



**DÉBORA REGINA DA SILVA**

**QUALIDADE DE OÓCITOS DE VACAS LEITEIRAS E  
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES A PARTIR DE OÓCITOS  
MATURADOS *IN VITRO* COM MELATONINA**

**LAVRAS – MG  
2020**

**DÉBORA REGINA DA SILVA**

**QUALIDADE DE OÓCITOS DE VACAS LEITEIRAS E PRODUÇÃO DE  
EMBRIÕES A PARTIR DE OÓCITOS MATURADOS *IN VITRO* COM  
MELATONINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Nadja Gomes Alves  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Débora Regina da.

Qualidade de oócitos de vacas leiteiras e produção de embriões  
a partir de oócitos maturados *in vitro* com melatonina / Débora  
Regina da Silva. - 2020.

76 p.

Orientador(a): Nadja Gomes Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Estresse térmico em vacas leiteiras. 2. Produção *in vitro* de  
embriões bovinos. 3. Grupamento genético e qualidade oocitária. I.  
Alves, Nadja Gomes. II. Título.

**DÉBORA REGINA DA SILVA**

**QUALIDADE DE OÓCITOS DE VACAS LEITEIRAS E PRODUÇÃO DE  
EMBRIÕES A PARTIR DE OÓCITOS MATURADOS *IN VITRO* COM  
MELATONINA**

**OOCYTE QUALITY FROM DAIRY COWS AND EMBRYO PRODUCTION FROM  
OOCYTES *IN VITRO* MATURED WITH MELATONIN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 10 de setembro de 2020.

Prof. Dr. José Camisão de Souza    UFLA  
Prof. Dr. Renato Ribeiro de Lima    UFLA  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Jasmin                      UFRJ

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Nadja Gomes Alves  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2020**

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para  
a realização desse trabalho,  
Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para enfrentar os desafios que surgiram ao longo dessa etapa da minha vida.

À minha irmã Mara, por ser meu suporte, independente da ocasião, e por manter nosso vínculo de irmãs, que com certeza é muito importante para mim.

Às minhas amigas Adrielle, Ana Gabriela, Érika, Larissa, Natália, Tainara, por me confortarem nos momentos difíceis. Sem vocês a jornada teria sido muito mais difícil.

Agradeço aos grupos de estudo NUTRAN e GERE, pelo auxílio na condução do experimento. Em particular agradeço ao João Pedro e Marcelo, pelo companheirismo e por participarem do meu experimento como se fosse deles, e às alunas de iniciação científica Fernanda, Nara e Rogéria.

Ao Pedro (Pong) por aspirar os animais em duas sessões.

A professora Nadja, pela orientação durante o mestrado.

Ao professor Camisão, por ter nos auxiliado na busca por fazendas para condução do experimento, assim como nas aspirações e nos procedimentos laboratoriais.

Ao professor Renato pela realização das análises estatísticas e por todo suporte para interpretação dos dados e descrição das análises.

Aos professores Rony Antonio Ferreira e Flávio Alves Damasceno, pelo empréstimo de equipamentos para mensuração das variáveis climáticas.

A Dra. Raquel Zaneti Puelker, responsável pela formulação e envase de meios da empresa que adquirimos esses produtos. Obrigada por toda assistência técnica para utilização desses produtos, assim como pelo esclarecimento de dúvidas pertinentes ao processo de produção de embriões.

Ao proprietário da Fazenda da Bocaina, Herman Resende Santos, e ao proprietário da Fazenda Agropecuária 2N, José Eustáquio Bernardino de Sena, por permitirem que usássemos os animais de suas propriedades no experimento.

A UFLA, pela estrutura física laboratorial, em particular agradeço imensamente o técnico de laboratório Márcio dos Santos Nogueira, por ajudar nas dificuldades que apareceram no laboratório, sempre com boa vontade. Agradeço também ao Laboratório de Pesquisa Animal (LPA) como um todo, por fazerem do laboratório uma comunidade de troca de ajudas e conselhos. À Fazenda Palmital/UFLA pela permissão para aspirar os animais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo número 427476/2016-0, pelo financiamento do projeto.

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

À empresa GENEX Genética Brasil Ltda, pela doação das doses de sêmen.

A empresa Reproduza Biotecnologia, por permitir a realização de uma bateria teste utilizando a estrutura da empresa, e a técnica de laboratório Tamara Coelho, por me acompanhar e fornecer dicas importantes para o processo de produção de embriões.

Aos membros da banca avaliadora, obrigada por aceitarem o convite e pelas sugestões para melhoria deste trabalho.

Por fim, agradeço aos animais, os quais foram parte das minhas aulas práticas durante a graduação e parte dos experimentos que participei e que conduzi. Obrigada por despertarem em mim o amor e o desejo de ser cada vez mais uma profissional melhor.

