HS e PF estão representados na figura 8. O comportamento de todos os genes avaliados, está descrito nos anexos 2 (oócitos) e 3 (células do cumulus).

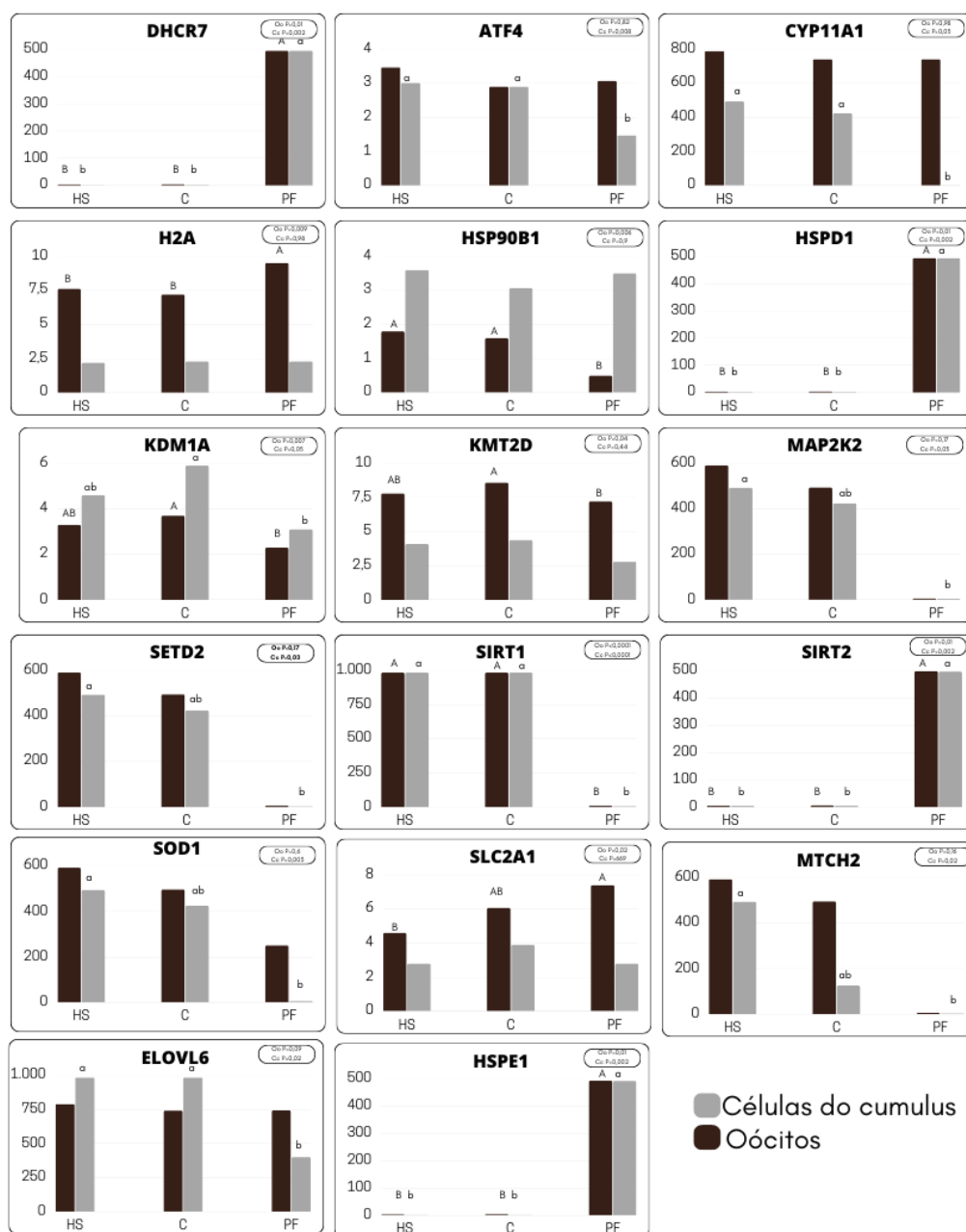


Figura 8 Expressão de genes em oócitos imaturos de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico (HS) ou restrição alimentar (PF) por sete dias. C grupo controle; Oo: oócitos; Cc: Células do Cumulus (Tukey  $P < 0,05$ );

#### 4. Discussão

No presente estudo verificou-se que o HS menor qualidade dos COCs, segundo as características morfológicas do ooplasma e das células cumulus. Nossa hipótese de que tais danos estão intimamente relacionados ao metabolismo lipídico

foi confirmada neste estudo. A importância da reserva de lipídios em oócitos bovinos é conhecida, visto que é uma das espécies que apresenta maior acúmulo lipídico em seu ooplasma, fato que justifica a coloração mais escura de oócitos bovinos em relação a outras espécies, como o humano e o camundongo (NAGANO, 2018). A alteração do conteúdo lipídico e consequentemente da coloração do ooplasma também ocorre intra espécie, como observado em *Bos taurus* e *Bos indicus* e sua relação com a qualidade da oócito já foi postulada (NAGANO, 2018).

No presente estudo, a expressão de H2A, foi inferior em oócitos do grupo HS quando comparado aos PF, a expressão deste gene é importante para a competência e desenvolvimento oocitário (CAIXETA et al., 2009). Adicionalmente, foi observado que nas células cumulus, SETD2 está mais expressa em HS comparado ao PF, SETD2 se expressa mais em oócitos transcricionalmente ativos, ou seja, quando há uma menor condensação da cromatina, e é mediador da H3K36me3 (SHAO et al., 2022). Uma vez que os oócitos aspirados de folículos pequenos devem estar em quiescência (BROCHADO SOUZA-CÁCERES; DE; MELO-STERZA, 2017) e portanto com a cromatina altamente condensada, espera-se menor expressão de SETD2 em oócitos competentes. Sua menor expressão em oócitos HS, corrobora com a menor competência dos COCs desse grupo.,

As concentrações séricas de E<sub>2</sub> foram inferiores nos animais HS, essa redução está ligada a uma redução da disponibilidade de Colesterol, que é o precursor dos esteroides (YAMASHITA et al., 2003). Nesse estudo 20% das moléculas lipídicas presentes no soro sanguíneo e que se diferenciaram entre os grupos PF e HS, pertenciam a classe ChE (éster de colesterol), e estavam down-regulated nas amostras de soro sanguíneo e nas células do cumulus de animais do grupo HS. Corroborando com estas informações, observamos que tanto nas células cumulus, local onde é produzido parte dos hormônios esteroides, quanto nos oócitos (HS), houve uma menor expressão de 7-desidrocolesterol redutase (DHCR7), gene responsável por converter o 7-desidrocolesterol em colesterol (YAMASHITA et al., 2003).

Para a formação dos hormônios, o colesterol deve ir para a membrana mitocondrial interna via proteína reguladora aguda esteroidogênica (STAR), o qual é clivado pela enzima CYP11A1 em pregnenolona (P5) e posteriormente em progesterona (P4) (KARMAN et al., 2012). Nossos resultados demonstraram que a referida via foi parcialmente afetada, pois, embora tenha ocorrido um aumento da Expressão de CYP11A1 nas células do cumulus de animais HS comparados a animais PF, as concentrações de P4 no fluido folicular não variaram entre os grupos., .

O grupo HS apresentou menor concentração sérica de NEFAs comparado ao grupo PF. Já foi demonstrado, que os NEFAs são liberados na circulação especialmente em condições de balanço energético negativo, facilitando assim o transporte dos ácidos graxos da circulação para os tecidos (WHEELLOCK et al., 2010). Apesar de HS e PF estarem em balanço energético negativo, ingerindo igualmente menor quantidade de alimento que a demanda, a resposta ao estresse adicional de calor alterou as vias metabólicas dos lipídios.

No presente estudo foi demonstrado ainda que, o estresse térmico promove alteração do perfil de ácidos graxos de oócitos, compatível com uma maior chance de degeneração destas células. Foi demonstrado que oócitos e células do cumulus do grupo HS, apresentaram menor conteúdo lipídico comparado aos demais grupos, e o perfil lipídico de células do cumulus (66%) e dos oócitos (71%), eram compostos por TGs, estando a maioria deles down-regulada nos animais HS. Um estudo anterior demonstrou que inibir o metabolismo de TGs *in vitro* e impedir que os ácidos graxos entrem nas mitocôndrias para  $\beta$ -oxidação leva a uma queda na viabilidade de oócitos de fêmeas bovinas e suínas (STURMEY et al., 2009). Adicionalmente, Chen et al (2020) descreveram o perfil lipídico de oócitos viáveis e em degeneração. Os autores consideraram os TGs como biomarcadores de qualidade, pois estes portam uma das maiores fontes de energia para o desenvolvimento celular e são os lipídios de maior representação nas gotas lipídicas, de maneira que, oócitos em processo de degeneração possuem menor teor de TG (CHEN et al., 2020), corroborando com a menor qualidade dos oócitos submetidos ao estresse térmico no presente estudo.

Além de reduzir a quantidade geral de TGs, os animais HS possuíam menos ácidos graxos importantes para a qualidade oocitária, comparados aos animais PF. Os ácidos graxos 18:1 e 18:2, 16:2, 16:0 e 14:0 estavam down-regulated em oócitos e células do cumulus HS. Nas células do cumulus, esta redução ocorreu, mesmo com o aumento da expressão do ELOVL6 nos animais HS. A expressão deste gene é responsável pelo alongamento das cadeias 16:0 (ácido palmítico) e 16:1 (ácido palmitoleico) (WANG et al., 2006). Aardema et al. (2013) demonstraram que o ácido oleico (18:1) exerceu um efeito positivo no armazenamento de lipídios (AARDEMA et al., 2013). Chen et al. (2020), comparando oócitos normais e degenerados, também observaram que em oócitos normais os ácidos graxos 18:1 e 18:2 estavam em maiores proporções, e em contrapartida, os ácidos graxos 18:0, 16:2, 16:0 e 14:0 em cadeias de triglicerídeos estão em menores proporções em oócitos degenerados (CHEN et al., 2020).

Em Oo e CC no grupo HS, o estresse térmico também pode afetar negativamente a funcionalidade da membrana dos oócitos e células cumulus, visto que 80% dos fosfolipídios das células do cumulus (PC (fosfatidilcolina), PS (fosfatidilserina) e PE (fosfatidiletanolamina)) e 100% dos fosfolipídios dos oócitos (PC e PE) estavam down-regulated no grupo HS, tais lipídios integram as membranas funcionais e atuam como importantes mensageiros químicos (HORN; JAISWAL, 2019). Adicionalmente, observou-se nos animais HS menor expressão do SLC2A1 (oócitos), gene que auxilia no transporte da glicose e frutose pela membrana (LAMAS-TORANZO; PERICUESTA; BERMEJO-ÁLVAREZ, 2018), e menor expressão de MAP2K2 (células do cumulus), gene mediador da ação da insulina sobre a glicólise, que é uma das atividades mitocondriais (LAMAS-TORANZO; PERICUESTA; BERMEJO-ÁLVAREZ, 2018). Uma falha nesta comunicação pode reduzir a produção de energia da célula.

Observamos que apenas o tratamento HS apresentou uma correlação positiva entre a atividade das mitocôndrias e o conteúdo dos lipídios. Outra observação importante é o fato da expressão de MTCH2 estar aumentada nas células do cumulus dos animais HS comparados ao grupo PF. A expressão de MTCH2 participa da homeostase lipogênica e em caso de falta de nutrientes tem ação citoprotetora. MTCH2 monitora a via de lipogênese e transmite as informações

para a maquinaria de fusão mitocondrial para promover o alongamento das mitocôndrias, maior produção de energia e sobrevivência celular sob condições de fome (LABBÉ et al., 2021). O aumento da expressão de MTCH2 pode aumentar a reserva de lipídeos (BAR-LEV et al., 2016; ROTTIERS et al., 2017). A correlação positiva entre a atividade mitocondrial e conteúdo lipídico do presente estudo, sugerem uma mudança de prioridade entre as funções mitocondriais, uma vez que as mitocôndrias exercem controle tanto na peroxidação lipídica, como na apoptose (DUCHEN, 2004), desta maneira possivelmente a atividade mitocondrial, não está consumindo lipídios para efetuar outras funções, em resposta às condições de estresse térmico.

Com base no observado no presente estudo, sugerimos que em situações de estresse térmico, o estresse oxidativo pode estar ocorrendo, não porque acontece o acúmulo de lipídios, mas sim porque não estão sendo consumidos pelas mitocôndrias de forma equilibrada. Sugestão sustentada, com os resultados de estudos recentes, que mostram que a suplementação de MitoQ (antioxidante direcionado a mitocôndria), no meio de cultivo, melhorou a taxa de blastocistos provenientes de oócitos em estresse oxidativo (LAMAS-TORANZO; PERICUESTA; BERMEJO-ÁLVAREZ, 2018).

Os animais HS do presente estudo, provavelmente estavam com menor oxigenação nos ovários, e este cenário pode ter estimulado a mudança de prioridade das atividades mitocondriais, por isso a correlação positiva entre conteúdo lipídico e atividade mitocondrial. É sabido que as próprias mitocôndrias podem ser grandes consumidoras de ATP, em ambientes com pouca oxigenação e fluxo sanguíneo (DUCHEN, 2004) e o estresse por calor pode contribuir para essa baixa oxigenação, pois uma das estratégias para o controle da temperatura corporal, em situações de calor, é a redistribuição de sangue para a pele, e para os músculos envolvidos na atividade respiratória, o que reduz o fluxo de sangue para os órgãos internos, como os reprodutivos. Por exemplo, em condições de estresse térmico, o fluxo de sangue nos ovários reduz de 20 a 30% durante o estresse térmico, enquanto na região da vulva (região mais externa) aumenta 40% (ROCHA et al., 2012), desta maneira, há menor disponibilidade de oxigênio para as funções reprodutivas em órgãos internos.

A expressão de SOD1 foi maior nos animais HS, comparados aos animais PF, a ação deste gene está na linha de frente para o combate às ROS. As SODs são bem conhecidas por mediar a dissociação dos radicais superóxido em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (KHAN et al., 2021). Esse resultado demonstra havia demanda do grupo HS para combater o estresse oxidativo.

O grupo HS apresentou maior expressão de HSP90B1 (oócitos), comparado ao grupo PF. Esse gene age no retículo endoplasmático (RE), onde numerosas proteínas se movem e exigem duplicação controlada, caso ocorra um acúmulo inadequado dessas proteínas ocorre estresse do RE, desencadeando a ação das UPRs (unfolded protein response). Apesar das UPRs serem acionadas para controlar o estresse de RE, se em excesso podem acelerar o processo de apoptose (RON; WALTER, 2007). Paralelamente à HSP90B1, a expressão de ATF4 também está aumentada no grupo HS em comparação ao grupo PF. ATF4 desempenha um papel crucial na adaptação ao estresse, regulando a transcrição de muitos genes (B'CHIR et al., 2013), garante o fornecimento de aminoácidos para a biossíntese de proteínas e glutatona e protege as células contra o estresse oxidativo. A ativação dessa resposta integrada ao estresse demonstrou ter um papel especial na adaptação das células às consequências metabólicas da atividade do RE (HARDING et al., 2003).

Por outro lado a expressão de genes (HSPD1 e HSPE1) marcadores relacionados a UPRmt (mitochondrial unfolded protein response) foi menor nos oócitos de animais HS, comparados a animais PF. Da mesma forma que as UPR do RE, de acordo com o nível de estresse, as UPRmt podem intermediar a sobrevivência celular ou induzir a apoptose (MAREI et al, 2019), Já foi demonstrado que a deleção do UPRmt resulta em infertilidade feminina, com comprometimento da maturação do oócito e primeira clivagem (SELI; WANG; HORVATH, 2019), portanto acredita-se que a redução da expressão desse gene também esteja relacionada à menor qualidade dos COCs provenientes de vacas em estresse térmico.