*“Eu não falhei. Apenas descobri 10 mil maneiras que não funcionam”. (Thomas Edison)*

## RESUMO GERAL

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da adição de melatonina ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos aspirados de vacas leiteiras sobre a taxa de clivagem (TC), a produção e a qualidade de embriões. Adicionalmente, objetivou-se estabelecer uma associação entre qualidade oocitária e grupamento genético, considerando as variáveis fisiológicas e ambientais obtidas durante o experimento. Os oócitos foram obtidos em 52 sessões de *ovum pick-up* (OPU) realizadas no verão e na primavera, em três fazendas. Em cada sessão de OPU as variáveis climáticas (temperatura e umidade do ar) e os parâmetros fisiológicos das vacas (frequência respiratória, temperatura retal e superficial, produção de leite e dias em leite – DEL) foram aferidos. No total foram realizadas 29 sessões de aspiração em vacas Holandês (H; n = 15, fazenda 1) e 23 sessões em vacas mestiças Holandês x Zebu (HZ; n = 16, fazenda 2; n = 7, fazenda 3). Os oócitos obtidos foram classificados de acordo com sua qualidade em excelentes, bons, regulares, desnudos e degenerados. Oócitos obtidos no verão, exceto degenerados, foram distribuídos a um de três tratamentos: 0 mol/L (controle),  $10^{-6}$  ou  $10^{-4}$  mol/L de melatonina na MIV. A TC foi avaliada no dia 3 (D3) após a fertilização *in vitro* (FIV) e a produção de embriões no D8. A qualidade dos blastocistos foi avaliada pela contagem do número de células e de células apoptóticas. O índice temperatura-umidade (ITU) foi de  $79,0 \pm 1,4$  na fazenda 1;  $77,7 \pm 3,2$  na fazenda 2 e  $68,5 \pm 1,8$  na fazenda 3. As variáveis fisiológicas não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupamentos genéticos (frequência respiratória - movimentos/minuto: H =  $74,2 \pm 10,5$  e HZ =  $53,4 \pm 6,9$ ; temperatura retal - °C: H =  $38,3 \pm 0,3$  e HZ =  $38,3 \pm 0,2$ ; temperatura superficial -- °C: H =  $36,6 \pm 1,4$  e HZ =  $36,9 \pm 0,9$ ). O grupamento genético influenciou a qualidade oocitária ( $P < 0,05$ ). As proporções de oócitos grau 1 (H =  $3,2 \pm 1,2$ ; HZ =  $27,6 \pm 4,6$ ;  $P < 0,0001$ ) e grau 2 (H =  $1,6 \pm 0,6$ ; HZ =  $12,9 \pm 2,2$ ;  $P < 0,0001$ ) foram menores e a proporção de degenerados foi maior (H =  $5,2 \pm 1,5$ ; HZ =  $1,7 \pm 0,6$ ;  $P \leq 0,05$ ) nas vacas Holandesas. A frequência respiratória foi negativamente ( $P < 0,05$ ) associada a oócitos grau 1 e positivamente associada a oócitos grau 2. DEL foi positivamente associado ( $P < 0,05$ ) a oócitos grau 1 e negativamente associado a oócitos degenerados. A proporção de oócitos viáveis (graus 1 e 2) foi menor ( $P < 0,0001$ ) nas vacas Holandesas do que em mestiças. Umidade do ar e frequência respiratória foram negativamente associadas ( $P < 0,01$ ) a oócitos bons. A interação ( $P = 0,03$ ) entre os efeitos de fazenda e tratamento sobre a taxa de clivagem foi observada, sendo que somente na fazenda 1, a concentração  $10^{-4}$  mol/L aumentou ( $P < 0,09$ ) a TC ( $70,0 \pm 17,0\%$ ) comparada ao controle ( $22,0 \pm 15,6\%$ ) e somente na fazenda 2, a TC foi aumentada ( $P < 0,09$ ) pela melatonina na concentração  $10^{-6}$  mol/L ( $50,0 \pm 20,3\%$ ) comparada ao controle ( $20,0 \pm 13,5\%$ ). Em conclusão, os parâmetros fisiológicos não diferiram entre os grupamentos genéticos, mas vacas mestiças produziram oócitos de qualidade superior em relação às Holandesas. A adição de melatonina ao meio de MIV pode ser uma estratégia para aumentar a taxa de clivagem dos embriões produzidos de vacas leiteiras lactantes durante o verão. Porém, a dose a ser adicionada difere de acordo com o grupamento genético, sendo maior para vacas Holandesas do que para vacas mestiças HZ.