As sirtuínas (SIRT 1 e SIRT 2) apresentaram comportamento similar entre oócitos e células do cumulus. A atividade dessas enzimas depende da relação  $NAD^+ / NADH$ , agindo como uma espécie de sensor do estado energético celular,

promovendo a adaptação celular, via regulação das funções mitocondriais e nucleares através de mecanismos epigenéticos (desacetilação de histonas) e não epigenéticos (citoesqueleto e/ou proteínas reguladoras) (TATONE et al., 2018). A Sirt 2, que está localizada no citoplasma controlando a dinâmica do citoesqueleto (NORTH et al., 2014), apresentou menor expressão no grupo HS em comparação ao grupo PF. Por outro lado, a Sirt 1 localiza-se no núcleo, e é responsável por regular o ciclo celular e a proliferação, reparo de DNA, remodelamento da cromatina e a função mitocondrial (FERREIRA et al., 2022). A Sirt 1 apresentou maior expressão no tratamento HS em comparação ao grupo PF (em Oo e CC). Este resultado sugere, que após 7 dias de estresse térmico, a dinâmica do citoesqueleto pode ser prejudicada no citoplasma do oócito, no entanto, ainda há mecanismos de defesa tentando reorganizar a cromatina, para proteger o seu material nuclear.

KDM1A (oócitos e células do cumulus) e KMT2D (oócitos) não apresentaram modificações entre o grupo HS e os demais, porém diferenciou entre os grupos PF e controle. KMT2D é uma importante mono-metiltransferase H3K4 de mamífero (FROIMCHUK; JANG; GE, 2017), e KDM1A atua na desmetilação de H3K9 (MAES et al., 2018; METZGER et al., 2005). A metilação de H3K4 e a desmetilação da H3K9 estão correlacionadas com a ativação da transcrição, indicando a possibilidade de que o estresse por restrição alimentar pode estar associado com o envelhecimento precoce dos oócitos, pois provavelmente está permitindo transcrições de genes antes do processo de maturação oocitária.

## 5. Conclusões

A redução da qualidade dos COCs em função do estresse térmico está intimamente relacionada com o metabolismo lipídico, visto que houve redução do conteúdo lipídico, especialmente de TGs, e alteração do perfil lipídico, com redução dos ácidos graxos oleico e linolênico. A redução de ésteres de colesterol culminou com a redução das concentrações de estradiol e a variação da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, atividade mitocondrial e estresse oxidativo reforçaram a importância dos lipídios para a manutenção da competência oocitária.

## 5. Referências

- AARDEMA, H. et al. Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. **Biology of reproduction**, v. 88, n. 6, 2013.
- BAR-LEV, Y. et al. Mimp/Mtch2, an obesity susceptibility gene, induces alteration of fatty acid metabolism in transgenic mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.
- B'CHIR, W. et al. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 16, 2013.
- BROCHADO SOUZA-CÁCERES, M.; DE, F.; MELO-STERZA, A. Metilação de histonas em oócitos e embriões mamíferos Methylation of histones in mammalian oocytes and embryos. **ver. Bras. Reprod. Anim**, n. 2, p. 620–627, 2017.
- CAIXETA, E. S. et al. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655–664, 17 jun. 2009.
- CHEN, Z. et al. Lipidomic profiling of dairy cattle oocytes by high performance liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry for developmental competence markers. **Theriogenology**, v. 144, p. 56–66, 1 mar. 2020.
- DUCHEN, M. R. **Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology**. **Molecular Aspects of Medicine**, ago. 2004.
- DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77, p. 21–49, 2007.
- FERREIRA, A. F. et al. Spatiotemporal dynamics of SIRT 1, 2 and 3 during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 186, p. 60–69, 1 jul. 2022.
- FINOCCHIARO, R. et al. Effect of heat stress on production 54editerranean dairy sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 5, p. 1855–1864, 2005.
- FROIMCHUK, E.; JANG, Y.; GE, K. **Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D**. **Gene**, 2017.
- GHANEM, N. et al. Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced *in vitro* and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 238–250, 15 jul. 2014.

GIL, A. et al. One- vs two-phase extraction: re-evaluation of sample preparation procedures for untargeted lipidomics in plasma samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 23, p. 5859–5870, 1 set. 2018.

HARDING, H. P. et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Molecular Cell**, v. 11, n. 3, 2003.

HELD-HOELKER, E. et al. Cryosurvival of *in vitro* produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. **Theriogenology**, v. 96, p. 145–152, 2017.

HORN, A.; JAISWAL, J. K. Structural and signaling role of lipids in plasma membrane repair. Em: **Current Topics in Membranes**. [s.l: s.n.]. v. 84.

IRELAND, J. J.; COULSON, P. B.; MURPHREE, R. L. Follicular Development during Four Stages of the Estrous Cycle of Beef Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 1261–1269, 1 nov. 1979.

KARMAN, B. N. et al. Dioxin exposure reduces the steroidogenic capacity of mouse antral follicles mainly at the level of HSD17B1 without altering atresia. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 264, n. 1, p. 1, 10 out. 2012.

KHAN, A. et al. Sod1 gene silencing promotes apoptosis and suppresses proliferation of heat-stressed bovine granulosa cells via induction of oxidative stress. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 12, 2021.

LABBÉ, K. et al. The modified mitochondrial outer membrane carrier MTCH2 links mitochondrial fusion to lipogenesis. **Journal of Cell Biology**, v. 220, n. 11, 2021.

LAMAS-TORANZO, I.; PERICUESTA, E.; BERMEJO-ÁLVAREZ, P. Mitochondrial and metabolic adjustments during the final phase of follicular development prior to IVM of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 119, p. 156–162, 1 out. 2018.

MAES, T. et al. ORY-1001, a Potent and Selective Covalent KDM1A Inhibitor, for the Treatment of Acute Leukemia. **Cancer Cell**, v. 33, n. 3, 2018.

MAREI, W. F. A. et al. Alpha-linolenic acid protects the developmental capacity of bovine cumulus–oocyte complexes matured under lipotoxic conditions *in vitro*†. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 6, p. 1181–1196, 1 jun. 2017.

MAREI, W. F. A. et al. Mitochondria-targeted therapy rescues development and quality of embryos derived from oocytes matured under oxidative stress conditions: a bovine *in vitro* model. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 34, n. 10, p. 1984–1998, 2 out. 2019

MAYA-SORIANO, M. J.; TABERNER, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Retinol improves *in vitro* oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. **Zygote**, v. 21, n. 4, p. 377–384, nov. 2013.

MCMANUS, C. M. et al. **Physiology and genetics of heat stress in cattle. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources** CABI International, , 11 maio 2020.

METZGER, E. et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor- dependent transcription. **Nature**, v. 437, n. 7057, 2005.

NABENISHI, H. et al. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. **Molecular reproduction and development**, v. 79, n. 1, p. 31–40, jan. 2012.

NAGANO, M. Acquisition of developmental competence and *in vitro* growth culture of bovine oocytes. 2018.

NORTH, B. J. et al. SIRT2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 13, p. 1438–1453, 1 jul. 2014.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, p.509-515, 2004

ROCHA, D. R. et al. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, n. 1, p. 18–24, 2012.

RON, D.; WALTER, P. **Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2007.

ROTTIERS, V. et al. MTCH2 is a conserved regulator of lipid homeostasis. **Obesity**, v. 25, n. 3, 2017.

SELI, E.; WANG, T.; HORVATH, T. L. Mitochondrial unfolded protein response: a stress response with implications for fertility and reproductive aging. **Fertility and sterility**, v. 111, n. 2, p. 197–204, 1 fev. 2019.

SHAO, W. et al. Histone Methyltransferase SETD2 Is Required for Porcine Early Embryonic Development. **Animals**, v. 12, n. 17, 1 set. 2022.

STURMEY, R. G. et al. Role of Fatty Acids in Energy Provision During Oocyte Maturation and Early Embryo Development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. SUPPL. 3, p. 50–58, set. 2009.

SUDANO, M. J. et al. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 472- 484.e1, 2016.

TAKAHASHI, T. et al. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction, fertility, and development**, v. 25, n. 4, p. 589–599, 2013.

TATONE, C. et al. Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 24, n. 3, p. 267–289, 1 maio 2018.

WANG, Y. et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 9, 2006.

WELTE, M. A.; GOULD, A. P. Lipid droplet functions beyond energy storage. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1862, n. 10 Pt B, p. 1260, 1 out. 2017.

WHEELLOCK, J. B. et al. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 644–655, 1 fev. 2010.

YAMASHITA, Y. et al. Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1193–1198, 1 abr. 2003.

ZOLINI, A. M. et al. Effect of addition of l-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v. 133, p. 135–143, 2019.

### **Capítulo 3: INFLUENCIA DO ESTRESSE TÉRMICO *IN VIVO* SOB A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE COMPLEXO CUMULUS OÓCITOS DE VACAS LEITEIRAS**

Autores: Mariane Gabriela Cesar Ribeiro<sup>a</sup>; Fabiana de Andrade Melo Sterza<sup>a,e</sup>; Bianka Drawert<sup>b</sup>; Beate Fuchs<sup>c</sup>; Christina Galuska<sup>c</sup>; Franziska Koch<sup>d</sup>; Érikliis Nogueira<sup>a</sup>, Ralf Poehland<sup>b</sup>

#### **Correspondência**

<sup>a</sup> CIVET, FAMEZ, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Reproductive Biology, Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany

<sup>c</sup> Core facility Metabolomics, Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany

<sup>d</sup> Metabolism Efficiency Unit, Institute of Nutrition Physiology, Research Institute for Farm Animal Biology, Dummerstorf, Germany

<sup>e</sup> PGZOO, State University of Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brazil

Ralf Poehland<sup>b</sup> (Corresponding Author)

#### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estresse térmico *in vivo* em vacas leiteiras sobre o metabolismo lipídico dos complexos cumulus-oócito (COCs) submetidos à MIV. 27 Vacas primíparas da raça holandesa foram mantidas em câmara climática com alimentação *ad libitum* e temperatura constante de 28°C e índice de temperatura-humidade (ITU) de 76 durante 7 dias (Estresse térmico - HS) ou sob temperatura constante de 16°C, ITU = 60 e recebendo a mesma quantidade de alimento que as vacas submetidas a stress térmico (Pair-feeding - PF) ou alimentação *ad libitum* (Controle - C), durante o mesmo período. Os Complexos cumulus oócitos (COCs) foram obtidos pela técnica de slicing dos ovários. As amostras foram preparadas para análise antes (T0) e depois (T24) da MIV. Os COCs T0 e T24 foram desnudados e as Células do cumulus (CC) e oócitos (Oo)

foram submetidos separadamente a análises do conteúdo lipídico (CoLi) e da atividade mitocondrial (AM) por fluorescência e microscopia confocal, perfil lipídico por LC-MS; e expressão gênica por RT-PCR utilizando a plataforma Fluidigm. O software Metaboanalyst 5.0 (heatmap e volcano plot) foi utilizado para avaliar estatisticamente os resultados da LC-MS. Para a fluorescência e a expressão gênica, os dados foram organizados em um modelo fatorial 2x3 e analisados por proc GLM (SAS ondemand). Para todas as análises, foi considerado  $P < 0,05$ . Entre as vias metabólicas avaliadas, o maior número de alterações ocorreu nas CC. A expressão de genes que participam do controle de esteroides foi afetada nos animais HS, com redução de DHCR7, e aumento de CYP11A1. Esses efeitos justificam a menor expansão das CC observada no grupo HS. HS foi o único grupo que mostrou um aumento significativo de CoLi após a MIV, além de reduzir mecanismos que colaboram com o controle da lipotoxicidade, como a redução de ELOVL5, e redução geral de TG (Oo e CC), principalmente os que são constituídos por ácidos graxos (AGs) esteárico (18:0), oléico (18:1) e linolênico (18:2), além da redução de HSPE1 e HSPD1 (CC). Alguns mecanismos de sobrevivência foram acionados, como a maior expressão de MAP2K2 (CC e Oo), FABP3 (CC), SIRT1 (CC e Oo) e MTCH2 (CC e Oo). Por outro lado foram prejudicadas vias importantes para o controle homeostático sob situação de estresse, com a redução da expressão de HSPA4, HSPA5, HSPA9 (CC e Oo) e ATF4 (CC e Oo). Eventos moleculares que participam da organização da cromatina também corroboram com a redução da competência dos oócitos HS, assim como a redução de H2A (CC e Oo) e aumento de G6PD (CC e Oo) e SETD2 (CC). Conclui-se que o metabolismo lipídico é afetado pelo estresse térmico em vacas leiteiras, afetando a produção de esteroides, o que impacta na expansão das células do cumulus. O aumento de lipídios e atividade mitocondrial após a MIV, indicam a importância dos lipídios para garantir a qualidade dos COCs, no entanto, o estresse térmico por 7 dias impactou de tal forma os COCs, que os lipídios acumulados apresentaram redução de AGs importantes para o controle da lipotoxicidade.

Keywords: ácidos graxos, células do cumulus, estresse oxidativo, mitocôndrias, MIV.

## 1. Introdução

Já foi descrito que o estresse térmico impacta negativamente a maturação *in vitro* do complexo cumulus oócitos (COCs) (ROTH; HANSEN, 2005). Entre os prejuízos estão a perda dos grânulos corticais e o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MAYA-SORIANO; TABERNER; LÓPEZ-BÉJAR, 2013). Consequentemente menores taxas de clivagem e formação de blastocisto são observadas (NABENISHI et al., 2012).

O estresse por calor ainda pode causar alterações importantes nas células do cumulus, pois estas são altamente sensíveis ao estresse por calor (PAYTON et al., 2011), e como as CC são transcricionalmente ativas, e tem um papel importante para a progressão meiótica (REGASSA et al., 2011), o comprometimento dessas células pode gerar consequências negativas ao desenvolvimento oocitário.

Há indicações de que, alterações induzidas pelo estresse térmico em oócitos em estágio de vesícula germinativa (GV) ocorram em nível transcricional, alterando genes envolvidos na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário inicial fato comprovado pela diferença nos mRNAs observada após a maturação de oócitos coletados na estação fria, comparados aos coletados na estação quente (GENDELMAN; ROTH, 2012).

A atividade mitocondrial de oócitos e células do cumulus, pode ser usada como termômetro para avaliar a qualidade do oócito, pois alterações na fisiologia das mitocôndrias durante a maturação pode levar a produção excessiva de ROS, e consequentemente a apoptose (NABENISHI et al., 2012). Em modelos bovinos a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo estão sendo associados a exposição a elevados níveis de ácidos graxos livres (MAREI et al., 2017). No entanto, estudos que utilizaram substâncias delipidantes durante a maturação, apresentaram resultados controversos (GHANEM et al., 2014; HELD-HOELKER et al., 2017; TAKAHASHI et al., 2013; ZOLINI et al., 2019). Por outro lado, também há indícios de que a reserva de lipídios é uma aliada na resposta ao estresse (MAYA-SORIANO; TABERNER; LÓPEZ-BÉJAR, 2013). Deste modo, ainda não está claro o real impacto do conteúdo e perfil lipídicos dos COCs na maturação *in vitro*.

Acredita-se, portanto, que é necessário um melhor conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos com o metabolismo lipídico dos oócitos para otimizar a eficiência da produção *in vitro* de embriões, e para buscar alternativas mais assertivas, quando os COCs forem provenientes de doadoras sob estresse térmico ou restrição alimentar.

Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do estresse térmico *in vivo* de vacas holandesas, sobre o metabolismo lipídico de COCs submetidos à maturação *in vitro*.

## 2. Metodologia

Para o estudo foram utilizadas 27 vacas leiteiras da raça Holandesa na 1ª lactação ( $100 \pm 50$  dias com leite). Os grupos foram distribuídos em câmara climática da seguinte maneira: Controle (C) - com alimentação *ad libitum* e temperatura ambiente de 15°C e ITU = 60; Estresse térmico (HS) - com alimentação *ad libitum* e temperatura ambiente de 28°C e ITU = 76; Pair-feeding (PF) - receberam a mesma quantidade de alimento ingerida pelo grupo HS no dia anterior e temperatura ambiente de 15°C e ITU = 60. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética do governo do estado em Mecklenburg-West Pomerania, Alemanha, LALLF MV • Postfach 10 20 64 • 18003 Rostock.