**Palavras-chave:** Estresse térmico. Estresse oxidativo. Grupamento genético. Taxa de clivagem de embriões. Bovino.

## GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of melatonin to the *in vitro* maturation (IVM) medium of bovine oocytes aspirated from dairy cows on cleavage rate (CR), embryo production and quality. Additionally, we aimed to establish an association between oocyte quality and genetic groups, considering the physiological and environmental variables recorded throughout the trial. Oocytes were obtained in 52 *ovum pick-up* (OPU) sections performed during summer and spring in three farms. In each OPU section, environmental variables (temperature and relative humidity) and physiological parameters of cows (respiratory frequency, rectal and superficial temperature, milk production and days in milk – DIM) were obtained. Overall, 29 OPU sections were performed in Holstein cows (H; n = 15, farm 1) and 23 aspirations were performed in crossbred Holstein x Zebu - HZ (n = 16, farm 2; n = 7, farm 3). Oocytes obtained were classified according to its quality in excellent, good, regular, denuded and degenerate. Oocytes obtained during summer, except degenerate, were distributed to one of three treatments: 0 mol/L (control),  $10^{-6}$  mol/L or  $10^{-4}$  mol/L of melatonin in IVM. CR was evaluated on day 3 (D3) after *in vitro* fertilization (IVF), and embryo production on day 8 (D8). Quality of blastocysts was evaluated through count of embryo cell number and apoptotic cell number. The temperature-humidity index (THI) was  $79.0 \pm 1.4$  on farm 1;  $77.7 \pm 3.2$  on farm 2; and  $68.5 \pm 1.8$  on farm 3. Physiological variables did not differ ( $P > 0.05$ ) between genetic groups (respiratory frequency – movements/minute: H =  $74.2 \pm 10.5$ ; HZ =  $53.4 \pm 6.9$ ; rectal temperature -°C: H =  $38.3 \pm 0.3$ ; HZ =  $38.3 \pm 0.2$ ; superficial temperature -°C: H =  $36.6 \pm 1.4$ ; HZ =  $36.9 \pm 0.9$ ). Genetic group influenced oocyte quality ( $P < 0.05$ ). The proportions of grade 1 (H =  $3.2 \pm 1.2$ ; HZ =  $27.6 \pm 4.6$ ;  $P < 0.0001$ ) and grade 2 (H =  $1.6 \pm 0.6$ ; HZ =  $12.9 \pm 2.2$ ;  $P < 0.0001$ ) oocytes were lower and the proportion of degenerate (H =  $5.2 \pm 1.5$ ; HZ =  $1.7 \pm 0.6$ ;  $P = 0.05$ ) was greater in Holstein cows. The covariate respiratory frequency was significant ( $P < 0.05$ ) and negatively associated to grade 1 oocytes and positively associated to grade 2 oocytes. DIM was significant ( $P < 0.05$ ) and positively associated to grade 1 oocytes and negatively associated to degenerate oocytes. The proportion of viable oocytes (grade 1 and 2) was lower ( $P < 0.0001$ ) in Holstein than in HZ-crossbred. Relative humidity and respiratory frequency were significant ( $P < 0.01$ ) and negatively associated to good oocytes. An interaction ( $P = 0.03$ ) between the effects of farm and treatment regarding CR was observed. Only on farm 1, the concentration  $10^{-4}$  mol/L increased ( $P < 0.09$ ) the CR ( $70.0 \pm 17.0\%$ ) compared to control ( $22.0 \pm 15.6\%$ ), and only on farm 2, CR was increased ( $P < 0.09$ ) by melatonin in the concentration  $10^{-6}$  mol/L ( $50.0 \pm 20.3\%$ ) compared to control ( $20.0 \pm 13.5\%$ ). In conclusion, physiological parameters did not differ between genetic groups, but HZ crossbreds' cows produced greater quality oocytes in comparison to Holstein. The addition of melatonin to the IVM medium may be a strategy to increase CR of embryos produced from lactating dairy cows during summer. However, the dose to be added differs according to genetic group, and it is greater from Holstein than crossbred HZ cows.

**Keywords:** Heat stress. Oxidative stress. Genetic group. Cleavage rate of embryos. Bovine.

## LISTA DE FIGURAS

Figure 1 - Schematic overview of the dilutions to prepare the treatments.....	63
Figure 2 - Distribution of oocytes aspirated during spring and summer from Holstein and crossbred Holstein x Zebu (HZ) cows according to its classification. ....	68
Figure 3 - Blastocyst from the $10^{-6}$ mol/L (A) and initial blastocyst from $10^{-4}$ mol/L (B) treatment. ....	70

## LISTA DE TABELAS

Table 1 - Physiological variables obtained during spring and summer from Holstein and crossbred Holstein x Zebu (HZ) cows (LS means $\pm$ standard error).....	66
Table 2 - Cleavage rate of oocytes obtained from dairy cows during summer and <i>in vitro</i> matured in medium without or added melatonin. ....	68

## LISTA DE SIGLAS

AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
<i>ATP1A1</i>	Gene que codifica a expressão da subunidade $\alpha$ -1 da enzima ATPase
BCS	Body condition score
BEN	Balanço energético negativo
BPM	Breaths per minute
CAT	Catalase
CCO	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CDCB	Council on Dairy Cattle Breeding
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Corpo lúteo; corpus luteum
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COC	<i>Cumulus</i> oocyte complex
D3	Day 3
D8	Day 8
DBT	Dry-bulb temperature
DIM	Days in milk
DMSO	Dimethylsulfoxide
DPR	Daughter pregnancy rate
<i>DNMT1a</i>	DNA methyltransferase 1
<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Fetal bovine serum
FSH	Hormônio folículo estimulante
<i>GDF9</i>	Growth differentiation factor 9
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPx	Glutathione peroxidase
h	Horas
<i>HAS1/2</i>	Hyaluronan synthase 1/2
<i>HSP70</i>	Heat shock protein 70

<i>HSP90ab1</i>	Heat shock protein 90 alpha family class B member 1
HZ	Holandês x Zebu
ICM	Inner cell mass
IGF	Insuline growth factor
IGF-1	Insuline-like growth factor 1
IVC	<i>In vitro</i> culture
IVF	<i>In vitro</i> fertilization
IVM	<i>In vitro</i> maturation
IVP	<i>In vitro</i> embryo production
ITU	Índice de temperatura e umidade
LH	Hormônio luteinizante
<i>LHR1/2</i>	Luteinizing hormone receptor 1/2
<i>MARF1</i>	Meiosis arrest female protein 1
MCI	Massa celular interna
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
P.O.	Puras de origem
<i>PTX3</i>	Pentraxin 3
P <sub>4</sub>	Progesterona
PBS	Phosphate buffered saline
PTA	Predicted transmitting ability
PVA	Polyvinyl alcohol
RH	Relative humidity
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superóxido dismutase
SPN	Single nucleotide polymorphisms
THI	Temperature humidity index
TMR	Total mixed ration
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
UFLA	Universidade Federal de Lavras

USDA United States Department of Agriculture  
VG Vesícula germinativa

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>17</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Conforto térmico</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Estresse térmico por calor</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.1 Estresse térmico e alteração de parâmetros fisiológicos</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2.2 Estresse térmico e alteração da fisiologia reprodutiva</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2.3 Alterações celulares induzidas pelo estresse térmico em oócitos</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3 Estresse oxidativo e antioxidantes</b> .....	<b>28</b>
<b>2.4 Melatonina na maturação <i>in vitro</i> de oócitos e cultivo de embriões bovinos</b> .....	<b>31</b>
<b>2.5 Qualidade dos oócitos</b> .....	<b>35</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>41</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	<b>57</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>58</b>
<b>2 MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>60</b>
<b>2.1 Ethics</b> .....	<b>60</b>
<b>2.2 Animals, facilities and seasons</b> .....	<b>60</b>
<b>2.3 Measurements of physiological and environmental parameters</b> .....	<b>61</b>
<b>2.4 <i>Ovum pick-up</i></b> .....	<b>62</b>
<b>2.5 Experimental design and treatments</b> .....	<b>62</b>
<b>2.6. <i>In vitro</i> maturation, fertilization and culture</b> .....	<b>63</b>
<b>2.7 Embryo development and quality evaluation</b> .....	<b>64</b>
<b>2.8 Statistical analysis</b> .....	<b>65</b>
<b>3 RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	<b>66</b>
<b>4 CONCLUSIONS</b> .....	<b>70</b>
<b>5 ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>71</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>72</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O estresse térmico por calor é definido como uma condição em que a temperatura do corpo alcança valores além da temperatura ideal (HANSEN, 2009), e é causado pela combinação de diferentes fatores como temperatura, umidade relativa do ar e radiação solar, movimento do ar e precipitação (BOHMANOVA; MISZTAL; COLE, 2007). O estresse térmico impacta negativamente a produtividade e o bem-estar de vacas leiteiras, por meio do aumento da frequência respiratória, sudorese e fluxo sanguíneo periférico (ABDELATTY et al., 2018). Há ainda diminuição do consumo de alimentos e da atividade e os animais procuram por sombra e ventilação (WEST, 2003). Vários processos reprodutivos são afetados negativamente pelo estresse térmico, como secreção de gonadotrofinas, esteroidogênese, crescimento folicular ovariano, competência oocitária, desenvolvimento do corpo lúteo (CL), crescimento embrionário e respostas endometriais uterinas (WOLFENSON; ROTH, 2019). Comparadas às raças zebuínas, as raças europeias apresentam redução mais severa da função reprodutiva em resposta ao estresse térmico (ROCHA et al., 1998).

A homeostase intracelular é resultado do equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes e as falhas neste processo levam ao estresse oxidativo (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZLNSKA, 1993; AGARWAL et al., 2006; TAMURA et al., 2013). O estresse térmico pode levar ao estresse oxidativo, que impacta negativamente a reprodução. Esse prejuízo se dá pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio - ERNs (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; TAMURA et al., 2009). O estresse oxidativo tem sido relacionado a danos aos oócitos durante o período pré-ovulatório, bem como a prejuízos ao desenvolvimento embrionário (ROTH et al., 2008; HANSEN, 2009; NABENISHI et al., 2012). Em resposta ao estresse oxidativo, foram relatados diminuição da maturação nuclear e aumento da apoptose (ROTH; HANSEN, 2004; 2005), desorganização do citoesqueleto (JU, 2005) e alterações na transcrição de genes envolvidos na competência de desenvolvimento do oócito (PAYTON et al., 2011).