A cada mês, 3 animais foram colocados em câmaras climáticas. Inicialmente passaram por um período de adaptação de 6 dias a 15°C e em seguida as câmaras climáticas foram ajustadas de acordo com a condição climática definida para cada grupo experimental, condições que os animais permanecem por 7 dias (Figura 1; Figura 2). Os animais do grupo PF passaram por todos os procedimentos experimentais (com exceção do período de adaptação) um dia após os outros, pois receberam a quantidade de alimento ingerida pelo animal submetido ao estresse térmico.

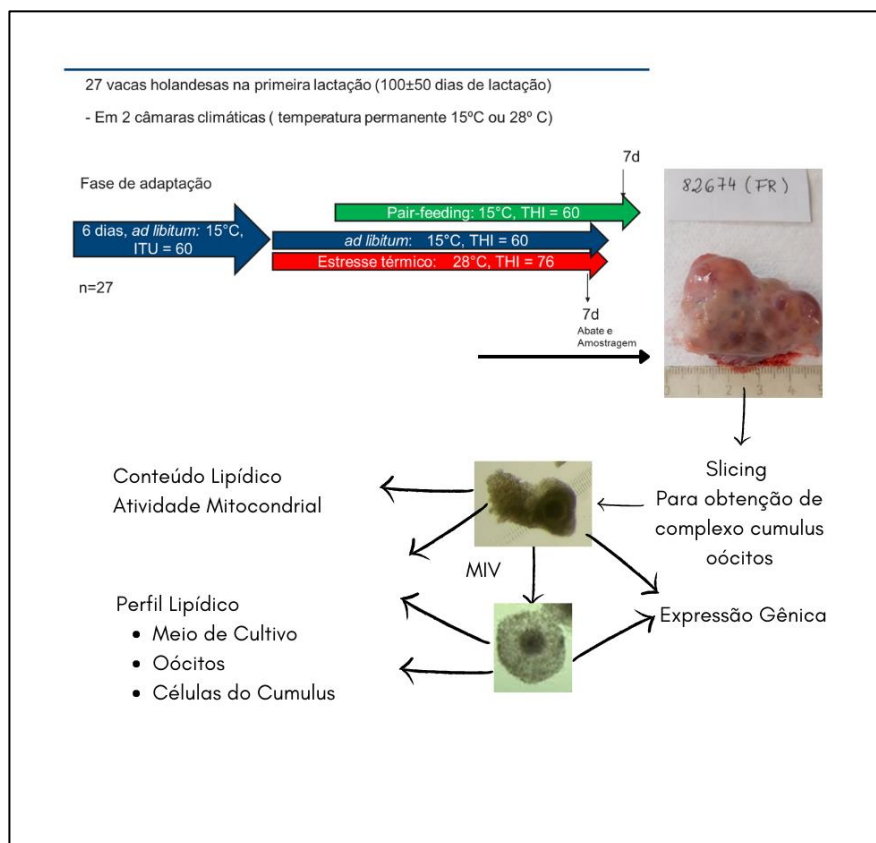


Figura. 1 Delineamento experimental dos tratamentos *in vivo*

Em todas as coletas, durante o período experimental foram aferidos diariamente os parâmetros fisiológicos dos animais, bem como conferidos os dados climatológicos obtidos pelos relatórios das câmaras climáticas (figura 2).

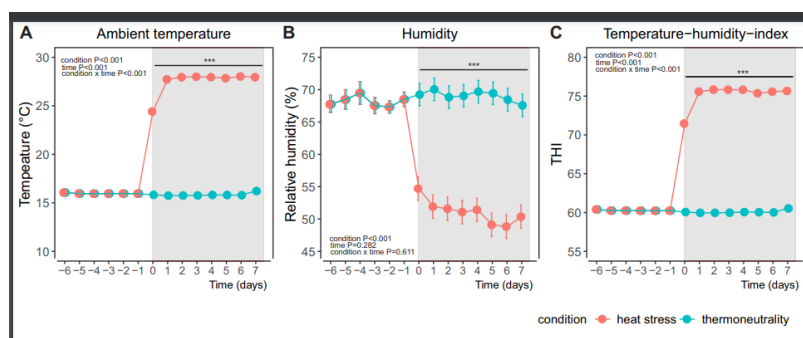


Figura. 2 Média da temperatura ambiente, umidade e ITU ao longo do período experimental. Os dados foram obtidos a partir dos relatórios das câmaras climáticas.

Ao final de cada período experimental *in vivo* os animais foram abatidos no abatedouro do próprio instituto, onde foram realizadas as coletas dos ovários. Estes

foram transportados até o laboratório em 5 minutos em solução tampão fosfato (PBS), acrescido de penicilina e estreptomicina, à 36° C.

No laboratório a recuperação de COCs foi realizada pelo método *deslicing* dos ovários com lâmina de bisturi em placa de petri 110x15mm. Os fragmentos dos ovários foram lavados com solução dPBS e o conteúdo foi filtrado para a recuperação dos COCs. Foram classificados como viáveis os COCs com pelo menos 5 camadas compactas de células cumulus, citoplasma homogêneo e escuro e com tamanho compatível com a fase antral.

A metade dos COCs coletados foram utilizadas para as análises no momento zero (T0) e a outra metade foi submetida à maturação *in vitro* (T24), realizada em meio comercial da IVF-Bioscience® (BO IVM, sem soro fetal bovino e suplementado com baixas concentrações de glicose, hormônios gonadotróficos e gentamicina) em incubadora 38,8 C, 6% CO<sub>2</sub> e máximo de umidade durante 24 horas.

Em T0 e T24 os COCs foram desnudados por meio de sucessivas pipetagens e separados de acordo com a análise e imediatamente armazenados. Em todos os meses foi coletado material suficiente para pelo menos dois tipos de análises.

## 2.1 Análises

### 2.1.1 Expansão das células do Cumulus Oócitos

A expansão das células do cumulus foi avaliada por meio da comparação entre a área das células compactas (oócito imaturo, antes da MIV) e das células expandidas (oócito maduro, após a MIV). Para isso, fotos de grupos de COCs foram feitas em T0 e T24 e a medição foi feita com o auxílio do software ImageJ 1.53K (figura 3). O cálculo da expansão das células cumulus foi feito pela diferença entre as células expandidas e as células compactadas. Para calcular a intensidade da coloração da expansão total corrigida (CTCF) utilizou-se a fórmula a seguir: CTCF = Densidade Integrada - (Área da célula selecionada X coloração média das leituras de background).

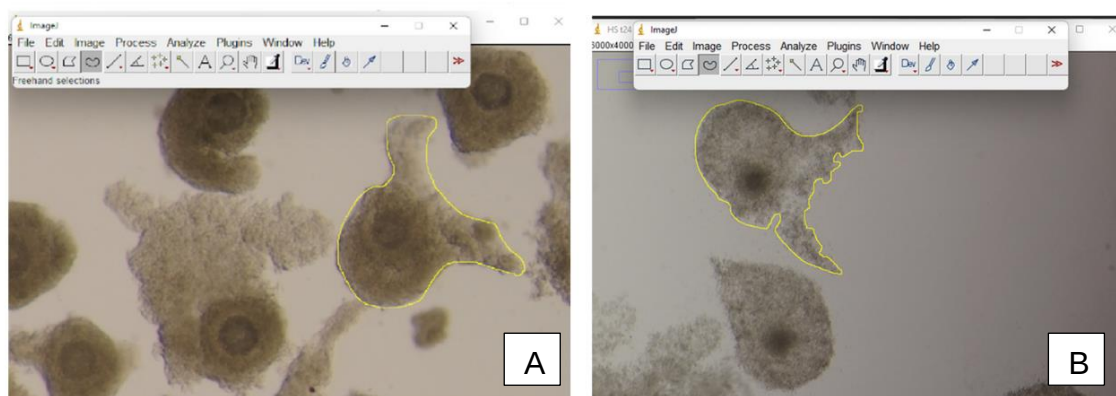


Figura. 3 Medição da expansão das células do cumulus após o período de 24 horas de maturação com o auxílio do Image J. A: células do cumulus compactas antes da MIV; B: células do cumulus expandidas após a MIV. O cálculo da expansão das células cumulus foi feito pela diferença entre as células expandidas e as células compactadas

### 2.1.2 Atividade mitocondrial e conteúdo lipídico de oócitos

Os COCs foram desnudados em placas de 4 poços com solução de tripsina / EDTA (0,05% / 0,02% p/v em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ; Biochrom® GmbH, Berlim, Alemanha) por meio de sucessivas pipetagens sob estereomicroscópio, até que os oócitos permanecessem com poucas células cumulus ao seu redor, para não prejudicar a coloração do oócito. Em seguida, os COCs foram lavados duas vezes em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco® -094) + polivinilpirrolidona - PVA (0,3%) (Sigma Chemical® Co., St Louis, MO, EUA) antes de serem submetidos ao protocolo de coloração. As mitocôndrias foram coradas com o corante ativo MitoTracker® Orange CMTMRos (Mitotracker Orange; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) em concentração final de 500nM em PBS + BSA (0,4 %) durante 40 min a 38,8 °C em 6% de  $\text{CO}_2$ . Este corante mostra uma forte sensibilidade ao potencial de membrana mitocondrial e afinidade para a proteína mitocondrial (grupos tiol) que exibe alta retenção na organela devido à alta co-localização com citocromo C oxidase (POOT et al., 1996). Após a coloração com Mitotracker, os COCs foram transferidos para uma solução de PBS + BSA (0,4%) contendo 3 µg / mL do corante lipídico específico 4,4-difluoro 1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno (Bodipy® 493/503; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) para corar gotículas lipídicas citoplasmáticas, solução na qual permaneceram por 10 min. a 38,8 °C em

6% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as estruturas coradas foram lavadas 2 vezes em PBS livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e depois fixadas pelo menos 15 min em paraformaldeído - PAF (3%) e sacarose (2%). Após a fixação, as estruturas foram lavadas uma vez em PBS + PVA (0,3%) e duas vezes em PBS livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e então colocadas em lâminas de vidro com gotas de 2,5µg / mL-1 Hoechst 33342 (Sigma Chemical 959 Co., St. Louis, MO, EUA) + glicerina / PBS. As gotas foram sobrepostas pela lamínula de modo a homogeneizar o conteúdo. Para evitar danos à morfologia de oócitos desenhou-se o formato da lamínula com silicone. As lâminas permaneceram incubadas à temperatura ambiente. As estruturas coradas foram analisadas com um microscópio confocal de varredura a laser (LSM 5 Pa) acoplado a um microscópio invertido Axiovert 200M (Carl Zeiss®, Jena, Alemanha). A intensidade de fluorescência (IF) foi quantificada usando o programa Image J 1.47 (versão 1.60\_65, Wayne Rasband; National Institutes of Health, Washington DC, USA) As regiões de interesse (ROIs) foram definidas em torno das estruturas coradas e quantificadas em pixels. A intensidade da fluorescência foi corrigida com o seguinte cálculo: intensidade corrigida = Densidade Integrada - (Área da célula selecionada X coloração média das leituras de background).

### 2.1.3 Expressão gênica

Os COCs em foram desnudados em placas de 4 poços onde as células do cumulus foram completamente removidas por sucessivas pipetagens sob estereomicroscópio. Em seguida, os oócitos e células cumulus foram, separadamente, lavados duas vezes em PBS livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> + PVA (0,3%) e uma vez em PBS livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>. Em seguida as amostras eram colocadas em tubo RNAase free de 0,5 mL (eppendorf) em um volume máximo de 5 µL. Cada repetição continha 5 oócitos ou células do cumulus correspondentes a 5 COCs. Os tubos devidamente identificados foram colocados imediatamente em gelo seco e depois armazenados em freezer a -70 °C até o momento da análise.

Para a análise da expressão gênica, cada solução de amostra preparada consistia de 2,25 µL cDNA (produtos pré-amplificados), 2,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e 0,25 µL de 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm); e a solução de ensaio foi 2,5 µL de 20X TaqMan Gene

Expression Assay (Applied Biosystems) e 2,5 µL de 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm). O chip 48.48 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm) foi utilizado para coletar os dados. Depois de preparado, o chip foi carregado com 5 µL de cada solução de ensaio e 5 µL de cada solução de amostra. O ciclo térmico do qPCR foi realizado no Biomark HD System (Fluidigm) utilizando o protocolo TaqMan GE 48x48 Standard, que consistia em um estágio de Thermal Mix (50°C por 2 min, 70°C por 20 min e 25°C por 10 min) seguido de Hot Start (50°C por 2 min e 95°C por 10 min), seguido de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 s), anelamento e extensão do primer (60°C por 60 s).

Foram selecionados genes relacionados ao metabolismo lipídico, atividade mitocondrial e estresse oxidativo (anexo1).

#### 2.1.4 Cromatografia Líquida e espectrometria de massa (LC-MS)

Os COCs foram desnudados em placas de 4 poços onde as células do cumulus foram removidas por sucessivas pipetagens sob estereomicroscópio. Cada repetição era composta por 5 oócitos, ou células do cumulus correspondentes à 5 COCs. Os tubos devidamente identificados foram colocados imediatamente em gelo seco e depois armazenados em freezer a -70 °C até o momento da análise.

LC-MS é capaz de identificar a maior parte das classes de lipídios conhecidas em uma matriz biológica. Foi utilizado o sistema de extração em uma fase para análise de lipídios baseado na mistura solvente de MeOH/MTBE/CHCl<sub>3</sub> (MMC). As amostras foram analisadas pelo sistema de espectrometria de massa, que tandem de cromatografia líquida de ultra alta performance (UHPLC-MS/MS), com o Sistema Vanquish UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) com ionização por eletrospray aquecida (HESI) QExactive mais espectrômetro de massa Orbitrap (Thermo Scientific) no modo de ionização positiva e negativa.

As amostras foram analisadas de acordo com os protocolos estabelecidos no FBN Core Facility Metabolomic. Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas antes de serem separadas para extração (GIL et al., 2018). Para minimizar possíveis efeito da técnica, utilizamos uma alíquota de cada amostra biológica de cada grupo com um padrão interno (SPLASH LIPIDOMIX ®). Às

amostras de células do cumulus e de oócitos foram adicionados 3µl, 2,5µl de padrão interno, respectivamente. O cálculo da quantidade corrigida das amostras foi calcula da seguinte maneira: média da área da molécula / média da área do padrão interno = valor quantitativo para cada molécula de lipídio em ng.

As camadas polares e apolares foram separadas e secas sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente e armazenadas até a análise. Após a reconstituição, a fase apolar e a fase polar foram analisadas no modo de ionização positiva e negativa por RP cromatografia líquida de alta performance-espectrometria de massa em tandem (UHPLC-MS/MS) (Vanquish UHPLC-System com ionização por eletrospray aquecida (HESI) QExactive mais espectrômetro de massa Orbitrap; Thermo Scientific, Waltham, EUA). A identificação e quantificação relativa de espécies lipídicas individuais foram realizadas em nível de produção (fragmentação MS/MS) usando o software LipidSearch (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), e a anotação metabólitos foi realizada usando o software Compound Discoverer 3.2 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

### 2.1.5 Estatística

Medições repetidas periodicamente no mesmo animal foram analisadas por ANOVA de medição repetida usando o procedimento MIXED de SAS (Versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Para temperatura ambiente, ITU e umidade, o modelo continha o tratamento de efeitos fixos (HS, CON, PF), tempo (dia), bloco (1 a 9), e a interação tratamento x tempo; e DIM serviu como covariável. Medidas repetidas no mesmo animal foram consideradas pela declaração repetida de proc MIXED (variável repetida: tempo) usando um tipo autorregressivo ou simetria composta (com base no menor AIC) para a matriz de covariância residual diagonal do bloco.

As características de expansão de células do cumulus após maturação, conteúdo lipídico e atividade mitocondrial (fluorescência) foram analisadas utilizando o modelo misto linear generalizado (GLIMMIX) procedimento com o pacote de software estatístico SAS ondemand versão acadêmica. Para a coloração de conteúdo lipídico e atividade mitocondrial, cada oócito, ou cada célula do cumulus foi considerado uma observação.

Para análise da expressão gênica, utilizou-se um gene housekeeping (GAPDH), determinado através do software BestKeeper (PFAFFL et al, 2004), as médias geométricas do housekeeping, foram calculadas e usadas para obter os valores delta Ct dos demais genes.

Os efeitos dos tratamentos nos resultados da fluorescência e da expressão gênica foram determinados por arranjo fatorial 2x3 (3 fatores em 2 níveis) por análise de variância usando o modelo misto linear generalizado (GLIMMIX) do SAS ondemand versão acadêmica.

Para análise dos dados da LC-MS, considerou-se apenas ions positivos. Inicialmente utilizou-se a análise estatística multivariada, Heatmap usando o software MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Outras análises estatísticas, com caráter exploratório foram realizadas usando o teste plot volcano que combina resultados da análise Fold Change (FC) e testes T em um único gráfico que permite selecionar recursos significativos com base na significância biológica, estatística ou em ambas. Para o PCA, ou plot volcano, os dados foram previamente normalizados pela mediana, transformados com Log10, utilizando um escalonamento automático.

Para todas as análises  $P < 0,05$  foi considerado como significativo.

### 3. Resultados

Resultados da tabela 1 indicam que COCs provenientes de vacas leiteiras expostas ao estresse térmico foram menos eficientes à maturação *in vitro*, pois a expansão das células do cumulus foi inferior à dos demais grupos.

Tabela 1 Expansão de células do cumulus após maturação *in vitro*, de COCs provenientes de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico e nutricional.

|            | Estimativa da área de expansão de células do cumulus (erro padrão) | Integridade da densidade da expansão das células do cumulus (erro padrão) |
|------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| HS (n=113) | 11,80 (0,1) b                                                      | 16,39 (0,06) b                                                            |
| PF (n=96)  | 13,30 (0,1) a                                                      | 17,25 (0,1) a                                                             |
| C (n=73)   | 12,97 (0,1) a                                                      | 16,89 (17,25) a                                                           |
| Valor de P | < 0,001                                                            | < 0,001                                                                   |

C: grupo controle; HS: grupo estresse térmico; PF grupo pair feeding Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos segundo o teste de tukey. P<0,05

O conteúdo lipídico e a atividade mitocondrial apresentaram interação entre o período de maturação e os grupos (p<0,001 para todos as análises citadas). Os resultados das figuras 4 e 5 mostram que o em HS a atividade mitocondrial e o conteúdo lipídico foi inferior aos demais grupos, após a maturação. O grupo controle manteve o conteúdo lipídico e reduziu a atividade mitocondrial após a MIV.

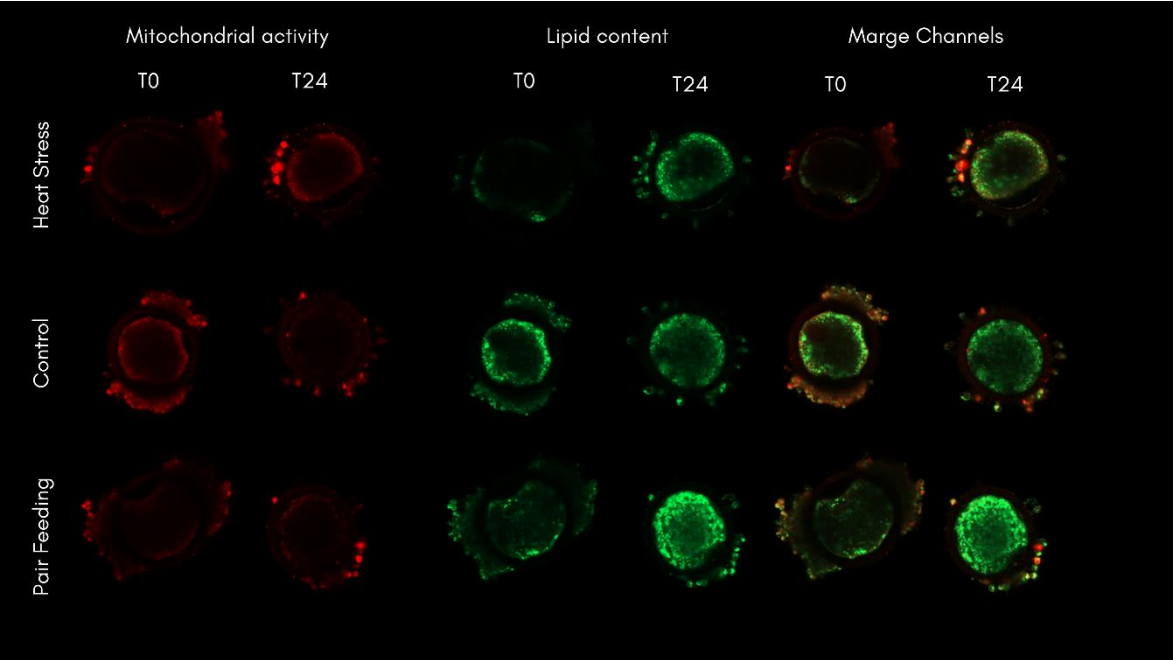


Figura. 4 Imagens representativas do Conteúdo lipídico e atividade mitocondrial em oócitos antes e após 24 horas em meio de maturação, provenientes de vacas leiteiras. Estresse térmico: com alimentação ad libitum e temperatura ambiente de 28°C, ITU = 76; Pair-feeding: receberam a mesma quantidade de alimento ingerida pelo grupo HS e condições climáticas de 15°C e ITU=60; Controle:

com alimentação *ad libitum* e condições climáticas de 15°C, ITU = 60. Corante para atividade mitocondrial: Mitotracker®. Corante para conteúdo lipídico: Bodipy®

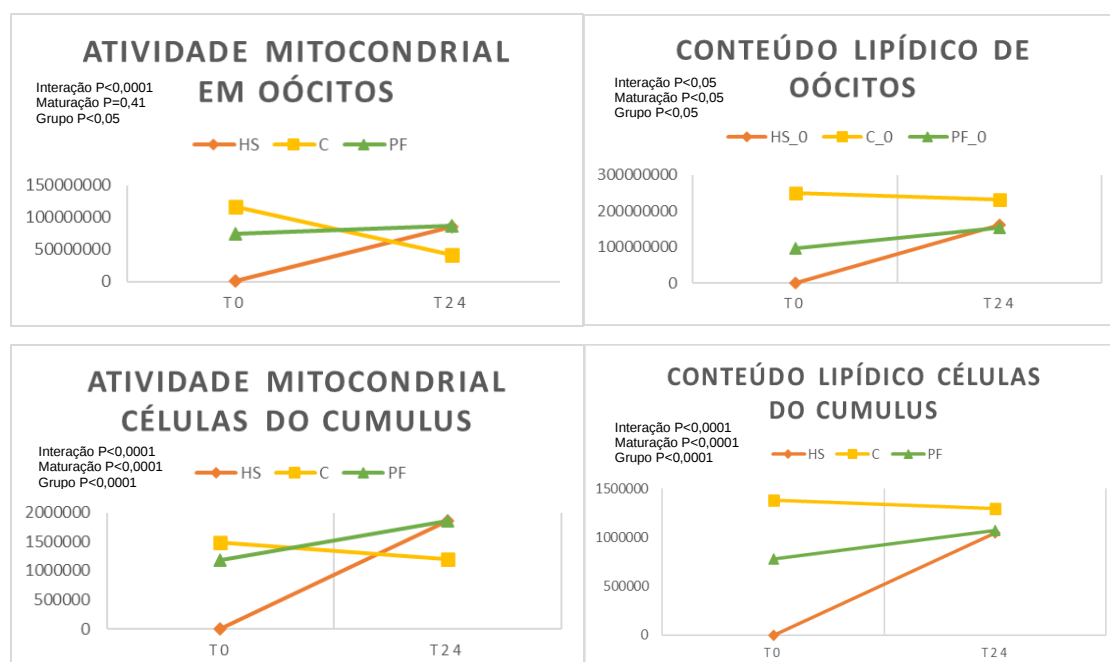


Figura. 5 Conteúdo lipídico e atividade mitocondrial antes e após a maturação *in vitro*, de oócitos provenientes de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico e nutricional após sete dias. C: grupo controle; HS: grupo estresse térmico; PF grupo pair feeding; T0: oócitos imaturos; T24: oócitos após período de maturação

A fim de procurar painel lipídico discriminante do lipidoma do oócito e células do cumulus, empregamos o HeatMap. É possível observar a diferença clara do período de maturação, e uma maior diferença entre os grupos HS e PF (figura 6).

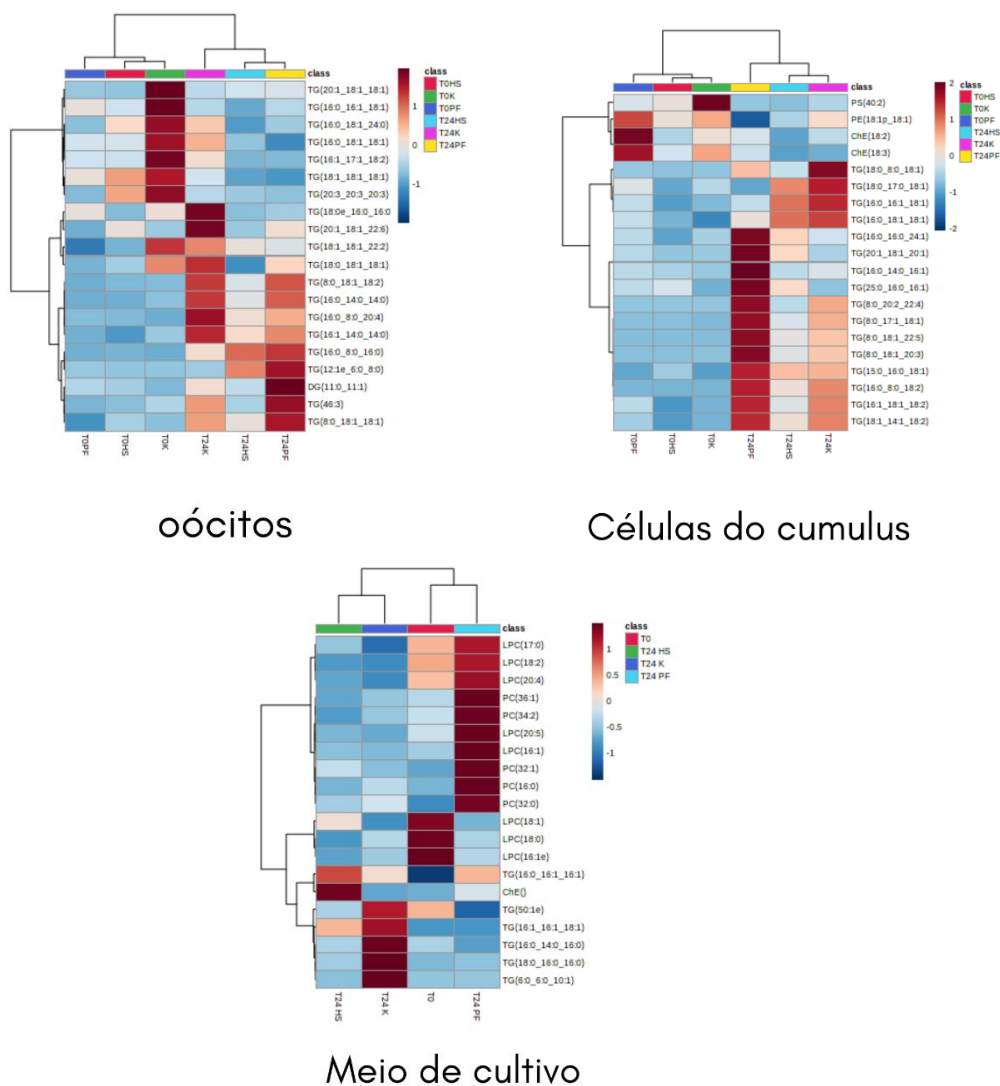


Figura. 6 Análise de Heatmap em oócitos, células do cumulus e meio de cultivo após a maturação *in vitro* de COCs de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou estresse nutricional por sete dias.

Para uma análise mais detalhada das moléculas lipídicas, adotamos então as comparações apenas entre os grupos HS e PF, nos períodos de 0 e 24 horas deMIV, usando a análise de Plot volcano. O número total de moléculas lipídicas detectadas e o tipo de regulação (up regulated ou down-regulated) estão descritos na tabela 2. Entendemos que a situação up regulated indica acúmulo de moléculas, e down-regulated indica consumo de lipídios.

Tabela 2 Detecção e análise diferencial de lipídios após maturação *in vitro* em células do cumulus, oócitos e meio de cultivo. Amostras biológicas provenientes de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou estresse nutricional.

|                          | moléculas detectadas (n) | Moléculas diferentes (n) | Tipos de regulação em 24 horas |                    |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------|
|                          |                          |                          | up-regulated (n)               | Down-regulated (n) |
| Oócitos - HS             | 406                      | 71                       | 29                             | 42                 |
| Oócitos - PF             | 406                      | 89                       | 51                             | 38                 |
| (*) Oócitos HS (HS X PF) | 406                      | 67                       | 16                             | 51                 |
| Cumulus - HS             | 488                      | 156                      | 91                             | 65                 |
| Cumulus - PF             | 488                      | 167                      | 82                             | 85                 |
| (*) CumulusHS (HS x PF)  | 488                      | 95                       | 49                             | 46                 |
| Meio de Cultivo HS       | 87                       | 27                       | 12                             | 15                 |
| Meio de Cultivo PF       | 87                       | 18                       | 11                             | 7                  |

Os resultados apresentados na tabela referem-se ao encontrado em T24 horas, com exceção das linhas marcadas com (\*), quando o resultado é de animais HS, comparados aos animais PF, ambos após a MIV. HS: animais expostos ao estresse térmico, PF animais pair feeding; A análise estatística sobre a variação da quantidade de lipídios, como quanto ao tipo de regulação (up ou down regulated) foram feitas usando o Plot volcano FC:2.0 e Tukey:0.5.

A classe lipídica mais impactada pelo horário de maturação foi a dos triglicerídeos, tanto nas amostras de células do cumulus como em oócitos. Podemos ver que os animais HS, em relação aos animais PF, tiveram mais triglicerídeos consumidos no processo de maturação (tabela 3).

Tabela 3 Classes de lipídios que mais sofreram alterações após maturação *in vitro* em células do cumulus, oócitos e meio de cultivo. Amostras biológicas são provenientes de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico ou nutricional.

| Classe lipídica | Oócitos HS    | Oócitos PF    | Células do Cumulus HS | Células do Cumulus PF |
|-----------------|---------------|---------------|-----------------------|-----------------------|
| ChE             | -             | 1% (1↓ 0↑)    | 3% (3↓ 3↑)            | 3% (5↓ 1↑)            |
| DG              | 21% (4↓ 11↑)  | 30% (3↓ 24↑)  | 7% (3↓ 9↑)            | 11% (8↓ 11↑)          |
| PC              |               | 7% (7↓ 0↑)    | 14% (0↓ 22↑)          | 17% (30↓ 0↑)          |
| PE              |               | 1% (1↓ 0↑)    | 2,5% (2↓ 2↑)          | 10% (18↓ 0↑)          |
| PI              |               | -             | 1,2% (0↓ 2↑)          | 1,1% (2↓ 0↑)          |
| PS              | -             | -             | 1,9% (1↓ 2↑)          | 1,1% (2↓ 0↑)          |
| SM              | 1% (1↓ 0↑)    | -             | 0,6% (0↓ 1↑)          | 2,9% (5↓ 0↑)          |
| TG              | 77% (30↓ 25↑) | 59% (26↓ 27↑) | 67% (87↓ 24↑)         | 50% (15↓ 70↑)         |

Os resultados apresentados na tabela referem-se ao observado em T24 horas. O valor de porcentagem apresentado na tabelas refere-se à porcentagem dos lipídios daquela classe cujas quantidade e regulação era estatisticamente diferente entre T0 e T24. Setas para cima ou para baixo indicam o tipo de regulação (up ou down- regulated) das moléculas lipídicas que se diferem após 24 horas de maturação. O número antes da seta representa o número de lipídios que apresentava o comportamento indicado pelas setas.