Os efeitos mencionados podem ser amenizados com a adição de antioxidantes, como a melatonina, ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos. Essa molécula é um potente captador de radicais livres (REITER et al., 2007), capaz de estimular enzimas antioxidantes (TAMURA et al., 2009) e diminuir a atividade de enzimas pró-oxidantes (REITER et al., 1997). Por isso, a melatonina protege o DNA nuclear e os lipídeos de membrana dos danos

oxidativos, melhorando a capacidade de defesa antioxidante (REITER et al., 1997; SCHAFFAZICK et al., 2005). Os efeitos de altas temperaturas na qualidade de oócitos têm sido amplamente estudados *in vitro* a partir de oócitos obtidos em abatedouros (ASCARI et al., 2017; PAULA, 2017; CAVALLARI et al., 2019). Em estudos conduzidos por nossa equipe, a adição de melatonina como antioxidante na MIV de oócitos bovinos sob choque térmico (41 a 41,5 °C nas primeiras 12 h de MIV e à 38,5 °C por mais 12 h) foi avaliada. Ascari (2016) encontrou que a concentração  $10^{-4}$  mol/L na MIV diminuiu a taxa de células em apoptose na massa celular interna (MCI) em relação ao número total de células em embriões. Paula (2017) maturou oócitos em meio sem melatonina ou adicionado de  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-12}$  mol/L de melatonina e observou que a concentração  $10^{-6}$  mol/L de melatonina resultou em taxa de maturação semelhante à observada sob maturação convencional (24 h a 38,5 °C e 5% CO<sub>2</sub>), bem como em menor produção de EROs e maior expressão do transcrito gênico *GDF9* (*growth differentiation factor 9*). Na sequência aos experimentos de Paula (2017), Lima (2018) avaliou as mesmas concentrações já testadas e observou que a proporção de embriões com oito ou mais células aumentou diretamente com o aumento da concentração de melatonina, e encontrou que a concentração  $10^{-4}$  mol/L resultou em maior proporção de células da MCI em relação ao número total de células do blastocisto.

Assim, objetivou-se neste estudo avaliar os efeitos da adição de  $10^{-6}$  e  $10^{-4}$  mol/L de melatonina ao meio MIV de oócitos de vacas leiteiras obtidos pela técnica de *ovum pick-up* (OPU) durante o verão sobre a taxa de clivagem, a produção e qualidade de blastocistos. Espera-se que a adição de melatonina ao meio MIV de oócitos promova incremento na produção e na qualidade dos embriões. Ressalta-se que é vasta a literatura na qual se utilizam ovários provenientes de abatedouro para obtenção de oócitos maturados *in vitro* sob choque térmico em meio contendo antioxidantes, mas no nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo no qual oócitos coletados de vacas leiteiras, possivelmente sob estresse térmico, foram maturados *in vitro* com melatonina. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos do grupamento genético e de variáveis climáticas e fisiológicas sobre a qualidade dos oócitos obtidos no verão e na primavera.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Conforto térmico**

O Conselho de Bem-Estar dos Animais de Produção do Reino Unido desenvolveu, em 1983, o conceito de “Cinco Liberdades dos Animais Domésticos”, o qual estabelece que os animais devem ser livres de: sede, fome ou má nutrição; desconforto; doença, injúria e comprometimento funcional; livres para expressar seu comportamento normal e livres de ansiedade, medo, dor e estresse. A condição de conforto térmico propicia condição para que os animais sejam saudáveis e possam expressar seu potencial produtivo. Grande parte dos produtores das mais diversas áreas já se conscientizou da importância do bem-estar animal. Nas últimas décadas, proprietários de fazendas de gado de leite têm sido pressionados a cada vez mais melhorar as condições de conforto e bem-estar de seus animais, a fim de satisfazer novos padrões de bem-estar animal de consumidores e de varejistas (ROBICHAUD et al., 2019). Estudos têm demonstrado que produtores de leite dos Estados Unidos e de países pertencentes à União Europeia enxergam o bem-estar de seus animais como uma prioridade (WOLF et al., 2015; HANSSON; LAGERKVIST, 2016).

É esperado que a demanda global por produtos de origem animal no ano 2050 seja o dobro do que é atualmente (ROJAS-DOWNING et al., 2017). Por isso, existe maior tendência de criação de animais em regiões mais quentes e úmidas do planeta (CORSI et al., 2017), devido à maior extensão territorial agriculturável, o que desperta preocupação quanto ao conforto térmico de animais destinados à produção animal nas próximas décadas. Portanto, essa é mais uma razão pela qual os produtores de leite devem atentar para as condições de conforto térmico de seus animais. A situação térmica na qual um animal se encontra pode ser obtida pela mensuração da temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória, dentre outros. Nesse contexto, um animal exposto às condições ambientais que propiciem conforto apresenta parâmetros fisiológicos dentro da faixa de normalidade, os quais para a espécie bovina são: temperatura retal entre 37,8 a 39,2 °C; frequência cardíaca entre 60 a 80 batimentos por minuto e frequência respiratória entre 10 a 30 movimentos por minuto (FEITOSA, 2008).

## **2.2 Estresse térmico por calor**

Os mamíferos possuem mecanismos para dissipação do calor, a chamada termólise. As trocas de calor animal x ambiente são realizadas por meio de mecanismos físicos, conhecidos como sensíveis e latentes. Os mecanismos sensíveis são assim chamados por serem dependentes de um gradiente de temperatura, ou seja, deve existir uma diferença entre as temperaturas do animal e do meio para que a troca de calor ocorra. Esses mecanismos são radiação, condução e convecção. Por outro lado, as trocas latentes (evaporação e

condensação), também chamadas insensíveis, não são exigentes quanto ao gradiente de temperatura (FERREIRA, 2016).