Verificamos que algumas moléculas de triglicerídeos, cujas cadeias são compostas de ácidos graxos esteárico (18:0), oléico (18:1) e linolênico (18:2) apresentaram diferentes tipos de regulação (up ou down regulated), após 24 horas de maturação. Essas variações aconteceram apenas com as células do cumulus e oócitos dos animais HS, sugerindo que o estresse térmico deixa o complexo cumulus oócitos mais sensível ao meio de maturação (tabela 4).

O triglicerídeo composto por uma molécula de ácido esteárico (18:0) e 2 de ácido linolênico (18:2), após a maturação estava up-regulated no meio de maturação, porém down-regulated nas células do cumulus e nos oócitos.

Tabela 4 Moléculas lipídicas comuns após maturação *in vitro* em células do cumulus, oócitos e meio de cultivo. Amostras biológicas provenientes de vacas leiteiras submetidas ao estresse térmico.

| Moléculas Lipídicas | Meio de Cultivo | Células do Cumulus | Oócitos |
|---------------------|-----------------|--------------------|---------|
| TG(18:1_18:1_18:1)  | ↓               | ↓                  | ↓       |
| TG(18:1_18:2_18:2)  | ↓               | ↓                  | -       |
| TG(18:0_18:1_18:1)  | ↑               | ↓                  | ↓       |
| TG(16:0_18:1_18:2)  | ↓               | ↓                  | -       |
| TG(18:0_18:0_18:1)  | ↑               | ↓                  | -       |
| TG(18:2_18:2_18:2)  | ↓               | ↓                  | -       |

Resultados apresentados em células do cumulus de animais HS após 24 horas de Maturação. Setas para cima ou para baixo indicam o tipo de regulação (up ou down- regulated) das moléculas lipídicas que se diferem entre COCs antes e após a MIV.

A expressão de todos os genes estudados em oócitos está demonstrado no anexo 4. E o comportamento dos mesmos genes em células do cumulus está descrito no anexo 5. Nos gráficos a seguir estão demonstrada a expressão dos genes diferentemente expressos entre T0 e T24 e/ou entre os grupos PF e HS em oócitos (Figura 6) e células do cumulus (figura 7).



Figura. 7 Expressão de genes em oócitos após maturação *in vitro* de COCs de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico (HS) ou restrição alimentar (PF); Controle (C). Diferenças significativas foram verificadas por meio do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



Figura. 8 Expressão de genes em células cumulus após maturação *in vitro* de COCs de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico (HS) ou restrição alimentar (PF); Controle (C). Diferenças significativas foram verificadas por meio do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Observamos que os oócitos provenientes de animais HS, tiveram uma menor expansão das células do cumulus, comparado aos demais tratamentos. O que corrobora com os resultados de Lenz et al (1983), que demonstraram que a exposição prolongada ao estresse térmico na espécie bovina (2,5°C acima da temperatura normal do corpo por 24 h) reduziu a produção de ácido hialurônico e prejudicou a expansão do cumulus dos oócitos (LENZ et al., 1983). A produção de ácido hialurônico e consequente expansão do cumulus é mediada, em grande parte, pelo FSH (EPPIG, 1979). A ação do FSH é estimulada por hormônios esteroides, no contexto do nosso estudo, verificamos que a expressão de DHCR7 estava reduzida nas amostras de células do cumulus e oócitos de animais HS, comparados aos animais PF. Este gene é responsável por transformar 7-desidrocolesterol em colesterol (YAMASHITA et al., 2003). Antes e depois da maturação a expressão de CYP11A1 estava maior em CC de animais HS. Outros estudos já haviam verificado que o estresse térmico aumentava a expressão de CYP11A1 (RISPOLI et al., 2013). A ação deste gene está relacionada com a via de produção de  $P_4$ , hormônio que estimula o feedback negativo de FSH e corroborando portanto, com a menor expansão das células cumulus. CYP19A1, gene ligado a via da síntese do Estradiol, aumentou sua expressão de forma similar em todos os grupos após a MIV, mas aparentemente a redução da expressão de DHCR7 no grupo HS, inviabilizou a síntese de  $E_2$  em quantidade suficiente, para garantir a expansão das células do cumulus de HS de forma adequada.

Verificamos que o grupo HS apresentou menor atividade mitocondrial e conteúdo lipídico antes da maturação, porém após a maturação não foi observada diferença entre os grupos, tanto em oócitos como em CC para esta variável. Nos oócitos, o HS foi o único grupo que aumentou a atividade mitocondrial e o conteúdo lipídico após a maturação. A expressão de FABP3 estava maior em células do cumulus de animais HS, comparada a animais PF (antes e após a MIV). A FABP3 tem ação mediadora de transporte dos AGs através da membrana das Células do Cumulus para os oócitos, via projeções transzonais (TZPs). Ademais já é conhecido que COCs maturados *in vitro* apresentam níveis mais altos de transcrição de

FABP3, do que COCs maturados *in vivo* (DEL COLLADO et al., 2017). Portanto, o maior conteúdo lipídico observado em oócitos de animais HS deve ter sido facilitado pela ação de FABP3. É comum o aumento da atividade mitocondrial durante o processo de maturação, porém espera-se que a atividade esteja relacionada com o consumo de lipídios pela vida da  $\beta$ -oxidação, reduzindo assim o conteúdo lipídico (CASTANEDA et al., 2013).

Acreditamos que as mitocôndrias do grupo HS tenham sofrido um desvio de função, uma vez que as mitocôndrias exercem controle tanto na peroxidação lipídica como na apoptose (DUCHEN, 2004), assim as mitocôndrias não estariam com foco na produção de ATP para o processo de maturação, e sim efetuando outras funções em resposta ao estresse térmico sofrido *in vivo*. Vale ressaltar que os oócitos imaturos, de animais HS, possuíam a menor atividade mitocondrial em relação aos demais grupos. A expressão de MTCH2 em oócitos e células do cumulus, estava aumentada no grupo HS em comparação ao grupo PF. A expressão de MTCH2 participa da homeostase lipogênica e em caso de falta de nutrientes funciona como uma resposta citoprotetora. MTCH2 está envolvido na lipogênese e transmite as informações para a maquinaria de fusão mitocondrial para promover o alongamento das mitocôndrias, colaborando com a maior produção de energia e sobrevivência celular sob condições de fome (MARYANOVICH et al, 2015; LABBÉ et al., 2021). Isso justifica o aumento da atividade mitocondrial em oócitos de animais HS após a MIV. Diante disso, nossa hipótese é de a maior quantidade de lipídios de oócitos observada após a MIV no grupos HS seja influenciada pelo menor consumo de lipídios pelas mitocôndrias danificadas.

O presente estudo, demonstrou que, apesar de haver maior conteúdo lipídico após a MIV no grupo HS, grande consumo de TGs foi detectado no grupo neste período (tabela 4). Outro estudo, que também investigou o estresse térmico durante a MIV, verificou um acentuado consumo de TG (HOOPER et al., 2015), porém a redução de TGs aparentemente é uma consequência natural da MIV, pois estas moléculas são usadas como fonte de energia para a produção de ATP durante a maturação para a síntese de proteínas, que é essencial para a retomada da meiose, e maturação citoplasmática. (FERGUSON E LEESE, 1999; KIM et al,

2001; CETICA et al, 2002; FERGUSON E LEESE, 2006). Outro estudo demonstrou que inibir o metabolismo de TGs *in vitro* e impedir a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias leva a uma queda na viabilidade de oócitos de fêmeas bovinas e suínas (STURMEY; STURMEY; LEESE, 2003). Nesse sentido, apesar de aparentemente o consumo de TGs ser uma consequência natural da MIV, acredita-se que em excesso pode ser prejudicial à viabilidade oocitária antes e após a MIV. No entanto, a relação do maior consumo de TGs após a MIV de COCs provenientes de doadoras submetidas a estresse térmico ainda precisa ser melhor esclarecida.

Menores quantidades de moléculas de TG corresponde com uma menor expressão de ELOVL5 (células do cumulus) (SUDANO et al., 2016), a expressão do referido gene corresponde a formação de gotas lipídicas e controle de lipotoxicidade. Corroborando com os resultados deste estudo em células do cumulus, onde no grupo HS teve menor expressão de ELOVL5 após a MIV e menor quantidade de TGs.

Foram observados alguns lipídios comuns entre oócitos, células cumulus e o meio de cultivo, os quais possuem predominantemente os ácidos graxos esteárico (18:0), oleico (18:1) e linolênico (18:2) em sua composição, no entanto, o tipo de regulação após 24 horas de MIV, bem sempre apresentou comportamento similar entre as amostras. Já foi demonstrado que o ácido oleico (18:1) exerce um efeito positivo sobre o armazenamento de lipídios, e que está em maior quantidade em oócitos de boa qualidade. Este AG também alivia os efeitos negativos dos ácidos palmíticos e esteáricos (AARDEMA et al., 2013; CHEN et al., 2020). Nossos resultados demonstraram que oócitos e células do cumulus de animais HS consumiram (down-regulated) mais TG com cadeias que continham estes ácidos graxos ao longo da maturação. O TG 18:0\_18:1\_18:1, estava up-regulated no meio de maturação após 24 horas de MIV, mas em contrapartida down-regulated nas células do cumulus e oócitos.

Foi verificada menor expressão de H2A em células do cumulus HS, comparada às PF, após a maturação. H2A é importante para a competência e desenvolvimento oocitário (CAIXETA et al., 2009) e portanto, indica comprometimento da qualidade oocitária após a MIV. A expressão de G6PD dos animais HS, foi maior em relação aos animais PF, mas não apresenta interação do

grupo com o período de maturação. Espera-se que a atividade desta proteína esteja diminuída após a maturação, se realmente a maturação foi concluída (MANGIA; EPSTEIN, 1975). Portanto, esse resultado é uma indicação de falha da maturação oocitária no grupo HS..

Está bem documentado que o HS causa subfertilidade em vacas leiteiras (NANAS et al., 2020) e a expressão de vários genes analisadas no presente estudo, corroboram com esta afirmativa, pois demonstram os danos causados nas vias de proteção dos COCs contra o estresse térmico e oxidativo. Como esperado, nos animais HS houve menor expressão de genes importantes para adaptação ao estresse, tais como ATF4 (nas células do cumulus e oócitos), HSPA4, HSPA5 e HSPA9 (células do cumulus).

Destacamos a importância do ATF4, que se trata de um regulador mestre que desempenha um papel crucial na adaptação ao estresse, regulando a transcrição de muitos genes (B'CHIR et al., 2013), e garantindo o fornecimento de aminoácidos para a biossíntese de proteínas e glutatona e protegendo as células contra o estresse oxidativo. A ativação dessa resposta integrada ao estresse demonstrou ter um papel especial na adaptação das células às consequências metabólicas da atividade do retículo endoplasmático (RE) (HARDING et al., 2003).

Outro mecanismo de enfrentamento ao estresse é a expressão das chaperonas moleculares, como as que fazem parte da família de proteínas de choque térmico (HSP70) (NITIKA et al., 2020). As HSPA9, HSPA4 e HSPA5 atuam nas mitocôndrias, no citosol e no RE respectivamente (TRIPATHY et al., 2021). As chaperonas estabilizam as cadeias polipeptídicas desdobradas durante o seu transporte para as organelas subcelulares; por exemplo, as proteínas transportadas através da membrana mitocondrial em conformações parcialmente desdobradas são estabilizadas por chaperonas moleculares no citosol. Assim, as localizações subcelulares de diferentes HSPs indicam o seu papel adicional como agentes de manutenção essenciais (TRIPATHY et al., 2021).

Há uma maior expressão de MAP2K2 em amostras de animais HS, comparados aos animais PF. Esse gene é responsável por estimular receptores de insulina (LAMAS-TORANZO; PERICUESTA; BERMEJO-ÁLVAREZ, 2018). Estudos que suplementaram a insulina no meio de cultivo de oócitos normais,

mostrou um aumento da MAP2K2, porém menores taxas de blastocistos foram obtidas (LASKOWSKI et al., 2017), o fato da expressão desse gene estar maior nos oócitos e células do cumulus de animais HS pode ser um indício de que essas células ainda estavam lutando pela sobrevivência ao estresse térmico.

A expressão de SOD1 foi maior nos animais HS, comparados aos animais PF. A ação deste gene está envolvida no controle de ROS. As SODs são bem conhecidas por mediar a dissociação dos radicais superóxido em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (KHAN et al., 2021).

A expressão de genes (HSPD1 e HSPE1) marcadores relacionados a mitochondrial unfolded protein (UPR mt) foi menor nos oócitos de animais HS, comparados a animais PF. De acordo com o nível de estresse, as UPRs podem suportar a sobrevivência celular ou induzir a apoptose. Em nível proteômico, foi demonstrado que os UPR mt são regulados positivamente em oócitos bovinos em resposta a concentrações elevadas de ácidos graxos e ROS durante a MIV (MAREI et al., 2019). A importância de proteína para a sobrevivência do oócito foi confirmada em um estudo em a deleção direcionada do UPR resultou em infertilidade feminina, com comprometimento da maturação do oócito, desenvolvimento embrionário de duas células, e falha na formação de blastocistos (SELI; WANG; HORVATH, 2019).

A Sirt 2, localizada no citoplasma com o objetivo de controlar a dinâmica do citoesqueleto (NORTH et al., 2014), apresentou menor expressão no tratamento HS em comparação ao grupo PF. Por outro lado a Sirt 1 apresentou maior expressão no tratamento HS em comparação ao grupo PF (em oócitos e cumulus). A Sirt1 está localizada no núcleo, e é responsável por regular o ciclo celular a proliferação, reparo de DNA, remodelamento da cromatina além da regular a função mitocondrial (FERREIRA et al., 2022). Essa avaliação pode sugerir que a dinâmica do citoesqueleto pode ser prejudicada em oócitos de animais que estão expostos ao calor, porém aciona alguns mecanismos de defesa, que tentam reorganizar a cromatina, para proteger o seu material nuclear.

Na figura 9 está ilustrada a influência do estresse térmico *in vivo* sob a maturação *in vitro* de complexo cumulus oócitos de vacas leiteiras, de acordo com os resultados deste estudo.