O total de calor radiante absorvido por um objeto depende não apenas da temperatura do objeto, mas também da sua cor e textura, sendo que superfícies escuras absorvem mais calor se comparadas a superfícies de cor clara (KADZERE et al., 2002). A condução é um mecanismo de transferência de calor entre moléculas, ou seja, é o processo por meio do qual ocorre a passagem de calor desde o núcleo central do organismo até a periferia do animal, pelo contato entre as partículas dos tecidos. A convecção é uma forma sensível de troca de calor entre o animal e o ambiente, na qual a dissipação de calor somente ocorrendo com a substituição de moléculas aquecidas por outras mais frias (FERREIRA, 2016). As trocas térmicas que advém de mudança de agregação da água, do estado líquido para o vapor, ou do vapor para o líquido, são denominadas “trocas úmidas”, cujos mecanismos são a evaporação e a condensação (AZEVEDO; ALVES, 2009).

O estresse térmico ocorre quando o total de forças externas que atuam em um animal causa aumento da temperatura corporal, requerendo resposta fisiológica (DIKMEN; HANSEN, 2009). Na busca pelo equilíbrio entre energia ganha e perda ocorrem diversas modificações orgânicas. O calor é um dos primeiros fatores estressantes avaliados em estudos com gado de leite, visto que a alta demanda metabólica associada à endotermia torna as vacas leiteiras de alta produção sensíveis à queda na produtividade em resposta ao calor (COLLIER; RENQUIST; XIAO, 2017).

Os efeitos do estresse térmico são exacerbados em raças europeias, as quais não são adaptadas às condições climáticas de alta temperatura e umidade, o que ocorre em menor intensidade em animais de raças zebuínas. Os animais pertencentes à subespécie *Bos taurus indicus* apresentam adaptações anatômicas e fisiológicas que os tornam mais adaptados às condições tropicais. O pelame representa a barreira entre o ambiente e o corpo dos animais e influencia diretamente as trocas térmicas. Epiderme pigmentada, pelos curtos, claros e assentados e pelame pouco denso favorecem a proteção contra a radiação e a eficiência da termólise, as quais são características desejáveis para bovinos que vivem em climas quentes (CENA; MONTEITH, 1975a, 1975b, 1975c). As características morfológicas do pelame, como densidade numérica, comprimento dos pelos e espessura da pele influenciam diretamente no isolamento térmico proporcionado pelo pelame e podem variar ao longo do ano (FAÇANHA et al., 2010). Animais de pele pouco espessa, nos quais o isolamento térmico é menor, são mais bem adaptados a ambientes tropicais (SILVA, 1999). Ferreira (2016) descreveu que as glândulas sudoríparas dos zebuínos apresentam maior volume que aquelas

dos bovinos europeus, sendo essa uma das diferenças marcantes de adaptação ao calor e que torna o zebuínio mais adaptado ao clima quente. Dentre as adaptações genéticas que os animais zebuínos desenvolveram durante sua evolução está a aquisição de genes para termotolerância (HANSEN, 2004). A expressão temporal do gene *HSP70* (*heat shock protein 70*) é um biomarcador para a descoberta desse gene adaptativo em bovinos e apresenta implicações significativas para o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao calor e ao frio, no contexto de variação climática (OSEI-AMPONSAH et al., 2019). Polimorfismo do gene que codifica a expressão da subunidade  $\alpha$ -1 da enzima ATPase, que transporta sódio e potássio (*ATPIA1*) e sua associação à tolerância ao calor foi descrito em animais mestiços de Jersey (DAS et al., 2015). A herdabilidade e a correlação genética nesse estudo evidenciam a possível seleção de características como produção de leite e tolerância ao calor. Um gene no locus C1787061T foi identificado como responsável pela melhor tolerância ao calor e produção de leite total em vacas Sahiwal, indicando associação ao SPN (*single nucleotide polymorphisms*) *HSP90ab1* (*heat shock protein 90 alpha family class B member 1*); (SAILO et al., 2015).

As diferenças nas adaptações anatômicas e fisiológicas entre animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* resultam em diferenças na qualidade oocitária, o que consequentemente afeta a produção *in vitro* e o desenvolvimento de embriões (FISCHER et al., 2000; CAMARGO et al., 2007). Oliveira et al. (2019) realizaram um estudo utilizando cruzamentos recíprocos na produção de embriões, a fim de avaliar os efeitos da raça materna no desenvolvimento embrionário em condições tropicais. Oócitos recuperados de vacas Holandesas (*Bos taurus taurus*) e vacas Gir (*Bos taurus indicus*) foram fertilizados com sêmen sexado ( $n = 615$  oócitos Gir fertilizados com sêmen de touro Holandês;  $n = 255$  oócitos Holandês fertilizados com sêmen de touro Gir). O número de oócitos obtidos por OPU (Gir =  $10,0 \pm 0,7$  vs Holandês =  $6,3 \pm 0,4$ ) e a porcentagem de oócitos viáveis (Gir =  $78,8 \pm 1,9$  vs Holandês =  $71,2 \pm 2,2\%$ ) foram menores nas doadoras da raça Holandês. A porcentagem de prenhez foi menor (Gir =  $41,0$  vs Holandês =  $22,9$ ) quando embriões foram produzidos a partir de oócitos de vacas Holandês. Concluiu-se que em ambiente tropical, a raça da doadora afeta o desenvolvimento do embrião mestiço.

As condições ambientais às quais os animais estão expostos, em associação à genética e condição fisiológica, podem determinar a ocorrência de estresse térmico. Uma das maneiras de mensurar a condição ambiental em que o animal se encontra é pelo índice de temperatura e umidade (ITU), que é um valor único que representa os efeitos combinados da temperatura e umidade do ar. Diferentes fórmulas têm sido propostas para o cálculo do ITU, levando em

consideração a temperatura de bulbo seco e umidade relativa do ar. Quando o valor do ITU ultrapassa o valor de 72, vacas leiteiras de origem europeia passam a sofrer estresse térmico por calor. Porém, Allen et al. (2015) reportaram sinais de início do estresse térmico quando o ITU alcançou valores maiores que 68. O ITU pode ser calculado pela fórmula criada por Buffington, Collier e Canton (1983):  $ITU = 0,8 Tb + UR (Tb - 14,3) / 100 + 46,3$ , em que Tb indica a temperatura de bulbo seco e UR indica a porcentagem de umidade relativa do ar.

### **2.2.1 Estresse térmico e alteração de parâmetros fisiológicos**

Bauman e Currie (1980) definiram homeostase como a manutenção do equilíbrio fisiológico ou condições constantes do ambiente interno, e homeorrese como um segundo tipo de controle na partição de nutrientes, na qual mudanças orquestradas ou coordenadas no metabolismo de tecidos corporais são necessárias para a manutenção do *status* fisiológico. Quando expostos a um desafio ambiental, como o estresse térmico por calor, os animais tentam se adaptar à nova condição, e uma série de alterações ocorre. Dentre as alterações dos parâmetros fisiológicos de vacas leiteiras devido ao estresse térmico por calor, pode-se citar aumento da transpiração, frequência respiratória mais rápida e maior vasodilatação, com aumento do fluxo sanguíneo para a superfície corporal. Metabolismo diminuído, assim como redução do consumo de matéria seca, de nutrientes e aumento da ingestão de água também foram observados (WEST, 1997). A temperatura corporal também pode ser afetada pela variação da temperatura ambiental, especialmente em animais de alta produção, que possuem o calor metabólico como adicional para o estresse térmico.

Berman et al. (1985) examinaram o limite superior para estabilidade térmica e a alteração subsequente das funções termorregulatórias em função de um ambiente com ventilação forçada, em vacas Holandesas, em Israel. Temperatura retal e frequência respiratória foram avaliadas em vacas com produção de leite de 9000 kg em 305 dias de lactação, expostas a temperaturas de 10 a 36 °C. As vacas submetidas ao resfriamento foram expostas à ventilação de 1,5 a 3,0 m/s, enquanto as do grupo controle foram expostas à ventilação de 0,5 m/s. Entre 10 e 24 °C a temperatura retal não diferiu entre os grupos, contudo houve aumento de 0,2 °C/kg de leite corrigido para gordura em animais produzindo mais de 24 kg/dia. Entre 26 e 36 °C a temperatura retal aumentou concomitante ao aumento da temperatura ambiental em ambos os grupos, mas a taxa de acréscimo da temperatura retal no grupo sob ventilação forçada foi a metade da observada no grupo controle. A frequência respiratória foi menor no grupo exposto à ventilação forçada. Os autores concluíram que a

temperatura ambiental crítica máxima está entre 25 e 26 °C, independente da produção de leite ou estado de aclimação das vacas às condições mencionadas.

No que diz respeito à frequência respiratória, não existe evidência de diferença entre raças em condições de baixas temperaturas (KADZERE et al., 2002), mas em altas temperaturas, vacas de origem europeia demonstram maior frequência respiratória (COPPOCK et al., 1982). Por outro lado, existe controvérsia sobre os efeitos do estresse térmico no aumento ou diminuição da frequência cardíaca. A redução da frequência cardíaca é mais comum em vacas leiteiras sob estresse térmico, e é associada a menor produção de calor em resposta a altas temperaturas ambientais (KADZERE et al., 2002).