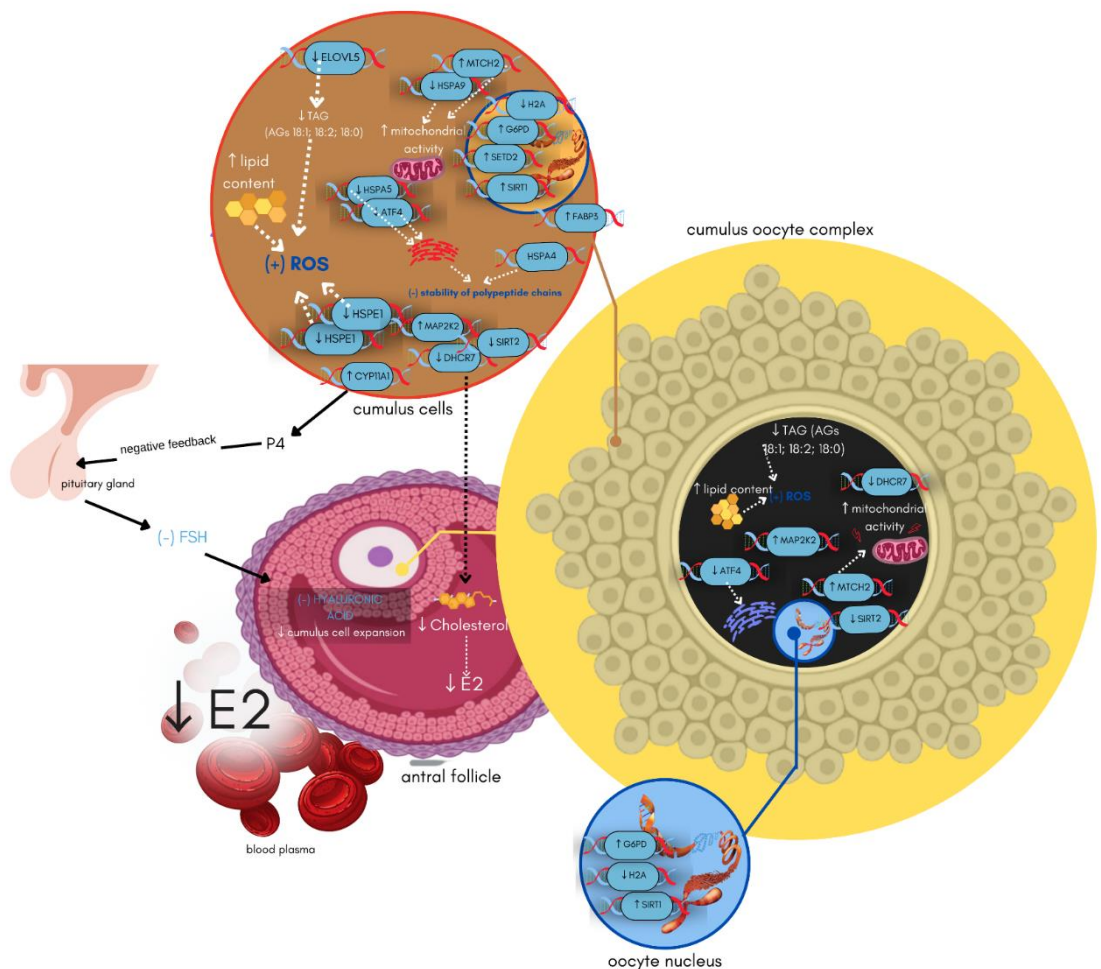


Figura. 9 Em vacas holandesas, o estresse térmico (HS) in vivo por sete dias reduziu a qualidade de oócitos (Oo) maturados in vitro, fato observado pela menor expansão das células do cumulus (CC) após a MIV. Foi observado que no plasma sanguíneo (BP) e no fluido folicular (FF) havia menor concentração de estradiol (E2). Entre as vias metabólicas avaliadas, o maior número de alterações ocorreu nas CC. Houve menor expressão de DHCR7 (CC e Oo), responsável pela síntese de colesterol, que por sua vez é precursor de hormônios esteroides. Houve um aumento do gene CYP11A1 (CC), contudo não houve redução de P4, mas provavelmente havia P4 suficiente para induzir um feedback negativo na hipófise e resultar na redução da produção de FSH, e como consequência reduzir também a produção de E2 e após a MIV reduzir a produção de ácido hialurônico, responsável por auxiliar na expansão das CC. Ademais, o estresse térmico in vivo contribuiu para o aumento de ROS durante a MIV, pois houve um aumento significativo do conteúdo lipídico e redução da ação dos mecanismos que auxiliam o controle da lipotoxicidade, como a redução da expressão de ELOVL5 (CC), que é mediador da formação de TAG (CC e Oo), constituídas principalmente por ácidos graxos (AGs) esteárico (18:0), oléico (18:1) e linolênico (18:2). Além disso, a redução de HSPE1 e HSPD1 (CC), marcam atividades das UPRmt, que deveriam ser reguladas positivamente em resposta a concentrações elevadas de ácidos graxos e ROS. Alguns mecanismos de sobrevivência foram acionados, como a maior expressão de MAP2K2 (CC e Oo - ativa receptores de insulina), FABP3 (CC - mediadora do transporte de AGs entre CC e Oo), SIRT1 (CC e Oo - responsável por regular o ciclo celular e a proliferação, reparo de DNA) e MTCH2 (CC e Oo - maior produção de energia e sobrevivência celular sob condições estressantes). MTCH2 também pode ter colaborado para o aumento da atividade mitocondrial apresentado, pois está envolvida na lipogênese e transmite as informações para a maquinaria de fusão mitocondrial para promover o alongamento mitocondrial. A redução da expressão dos genes relacionados à resposta ao estresse, HSPA4, HSPA5, HSPA9 (CC e Oo) e ATF4 (CC e Oo), indicam exaustão desse sistema. A redução

da expressão de H2A (CC e Oo) e aumento da expressão de G6PD (CC e Oo) e SETD2 (CC), indicam menor competência dos oócitos. TAG: triglicerídeos; E2: estradiol; Eventos descritos na cor azul na figura não foram avaliados neste estudo, contudo diante dos resultados observados e a literatura, são atividades com alta chance de serem confirmadas.

## 5. Conclusão

Conclui-se que os fenômenos de resposta ao estresse térmico que culminam com a falha na maturação dos COCs passam por falhas na expressão dos genes relacionados à ação das proteínas chaperonas, controle do estresse oxidativo, esteroidogênese (expansão das células cumulus), organização do citoesqueleto e da cromatina e estão intimamente relacionados ao metabolismo lipídico de COCs submetidos à maturação *in vitro*. Logo após os 7 dias de estresse térmico em câmara climática observa-se redução do conteúdo lipídico de oócitos e células cumulus, e possivelmente, na tentativa de reverter o quadro durante a maturação *in vitro*, maior conteúdo lipídico é observado no grupo HS, facilitado pela maior expressão de FABP3 e danos na atividade mitocondrial. O perfil lipídico indica redução dos triglicerídeos, especialmente daqueles compostos pelos ácidos linoleico e linolênico.

## 6. Referencias

AARDEMA, H. et al. Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. **Biology of reproduction**, v. 88, n. 6, 2013.

B'CHIR, W. et al. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 16, 2013.

BROCHADO SOUZA-CÁCERES, M.; DE, F.; MELO-STERZA, A. Metilação de histonas em oócitos e embriões mamíferos Methylation of histones in mammalian oocytes and embryos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, n. 2, p. 620–627, 2017.

CAIXETA, E. S. et al. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental

competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655–664, 17 jun. 2009.

CASTANEDA, C. A. et al. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 417–422, 1 fev. 2013.

CETICA, P. et al. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**, v. 124, n. 5, p. 675-681, 2002.

CHEN, Z. et al. Lipidomic profiling of dairy cattle oocytes by high performance liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry for developmental competence markers. **Theriogenology**, v. 144, p. 56–66, 1 mar. 2020.

DEL COLLADO, M. et al. *In vitro* maturation impacts cumulus–oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction**, v. 154, n. 6, 2017.

DUCHEN, M. R. Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology. **Molecular Aspects of Medicine**, ago. 2004.

EPPIG, J. J. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte–cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. **Nature** 1979 281:5731, v. 281, n. 5731, p. 483–484, 1979.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Molecular reproduction and development**, v. 73, n. 9, p. 1195-1201, 2006.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Reproduction**, v. 116, n. 2, p. 373-378, 1999.

FERREIRA, A. F. et al. Spatiotemporal dynamics of SIRT 1, 2 and 3 during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 186, p. 60–69, 1 jul. 2022.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Seasonal Effect on Germinal Vesicle-Stage Bovine Oocytes Is Further Expressed by Alterations in Transcript Levels in the Developing Embryos Associated with Reduced Developmental Competence 1. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 1, p. 1–9, 2012.

GHANEM, N. et al. Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced *in vitro* and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 238–250, 15 jul. 2014.

GIL, A. et al. One- vs two-phase extraction: re-evaluation of sample preparation procedures for untargeted lipidomics in plasma samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 23, p. 5859–5870, 1 set. 2018.

HARDING, H. P. et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Molecular Cell**, v. 11, n. 3, 2003.

HELD-HOELKER, E. et al. Cryosurvival of *in vitro* produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. **Theriogenology**, v. 96, p. 145–152, 2017.

HOOPER, Leah M. et al. Impact of heat stress on germinal vesicle breakdown and lipolytic changes during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, n. 5, p. 459-464, 2015.

KHAN, A. et al. Sod1 gene silencing promotes apoptosis and suppresses proliferation of heat-stressed bovine granulosa cells via induction of oxidative stress. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 12, 2021.

KIM, J. Y. et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 131-138, 2001.

LABBÉ, K. et al. The modified mitochondrial outer membrane carrier MTCH2 links mitochondrial fusion to lipogenesis. **Journal of Cell Biology**, v. 220, n. 11, 2021.

LAMAS-TORANZO, I.; PERICUESTA, E.; BERMEJO-ÁLVAREZ, P. Mitochondrial and metabolic adjustments during the final phase of follicular development prior to IVM of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 119, p. 156–162, 1 out. 2018.

LASKOWSKI, D. et al. Insulin during *in vitro* oocyte maturation has an impact on development, mitochondria, and cytoskeleton in bovine day 8 blastocysts. **Theriogenology**, v. 101, p. 15–25, 1 out. 2017.

LENZ, R. W. et al. *In vitro* Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes are Temperature-Dependent Processes. **Biology of Reproduction**, v. 29, n. 1, p. 173–179, 1 ago. 1983.

MANGIA, F.; EPSTEIN, C. J. Biochemical studies of growing mouse oocytes: Preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. **Developmental Biology**, v. 45, n. 2, 1975.

MAREI, W. F. A. et al. Alpha-linolenic acid protects the developmental capacity of bovine cumulus–oocyte complexes matured under lipotoxic conditions *in vitro*†. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 6, p. 1181–1196, 1 jun. 2017.

MAREI, W. F. A. et al. Mitochondria-targeted therapy rescues development and quality of embryos derived from oocytes matured under oxidative stress conditions: a bovine *in vitro* model. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 34, n. 10, p. 1984–1998, 2 out. 2019.

MARYANOVICH, M. et al. ARTICLE An MTCH2 pathway repressing mitochondria metabolism regulates haematopoietic stem cell fate. **Nature Communications**, 2015.

MAYA-SORIANO, M. J.; TABERNER, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Retinol improves *in vitro* oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. **Zygote**, v. 21, n. 4, p. 377–384, nov. 2013.

NABENISHI, H. et al. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. **Molecular reproduction and development**, v. 79, n. 1, p. 31–40, jan. 2012.

NANAS, I. et al. A study on stress response and fertility parameters in phenotypically thermotolerant and thermosensitive dairy cows during summer heat stress. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 55, n. 12, p. 1774–1783, 1 dez. 2020.

NITIKA et al. Post-translational modifications of Hsp70 family proteins: Expanding the chaperone code. **Journal of Biological Chemistry**, 2020.

NORTH, B. J. et al. SIRT2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 13, p. 1438–1453, 1 jul. 2014.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, p.509-515, 2004

PAYTON, R. R. et al. Impact of Heat Stress Exposure during Meiotic Maturation on Oocyte, Surrounding Cumulus Cell, and Embryo RNA Populations. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p. 1104050365–1104050365, 2011.

REGASSA, A. et al. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. 2011.

RISPOLI, L. A. et al. Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. **Reproduction**, v. 146, n. 2, p. 193–207, 1 ago. 2013.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 129, n. 2, p. 235–244, fev. 2005.

SELI, E.; WANG, T.; HORVATH, T. L. Mitochondrial unfolded protein response: a stress response with implications for fertility and reproductive aging. **Fertility and sterility**, v. 111, n. 2, p. 197–204, 1 fev. 2019.

SHAO, W. et al. Histone Methyltransferase SETD2 Is Required for Porcine Early Embryonic Development. **Animals**, v. 12, n. 17, 1 set. 2022.

STURMEY, R.; STURMEY, R. G.; LEESE, H. J. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. **Reproduction**, v. 126, p. 197–204, 2003.

SUDANO, M. J. et al. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 472- 484.e1, 2016.

TAKAHASHI, T. et al. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction, fertility, and development**, v. 25, n. 4, p. 589–599, 2013.

TRIPATHY, K. et al. In Silico Analysis of HSP70 Gene Family in Bovine Genome. **Biochemical Genetics**, v. 59, n. 1, 2021.

YAMASHITA, Y. et al. Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1193–1198, 1 abr. 2003.

ZOLINI, A. M. et al. Effect of addition of l-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v. 133, p. 135–143, 2019.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados deste estudo demonstraram que as vias de resposta ao estresse térmico e nutricional são claramente diferentes. Quanto aos oócitos imaturos, a restrição alimentar por 7 dias, causou danos mais brandos do que o estresse térmico pelo mesmo período e isto foi demonstrado por alterações do metabolismo lipídico e atividade mitocondrial. De forma clara, também foi demonstrado que o conteúdo lipídico e o perfil lipídico estão positivamente correlacionados com a viabilidade oocitária, fato respaldado pela menor concentração de estradiol no líquido folicular e soro sanguíneo, menor quantidade de TGs e PCs, menor quantidade de AG insaturados, menor atividade mitocondrial, maior expressão de genes relacionados a modificações epigenéticas ligadas a heterocromatina e menor expressão dos genes relacionados a esteroidogênese, a função mitocondrial, estresse oxidativo.

Ao submeter esses oócitos a maturação *in vitro*, podemos observar que ocorre um aumento do conteúdo lipídico após 24 horas de maturação, porém em nossos resultados o aumento da quantidade de lipídios não foi relacionado à produção de ATP ou ao estresse oxidativo. O estresse térmico provocou o aumento da atividade mitocondrial após o período de maturação, o que possivelmente acontece, não para produzir mais ATP, mas para realizar mecanismos de sobrevivência, quando expostas ao estresse térmico. A expressão de genes que compactam a cromatina estava reduzida em animais que passaram por estresse térmico.

## IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO

Esse é o primeiro estudo que avalia quais as principais vias metabólicas impactadas pelo estresse térmico *in vivo* sobre a maturação de oócitos *in vitro*, de vacas leiteiras, com a caracterização lipídômica desde o soro sanguíneo, passando pelo fluido folicular, células do cumulus até os oócitos. Além da avaliação de uma representativa quantidade de genes, relacionados a produção de ATP, gotas lipídicas, estresse oxidativo, e regulação de fatores epigenéticos, além da avaliação da atividade mitocondrial e conteúdo lipídico.

A presente proposta acrescentou dados sobre mecanismos básicos ainda pouco explorados pela literatura e que podem trazer conhecimentos importantes para a pesquisa básica. Tais conhecimentos auxiliarão no esclarecimento de resultados encontrados dando portanto subsídios para a otimização das tecnologias atualmente utilizadas.

Com os resultados dessa pesquisa pretende-se publicar pelo menos 2 artigos científicos, em periódico qualis A2, fator de impacto 2,923. Já foram publicados a partir deste trabalho 4 resumos em congressos internacionais, (19<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Bologna (ITALY), 26<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> Junho 2022; 35<sup>a</sup> Reunião anual da Sociedade Brasileira de tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu (BRASIL) agosto de 2022) e já estão aprovados para publicação 3 resumos na 36<sup>a</sup> Reunião anual da Sociedade Brasileira de tecnologia de Embriões, Campinas (BRASIL) agosto de 2023.

Este Projeto colaborou com a manutenção de parcerias internacionais, não só pelo apoio técnico, mas com o financiamento da pesquisa com agências de fomento internacionais, a manutenção desse tipo de parceria é fundamental para o avanço da ciência. O projeto foi idealizado durante o estágio pós-doutoral da co-orientadora Fabiana no Leibniz Institute For Farm Animal Biology (FBN), localizado na Alemanha. E é um sub-projeto que compõe o projeto temático, Leaky Cow, financiado pelo DFG (agência de fomento alemã). É coordenado pela Dr. Fabiana Melo Sterza e o Dr. Ralf Poehland e conta com a colaboração de vários outros pesquisadores alemães. As atividades laboratoriais desse sub-projeto foram financiadas pelo próprio instituto (FBN).

## Anexos

Anexo 1 Detalhes de Primers usados na PCR

| Gene    | Genebank       | other alternatives (geneBank)                 | Tm                 | product length |
|---------|----------------|-----------------------------------------------|--------------------|----------------|
| ATF4    | NM_001034342.2 | GGTGGCCAAGCACTTCAAAC<br>AAGCATCCTCCTTGCTGTTGT | 60.25 F<br>60.20 R | 113            |
| ATF6    | XM_024989877.1 | CGAGGATGGGTTCATAGGCA<br>GACGGCCATGAGCTGAGAAT  | 59.24 F<br>60.18 R | 126            |
| ATP5A1  | NM_174684.2    | CCGCCCTGCCATTAATGTTG<br>TCAGAACCGAACTGGGCAAA  | 59.90 F<br>59.82 R | 144            |
| BAX     | NM_173894.1    | AGCAGATCATGAAGACAGGGG<br>ACACTCGCTCAGCTTCTTGG | 59,51 F<br>60,32 R | 137            |
| BCL2    | NM_001166486.1 | CCTGTGGATGACCGAGTACC<br>CAGACTGAGCAGTGCCTTCA  | 59.54 F<br>59,97 R | 148            |
| CAT     | NM_001035386.2 | CTATCCTGACACTCACCGCC<br>GAAAGTCCGCACCTGAGTGA  | 59.97 F<br>59,96 R | 118            |
| CPT1A   | XM_024987034.1 | CCTTTCCTGAAGGAGGCACC<br>GTGGCGGATACACGGAGTAA  | 60.32 f<br>59.54 r | 123            |
| CS      | NM_001044721.1 | CCGCCATGGCTTTACTCACT<br>ACTCTGGTCTGCTCCTTAGGT | 60.39 F<br>59.92 R | 148            |
| CYP11A1 | NM_176644.2    | CGTGGCCCATCTCTTCAAGT<br>GACCACCCGGTCTTTCTTCC  | 60,04 F<br>60,32 R | 142            |
| CYP19A1 | NM_174305.1    | GGTGTCCGAAGTTGTGCCTA<br>ACCTGCAGTGGGAAATGAGG  | 59,97 F<br>59,96 R | 146            |
| DHCR7   | NM_001014927.1 | GCCTGTGGAGCATAGGAGTC<br>GGGCCCTCCAACCTCTTTC   | 59.89F<br>60.00R   | 100            |

|         |                |                                                      |                    |     |
|---------|----------------|------------------------------------------------------|--------------------|-----|
| DNMT3A  | XM_024998368.1 | CGGGTCACAGCTTGAGAGAG<br>ACCTTCTGAGACTCGGTGGA         | 60.11 F<br>59.89 R | 109 |
| ELOVL5  | NM_001046597.1 | TTCTTCTGTCAGGGCACACG<br>GACCGTGATCTGGTGGTTGT         | 60.25 F<br>59.97 R | 144 |
| G6PD    | NM_001244135.2 | CGCTGGGACGGGGTGCCCTTCATC<br>CGCCAGGCCTCCCGCAGTTCATCA | 60.01 F<br>60.18 R | 111 |
| G9a     | NM_001272159.1 | TGTGCCGTGATGAACGAGAA<br>CTGTGTGGCTTCCAAGTTGC         | 59.97f<br>59.97r   | 135 |
| GAPDH   | NM_001034034.2 | AGCCGTAACCTTCTGTGCTGT<br>ATGGCGACGATGTCCACTTT        | 59.61 F<br>60.04 R | 135 |
| GPX1    | NM_174076.3    | GCAACCAGTTTGGGCATCAG<br>GCCATTACCTCGCACTTTT          | 60.04 F<br>59.40 R | 125 |
| H2A     | NM_174809.2    | GAATTCGAAATGGCTGGCGG<br>GTGTCGATGAATACGGCCCA         | 60.25 F<br>60.18 R | 117 |
| HSP90B1 | NM_174700.2    | TAAGCTGTATGTGCGCCGAG<br>AGGGGAGATCATCCGAGTCC         | 60.53 f<br>60.18 R | 104 |
| HSPA1A  | NM_203322.3    | GGGAGGACTTCGACAACAGG<br>GTGCTGGACGACAAGGTTCT         | 60.04 f<br>60.25 r | 145 |
| HSPA4   | NM_001114192.2 | GCCGAGCATTCTCTGATCCA<br>GTCACCTGCTCCGTGGTAAA         | 59.89 F<br>59.97 R | 139 |
| HSPA5   | NM_001075148.1 | CGTGCGTTTGAGAGCTCAGTA<br>TTCATCTTTCCAGCGCCGT         | 60.67 F<br>60.00 R | 120 |
| HSPA9   | NM_001034524.2 | ACCAACTGCCTGCTGATGAA<br>CCGCCTGCCTTATGTTTTCG         | 59.89 F<br>59.90 R | 108 |
| HSPD1   | XM_015458500.1 | CTACTGTACTGGCACGCTCT<br>CGGGGGTTGTACAGGTTTA          | 59.19 F<br>59.89 R | 150 |
| HSPE1   | NM_174346.2    | GAGAGCAGGGTACGAACTGC<br>TTCGGCCGCACTTCTTTCAA         | 60.46 F<br>60.82 R | 105 |
| Jarid 2 | XM_005223839.4 | GTCCCCTTTTGCAATCAGCA<br>ACCCTTTCTTCTGACCACGG         | 59.03 F<br>59.60 R | 116 |
| KDM1B   | XM_024983858.1 | CTGGCTGAGGGACTGGACAT<br>ATCTGGGACCTCCTTCTGTGC        | 61.27 F<br>61.52 R | 123 |
| KMT2D   | XM_024992458.1 | CAGCAAGGTTGGTCCTTCGT<br>CAAAACATGCCAAGGACAGGG        | 60.54 F<br>60.00 R | 100 |
| LDHA    | NM_174099.2    | GTCAGCAGTCTGGCAGCTAT<br>TGCCATCTTGGACTTAGACCC        | 59.82 F<br>59.44 R | 124 |
| MAP2K2  | NM_001038071.2 | ACATTGTGAACGAGCCTCCTC<br>AGGTGTGGTTCATGAGCATCT       | 60.34F<br>59.37R   | 132 |
| SETD2   | XM_024983287.1 | ACAGCAGAAGCAGACACCTC<br>TTCCCGGTAAGGGTTCAGGC         | 59.97 f<br>59.96 r | 105 |
| SF1     | XM_024987278.1 | ATGGTGGACATCCCATGCAG<br>AGGCGTACTTCCCAGGTACT         | 60.11 F<br>59.96 R | 143 |
| SIRT1   | XM_015461011.2 | AGCATTGAAGCATTATTTGGGGG<br>TCCACTGCACAGGCACATAC      | 59.86 f<br>60.32 r | 103 |

|        |                |                                                   |                    |     |
|--------|----------------|---------------------------------------------------|--------------------|-----|
| SIRT2  | M_001113531.1  | GCCAGACTGACCCTTTCCTC<br>CTTCCATCCAAGGAGGTCGG      | 60.04 F<br>59.82 R | 143 |
| SLC2A1 | NM_174602.2    | CATTGTGGGCATGTGCTTCC<br>AATCTCATCGAAGGTCCGGC      | 60.11 F<br>59.89 R | 142 |
| SLC2A5 | NM_001101042.2 | AGTTCGGTGTGGAATGCAGG<br>TGCCCACCATGCTTCAGG        | 60.61F<br>59.96 R  | 117 |
| Star   | NM_174189.3    | CCCATGGAGAGGCTTTATGA<br>TGATGACCGTGTCTTTTCCA      | 56.67 F<br>57.08 R | 124 |
| TFAM   | NM_001034016.2 | AGGAAGCTAGGGATGGCACA<br>GTTCTCCCAAGATTTTCATTTCTG  | 60.62 F<br>59.54 R | 150 |
| DNMT1  | XM_015471992.2 | AAAAGCCAGGGTTGCCTGT<br>CCAAATCTTTGAGCCGCCTG       | 60.08 F<br>59.83 R | 143 |
| HDAC1  | NM_001037444.2 | TTACGACGGGGATGTTGGAA<br>GGCTTTGTGAGGGCGATAGA      | 59.02 F<br>59.82 R | 136 |
| ACSL3  | XM_006079644.4 | CCACAGACTTTAGCAGATCAGTCTT<br>CGATCCATGATTTCCGGGAC | 60,57 F<br>58,49 R | 107 |
| ELOVL6 | XM_040237470.1 | TCAGTTGCCTTGGGCTTTCA<br>CCCAGCTCAAGAACTTCGGT      | 60.11 F<br>59,96 R | 127 |
| FABP3  | NM_174313.2    | AGAGACATCACTTGTGCGGG<br>AGGTCATGCCTGTTTCTCGT      | 60,04 f<br>59.31 R | 103 |

Anexo 2 Expressão de genes em oócitos imaturos de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico ou restrição nutricional por sete dias. **(Artigo 1)**

|         | HS     | HS (EP) | C      | C (EP) | PF       | PF (EP) | Valor de P |
|---------|--------|---------|--------|--------|----------|---------|------------|
| ACSL3   | 23     | 0.3658  | 27     | 0.2892 | 26       | 0,4089  | 0,75       |
| ATF4    | 3,47   | 0,7     | 2,92   | 0,5    | 3,07     | 0,9     | 0,82       |
| ATP5A1  | 789,88 | 176,75  | 741,31 | 139,73 | 985      | 197,61  | 0,6        |
| BAX     | 84     | 12      | 87     | 0,9253 | 57       | 13      | 0,17       |
| BCL2    | 985    | 307,63  | 498,6  | 217,53 | 101      | 307,63  | 0,175      |
| CAT     | 9,63   | 109,03  | 131,77 | 86,19  | 6,51     | 121,9   | 0,59       |
| CPT1A   | 790,14 | 150,49  | 863,56 | 118,97 | 985      | 168,25  | 0,69       |
| CS      | 3,4    | 0,64    | 4,3    | 0,5    | 4,1      | 0,71    | 0,56       |
| CYP11A1 | 789,78 | 203,61  | 741,17 | 160,97 | 741,28   | 227,64  | 0,98       |
| CYP19A1 | 790,4  | 176,82  | 740,81 | 139,79 | 985      | 197,69  | 0,6        |
| DHCR7   | 4,49 B | 117,03  | 4,78 B | 92,52  | 495,42 A | 131     | 0,01       |
| DNMT1   | 985    | 14,22   | 863,57 | 117,18 | 741,4    | 165,72  | 0,56       |
| DNMT3A  | 5,37   | 0,56    | 6,3    | 0,44   | 7,5      | 0,62    | 0,06       |
| ELOVL5  | 0,7    | 0,2     | 0,5    | 0,16   | 1,1      | 0,23    | 0,22       |

|         |        |        |          |        |          |        |        |
|---------|--------|--------|----------|--------|----------|--------|--------|
| FABP3   | 395,4  | 210,05 | 493,88   | 166,05 | 3,1      | 234,84 |        |
| G6PD    | 595,29 | 227,56 | 619,97   | 179,9  | 256,69   | 164,42 | 0,49   |
| G9a     | 7,3    | 0,61   | 7,8      | 0,48   | 8,1      | 0,68   | 0,62   |
| GAPDH   | 2,64   | 0,3    | 2,95     | 0,2    | 2,4      | 0,39   | 0,58   |
| GPX1    | 5,7    | 0,29   | 5        | 0,23   | 4,79     | 0,32   | 0,68   |
| H2A     | 7,6 B  | 0,5    | 7,2 B    | 0,38   | 9,5 A    | 0,57   | 0,009  |
| HDAC1   | 4,99   | 0,4    | 5,2      | 0,3    | 5,1      | 0,4    | 0,8    |
| HSP90B1 | 1,8 A  | 0,2    | 1,6 A    | 0,17   | 0,5 B    | 0,24   | 0,006  |
| HSPA1A  | 0,4    | 0,3    | 1,5      | 0,3    | 0,8      | 0,4    | 0,09   |
| HSPA4   | 0,7    | 0,3    | 1,3      | 0,2    | 1,8      | 0,3    | 0,108  |
| HSPA5   | 2,7    | 0,5    | 2,5      | 0,4    | 3,1      | 0,5    | 0,71   |
| HSPA9   | 1,9    | 0,4    | 1,7      | 0,3    | 2,8      | 0,5    | 0,23   |
| HSPD1   | 3,9 B  | 117,37 | 4,3 B    | 92,79  | 494 A    | 131,23 | 0,01   |
| HSPE1   | 1,6 B  | 117,65 | 1,8 B    | 93     | 492,85 A | 131,53 | 0,01   |
| JArid   | 3,2    | 0,3    | 3,07     | 0,26   | 3,09     | 0,37   | 0,95   |
| KDM1A   | 3,3 AB | 0,2    | 3,7 A    | 0,2    | 2,39 B   | 0,2    | 0,007  |
| KDM1B   | 13,4   | 266    | 256,55   | 188    | 985      | 266    | 0,1    |
| KMT2D   | 7,8 AB | 0,3    | 8,6 A    | 0,2    | 7,2 B    | 0,4    | 0,04   |
| LDHA    | 3,5    | 1,1    | 3,5      | 0,9    | 0,8      | 1,3    | 0,2    |
| MAP2K2  | 592,54 | 209,68 | 494,79   | 165,77 | 6,03     | 234,43 | 0,17   |
| MTCH2   | 594,19 | 208    | 496,91   | 165    | 5,1      | 233    | 0,16   |
| PLIN3   | 7,07   | 100    | 8,8      | 79,7   | 253,7    | 112,78 | 0,19   |
| SETD2   | 593,43 | 209,3  | 495,34   | 165,5  | 6,5      | 234,07 | 0,17   |
| SF1     | 1,4    | 192    | 498,28   | 152    | 255,14   | 215    | 0,17   |
| SIRT1   | 985 A  | 0,28   | 985,00 A | 0,22   | 9,57 B   | 0,31   | <0,001 |
| SIRT2   | 5,3 B  | 116    | 6,2 B    | 92     | 498 A    | 130    | 0,01   |
| SLC2A1  | 4,6 B  | 0,5    | 6,06 AB  | 0,4    | 7,4 A    | 0,6    | 0,02   |
| SOD1    | 593,8  | 232,03 | 497,1    | 193,43 | 251,8    | 259,85 | 0,6    |
| Star    | 5,3    | 1,5    | 6,6      | 1      | 6,3      | 1,5    | 0,7    |
| TFAM    | 7,5    | 159    | 129,69   | 120    | 497      | 178    | 0,14   |

(HS) ou restrição alimentar (PF) por sete dias. (C): grupo controle. EP: erro padrão. Letras maiúsculas na mesma linha indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey  $P < 0,05$ .

Anexo 3 Expressão de genes em células do cumulus imaturos de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico ou restrição nutricional por sete dias (**Artigo 1**).

|        | HS     | HS (EP) | K      | K (EP) | PF     | PF (EP) | Valor de P |
|--------|--------|---------|--------|--------|--------|---------|------------|
| ACSL3  | 6      | 1,1     | 8      | 1,3    | 6      | 1,1     | 0,51       |
| ATF4   | 3,01 A | 0,3     | 2,9 A  | 0,3    | 1,47 B | 0,4     | 0,008      |
| ATP5A1 | 105,52 | 96,26   | 286    | 115,06 | 6,5    | 96,026  | 0,19       |
| BAX    | 6      | 1       | 6      | 1,07   | 3      | 1       | 0,07       |
| BCL2   | 790,78 | 217,64  | 741,83 | 243,33 | 594    | 217,64  | 0,808      |

|         |          |        |           |        |          |        |         |
|---------|----------|--------|-----------|--------|----------|--------|---------|
| CAT     | 6,9      | 58,46  | 146,63    | 69,87  | 4,03     | 58,46  | 0,24    |
| CPT1A   | 105,65   | 84,59  | 6,3       | 101,11 | 106,2    | 84,59  | 0,7     |
| CS      | 6,1      | 0,7    | 7,1       | 0,8    | 5,3      | 0,7    | 0,3     |
| CYP11A1 | 493,43 A | 130    | 423 AB    | 155    | 2,01 B   | 130    | 0,03    |
| CYP19A1 | 2,9      | 58,64  | 144,04    | 70,09  | 2,9      | 58,64  | 0,24    |
| DHCR7   | 1,6 B    | 100,34 | 2,3 B     | 119,93 | 493,45 A | 100    | 0,002   |
| DNMT1   | 594,49   | 150,71 | 426,34    | 180,14 | 203,84   | 150,71 | 0,203   |
| DNMT3A  | 5,1      | 0,9    | 6,5       | 1,1    | 5,6      | 0,9    | 0,61    |
| ELOVL5  | 2,06     | 0,41   | 0,6       | 0,49   | 1,82     | 0,41   | 0,42    |
| ELOVL6  | 985 A    | 143    | 985 A     | 160    | 400,61 B | 143    | 0,02    |
| FABP3   | 494,20 A | 130,01 | 564,86 A  | 155,39 | 3,5 B    | 130,01 | 0,01    |
| G6PD    | 496,31 A | 129,59 | 425,75 AB | 154,89 | 7,97 B   | 129,59 | 0,03    |
| G9a     | 5,7      | 0,7    | 6,8       | 0,8    | 5,8      | 0,7    | 0,58    |
| GAPDH   | 2,3      | 0,5    | 1,6       | 0,6    | 2,9      | 0,5    | 0,38    |
| GPX1    | 3,6      | 0,4    | 2,5       | 0,48   | 3,5      | 0,4    | 0,19    |
| H2A     | 2,2      | 0,3    | 2,3       | 0,4    | 2,3      | 0,3    | 0,98    |
| HDAC1   | 3,6      | 0,8    | 4,6       | 1,05   | 3,6      | 0,88   | 0,74    |
| HSP90B1 | 3,6      | 1,08   | 3,06      | 1,2    | 3,5      | 1,08   | 0,9     |
| HSPA1A  | 3,5      | 0,7    | 2,1       | 0,9    | 3,2      | 0,7    | 0,51    |
| HSPA4   | 2,3      | 0,7    | 3,6       | 0,78   | 2,4      | 0,7    | 0,4     |
| HSPA5   | 2,9      | 0,4    | 2,4       | 0,5    | 2,3      | 0,4    | 0,67    |
| HSPA9   | 2,4      | 0,3    | 2,1       | 0,37   | 0,6      | 0,3    | 0,69    |
| HSPD1   | 2,1 B    | 100,32 | 2,6 B     | 119,9  | 493,55 A | 100,32 | 0,002   |
| HSPE1   | 2,4 B    | 100,22 | 1,2 B     | 119,78 | 494,05 A | 100,22 | 0,002   |
| JArid   | 4,2      | 1,01   | 5,4       | 1,2    | 3,2      | 1,01   | 0,41    |
| KDM1A   | 4,6 AB   | 0,6    | 5,9 A     | 0,8    | 3,1 B    | 0,69   | 0,5     |
| KDM1B   | 985      | 116,99 | 985       | 130,8  | 790,99   | 116,99 | 0,44    |
| KMT2D   | 4,1      | 0,8    | 4,4       | 1,05   | 2,8      | 0,88   | 0,44    |
| LDHA    | 3,4      | 0,8    | 3,1       | 0,9    | 2,8      | 0,8    | 0,8     |
| MAP2K2  | 493,82 A | 130,12 | 424,31 AB | 155,52 | 4,5 B    | 30,12  | 0,03    |
| MTCH2   | 495,95 A | 129,56 | 126,63 AB | 154,85 | 3,6 B    | 129,56 | 0,02    |
| PLIN3   | 4,6      | 0,6    | 4,9       | 0,7    | 0,5      | 0,6    | 0,54    |
| SETD2   | 494,36 A | 202    | 425,22 BA | 183    | 2,9 B    | 202    | 0,03    |
| SF1     | 302,96   | 156,78 | 428,54    | 187,39 | 400,20   | 155,78 | 0,85    |
| SIRT1   | 985 A    | 0,52   | 985 A     | 0,63   | 5,5 B    | 0,52   | <0,0001 |
| SIRT2   | 4,6 B    | 99,80  | 5,5 B     | 119,29 | 496,08 B | 99,8   | 0,002   |
| SLC2A1  | 2,8      | 0,8    | 3,9       | 1,01   | 2,8      | 0,8    | 0,669   |
| SOD1    | 495,75 A | 202    | 426,67 AB | 183    | 5,9 B    | 202    | 0,03    |
| Star    | 204      | 117,74 | 8,2       | 131,64 | 8,5      | 117,74 | 0,43    |
| TFAM    | 3,4      | 1,1    | 4,7       | 1,3    | 6,3      | 1,14   | 0,21    |

(HS) ou restrição alimentar (PF) por sete dias. (C): grupo controle. EP: erro padrão. Letras maiúsculas na mesma linha indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey  $P < 0,05$ .

Anexo 4 Expressão de genes em oócitos de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico ou restrição nutricional *In vivo* por sete dias, e maturação *in vitro* (Artigo 2).

|         | HS-0h    | C-0h     | PF-0h    | HS-24h   | C-24h    | PF-24h    | Interação<br>(valor de P) | Maturação<br>(Valor de P) | Grupo<br>(valor de P) |
|---------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
| ATP5A1  | 789,8 AB | 741,3 AB | 985 A    | 985 A    | 822,56 A | 173,48 B  | 0,0085                    | 0,17                      | 0,18                  |
| BAX     | 8,35 AB  | 8,7 AB   | 5,6 AB   | 8,4 AB   | 9,999 A  | 5,09 B    | 0,7                       | 0,7                       | 0,005                 |
| DHCR7   | 4,4 B    | 4,7 B    | 495,41 A | 3,3 B    | 5,01 B   | 4944,63 A | 1,0                       | 0,9                       | 0,0007                |
| G6PD    | 595 B    | 619 B    | 255 A    | 595 B    | 660 B    | 10,919 A  | 0,7                       | 0,6                       | 0,03                  |
| H2A     | 7,06     | 7,5      | 9,5      | 7,8      | 9,14     | 9,3       | 0,2                       | 0,09                      | 0,005                 |
| HSP90B1 | 1,8 A    | 1,6 AB   | 0,59 B   | 1,7 AB   | 1,5 AB   | 1,62 AB   | 0,01                      | 0,46                      | 0,05                  |
| HSPD1   | 3,9 B    | 4,3 B    | 493,9 A  | 4,26     | 5,61     | 493,86    | 1                         | 0,9                       | 0,0007                |
| HSPE1   | 1,6 B    | 1,8 B    | 492,85 A | 1,6      | 2,4      | 492,57    | 1                         | 0,99                      | 0,007                 |
| KDM1A   | 3,3 ABC  | 3,7 AB   | 2,3 BC   | 3,2 ABC  | 4,2167 A | 2,1 C     | 0,4                       | 0,9                       | <0,0001               |
| MAP2K2  | 592,5 A  | 494,79 A | 6,03 B   | 592,66 A | 495,51 A | 6,18 B    | 1                         | 0,99                      | 0,0152                |
| MTCH2   | 594,19 A | 496,9 A  | 5,1 B    | 594,28 A | 497,68 A | 4,82 B    | 1                         | 0,99                      | 0,0142                |
| SIRT1   | 985 A    | 985 A    | 9,57 B   | 985 A    | 985 A    | 8,9 B     | 0,5                       | 0,4                       | <0,0001               |
| SIRT2   | 5,3 B    | 6,2 B    | 498 A    | 5,5 B    | 7,1 B    | 497,12 A  | 1                         | 1                         | 0,0006                |

Anexo 5 Expressão de genes em células do cumulus de vacas leiteiras submetidas a estresse térmico ou restrição nutricional *In vivo* por sete dias, e maturação *in vitro* (Artigo 2).

|         | HS-0h    | C-0h     | PF-0h    | HS-24h   | C-24h    | PF-24h   | Interação<br>(P-value) | Maturação<br>(P-value) | Grupo (P-value) |
|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|------------------------|-----------------|
| ACSL3   | 6,2      | 7,7      | 5,6      | 4,8      | 4,6      | 6,2      | 0,4                    | 0,2                    | 0,9             |
| ATF4    | 3 AB     | 2,9 AB   | 1,4 B    | 1,6 B    | 1,6 B    | 3,5 A    | <,0001                 | 0,4                    | 0,8             |
| ATP5A1  | 105      | 286      | 6,5      | 131,02   | 171,6    | 494,9    | 0,05                   | 0,2                    | 0,52            |
| BAX     | 5,8      | 6,3      | 3,3      | 5,4      | 5,7      | 4,2      | 0,7                    | 0,9                    | 0,06            |
| BCL2    | 790 A    | 741 A    | 594 A    | 7,2 B    | 5,8 B    | 5,4 B    | 0,8                    | <,0001                 | 0,82            |
| CAT     | 6,9      | 146,63   | 4,03     | 253,36   | 170,36   | 7,07     | 0,3                    | 0,2                    | 0,1             |
| CPT1A   | 105,66   | 6,3      | 106,2    | 8,11     | 7,44     | 105,94   | 0,7                    | 0,6                    | 0,5             |
| CS      | 6,1      | 7,1      | 5,3      | 7        | 6        | 104,98   | 0,4                    | 0,4                    | 0,4             |
| CYP11A1 | 493,42 A | 423,29 A | 2,0 B    | 493,05 A | 493,9A   | 3,3 B    | 0,9                    | 0,8                    | 0,0009          |
| CYP19A1 | 2,9 B    | 144 AB   | 2,9 B    | 619,81 A | 659,69 A | 594,42 A | 0,9                    | <,0001                 | 0,7             |
| DHCR7   | 1,6 B    | 2,3 AB   | 493,45 A | 1,7 B    | 2,2 AB   | 494,18 A | 1                      | 1                      | <,0001          |
| DNMT1   | 594,494  | 426,342  | 203,86   | 498,1    | 496,431  | 8,8930   | 0,7                    | 0,5                    | 0,009           |
| DNMT3A  | 5,1      | 3,5      | 5,6      | 5,3      | 5,6      | 104,44   | 0,4                    | 0,4                    | 0,4             |
| ELOVL5  | 2,06 B   | 2,6 AB   | 1,8 B    | 1,6 B    | 1,9 AB   | 4,07 A   | 0,02                   | 0,1                    | 0,06            |
| ELOVL6  | 985      | 985      | 400      | 985      | 985      | 595      | 0,7                    | 0,6                    | 0,007           |
| FABP3   | 494,2 A  | 564,85 A | 3,5 B    | 493,37 A | 493,66 A | 3,07 B   | 0,9                    | 0,8                    | 0,0004          |
| G6PD    | 496 A    | 425 A    | 7 B      | 618 A    | 495 A    | 202 A    | 0,9                    | 0,3                    | 0,007           |
| G9a     | 5,7      | 6,8      | 5,8      | 7,3      | 7,8      | 106,17   | 0,4                    | 0,3                    | 0,4             |
| GAPDH   | 2,3      | 1,7      | 2,9      | 1,6      | 2,1      | 2,6      | 0,5                    | 0,5                    | 0,1             |
| GPX1    | 3,6 A    | 2,5 AB   | 3,5 AB   | 2,1 AB   | 2,09 AB  | 1,9 B    | 0,3                    | 0,001                  | 0,3             |
| H2A     | 2,2 AB   | 2,3 AB   | 2,3 AB   | 1,2 B    | 2,2 AB   | 2,9 A    | 0,7                    | 0,6                    | 0,04            |
| HDAC1   | 3,6      | 4,5      | 3,6      | 3,4      | 3,2      | 4,6      | 0,2                    | 0,7                    | 0,8             |
| HSP90B1 | 3,7      | 3,3      | 3,7      | 2,3      | 3,6      | 4,1      | 0,3                    | 0,7                    | 0,4             |

|        |        |        |        |        |         |          |      |      |        |
|--------|--------|--------|--------|--------|---------|----------|------|------|--------|
| HSPA1A | 3,5    | 2,1    | 3,2    | 3,9    | 4,2     | 4,8      | 0,7  | 0,1  | 0,7    |
| HSPA4  | 2,6 AB | 3,3 AB | 2,5 AB | 1,9 B  | 2,5 AB  | 4,8 A    | 0,04 | 0,62 | 0,09   |
| HSPA5  | 2,9 B  | 2,4 B  | 2,3 B  | 2B     | 3,3 AB  | 4,6 A    | 0,04 | 0,15 | 0,26   |
| HSPA9  | 2,4 AB | 2,1 B  | 2,6 AB | 1,5 B  | 2,8 AB  | 4,1 A    | 0,01 | 0,2  | 0,008  |
| HSPD1  | 2,1 B  | 2,6 AB | 493 A  | 2,09 B | 2,05 AB | 493,54 A | 1    | 1    | <,0001 |
| HSPE1  | 2,4 AB | 1,9 B  | 494 A  | 1,1 B  | 2,1 AB  | 493 A    | 1    | 1    | <,0001 |
| Jarid  | 4,2    | 5,4    | 3,2    | 3,9    | 3,2     | 200,53   | 0,1  | 0,2  | 0,1    |
| KDM1A  | 4,6    | 5,9    | 3,1    | 4,7    | 5,2     | 5,4      | 0,2  | 0,4  | 0,4    |
| KDM1B  | 985    | 985    | 790    | 985    | 661     | 596      | 0,6  | 0,2  | 0,2    |
| KMT2D  | 4,1    | 4,4    | 2,8    | 4,6    | 4,3     | 4,2      | 0,77 | 0,5  | 0,6    |
| LDHA   | 3,4    | 3,1    | 2,8    | 3      | 4,1     | 3,4      | 0,6  | 0,5  | 0,8    |
| MAP2K2 | 493 A  | 424 A  | 4,5 B  | 494 A  | 494 A   | 6,1 B    | 0,9  | 0,8  | 0,0009 |
| MTCH2  | 498 A  | 426 A  | 3,6 B  | 496 A  | 496 A   | 4,7 B    | 0,9  | 0,8  | 0,0008 |
| PLIN3  | 4,6    | 4,9    | 5,5    | 4,02   | 4,1     | 6,2      | 0,5  | 0,7  | 0,09   |
| SETD2  | 494 A  | 425 A  | 2,9 B  | 494 A  | 494 A   | 5,6 B    | 0,9  | 0,8  | 0,008  |
| SF1    | 302    | 428    | 400    | 134    | 497     | 594      | 0,5  | 0,8  | 0,18   |
| SIRT1  | 985 A  | 985 A  | 5,5 B  | 985 A  | 985 A   | 6,3 B    | 0,7  | 0,6  | <,0001 |
| SIRT2  | 4,06 B | 5,5 B  | 496 A  | 4,05 B | 4,9 B   | 497 A    | 1    | 1    | <0,001 |
| SLC2A1 | 2,8    | 3,9    | 2,8    | 2,5    | 2,6     | 4,2      | 0,3  | 0,94 | 0,59   |
| SOD1   | 495 A  | 426 A  | 5,9 B  | 497 A  | 496 A   | 202 A    | 0,7  | 0,4  | 0,01   |
| Star   | 204    | 8,2    | 8,5    | 255    | 8,8     | 8,4      | 0,9  | 0,8  | 0,1    |
| TFAM   | 3,4    | 4,7    | 6,3    | 5,09   | 3,2     | 202,7    | 0,1  | 0,2  | 0,1    |

(HS) ou restrição alimentar (PF) por sete dias. (C): grupo controle. Arranjo fatorial 2 x 3; Letras maiúsculas na mesma linha indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey  $P < 0,05$  x