Os parâmetros fisiológicos de animais zebuínos ou mestiços Holandês x Zebu (HZ) são menos alterados pelo estresse térmico, se comparados a animais de origem europeia. Estudos com animais de raças diversas em diferentes condições de temperatura e umidade já foram conduzidos. McManus et al. (2009) avaliaram a tolerância ao calor de cinco raças naturalizadas (Curraleiro, Crioulo Lageano, Pantaneiro, Junqueira, Mocho Nacional) e duas raças exóticas (Holandês e Nelore) de bovinos, em diferentes condições de temperatura (12 a 30 °C) e umidade (30 a 90%). Parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca e respiratória, temperatura retal e taxa de exsudação) e sanguíneos (hemograma e concentração de cortisol) foram avaliados. A frequência cardíaca foi menor nas raças Holandês, Crioulo e Nelore, e a frequência respiratória foi maior nas raças Mocho Nacional, Crioulo, Pantaneiro e Holandês. As análises indicaram que as raças Junqueira e Nelore são as mais adaptadas ao clima quente e úmido, enquanto as raças Holandês e Mocho Nacional são menos adaptadas. Adicionalmente, Dalcin et al. (2016) investigaram as mudanças em parâmetros fisiológicos de vacas leiteiras lactantes ( $\frac{1}{2}$  HZ,  $\frac{3}{4}$  HZ e Holandesas Puras de Origem – P.O.) submetidas a um ambiente não sombreado (indução do estresse térmico) e quais parâmetros são representativos de estresse térmico. Foram realizadas coletas de sangue para análise de hematócrito, contagem eritrocitária e de hemoglobina e avaliados a temperatura retal, frequência cardíaca e frequência e escore de ofegação. As médias de frequências respiratória e cardíaca, escore de ofegação e temperatura retal diferiram entre os grupamentos genéticos. Contudo, a frequência respiratória foi o melhor indicador do estresse térmico e seu valor foi de 116 movimentos por minuto em animais  $\frac{1}{2}$  HZ, 140 em animais  $\frac{3}{4}$  HZ e 168 em animais Holandês P.O., indicando que o grupamento genético  $\frac{1}{2}$  HZ foi o melhor adaptado ao clima quente e úmido.

### **2.2.2 Estresse térmico e alteração da fisiologia reprodutiva**

A queda de índices reprodutivos, tais como taxas de concepção e de prenhez, é um problema que vem afetando os rebanhos leiteiros por décadas, especialmente em rebanhos selecionados para alta produção de leite. Adicionalmente, o decréscimo da fertilidade é mais intenso nos meses de verão, devido ao estresse térmico, que causa prejuízo a vários aspectos reprodutivos.

O sucesso na reprodução se dá por eventos desencadeados no hipotálamo, que promove a liberação do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), que induz a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) pela hipófise anterior. Esses hormônios possuem papel de importância na função ovariana, incluindo regulação do crescimento folicular, ovulação e desenvolvimento do CL (WOLFENSON; ROTH, 2019). Existem resultados controversos no que diz respeito aos efeitos do estresse térmico na secreção de gonadotrofinas; contudo, em alguns estudos foi observado que o estresse térmico suprime a secreção de LH e compromete sua função (WISE et al., 1988; ROTH et al., 2001a; WOLFENSON; ROTH, 2016). Folículos obtidos de vacas em estresse térmico secretam menos hormônios esteroides, sob estímulo gonadotrófico (BRIDGES; BRUSIE; FORTUNE, 2005). Gilard et al. (1993) observaram menor pico de LH induzido pelo GnRH. A menor amplitude do pico de LH, e/ou alteração na sensibilidade de células foliculares ao LH pode interromper a cascata de eventos que levam a ovulação e, conseqüentemente, à formação de um CL funcional; além disso, a concentração de estradiol reduzida próximo à ovulação em vacas sob estresse térmico pode levar à falha no pico pré-ovulatório de LH (WOLFENSON; ROTH, 2019).

O hormônio FSH apresenta comportamento oposto ao do LH. A secreção de FSH aumenta durante o estresse térmico, e é associada ao maior número de folículos em crescimento nos ovários. O aumento do FSH associado ao estresse térmico pode ser explicado pela diminuição da liberação de inibina, hormônio produzido pelos folículos para promoção do *feedback* negativo na liberação de FSH (WOLFENSON et al., 1995). Roth et al. (2000) realizaram um estudo a fim de caracterizar os efeitos imediatos do estresse térmico nas concentrações plasmáticas de FSH e inibina, e o seu envolvimento na dinâmica folicular em vacas Holandesas. O estro foi sincronizado e as vacas foram resfriadas (n = 7) ou submetidas ao estresse térmico (n = 6) e após um ciclo estral, todos os animais voltaram para a condição de resfriamento, por 10 dias. Durante a segunda onda de desenvolvimento folicular do ciclo estral sincronizado, maior número de folículos de tamanho médio (6 - 9 mm), maior concentração plasmática de FSH e decréscimo na concentração plasmática de inibina foram observados em vacas sob estresse térmico do que em vacas resfriadas. A concentração

plasmática de FSH na primeira onda do ciclo subsequente foi maior, mas menos folículos médios se desenvolveram, em animais previamente submetidos ao estresse térmico.

A dinâmica de desenvolvimento folicular pode também ser alterada devido à menor dominância folicular, em vacas sob estresse térmico. Como resultado da menor dominância folicular, ocorre o maior desenvolvimento de folículos grandes em uma onda folicular e a duração prolongada da dominância do folículo pré-ovulatório, devido à sua emergência precoce (WOLFENSON et al., 1995).

A redução da capacidade esteroidogênica de folículos em animais sob estresse térmico se deve à diminuição da atividade da enzima aromatase nas células da granulosa; conseqüentemente, o folículo dominante apresenta menor concentração de estradiol no fluido folicular (WOLFENSON et al., 1997). Os efeitos da concentração reduzida de estradiol incluem alterações na duração e intensidade da expressão de estro; menor secreção de LH, o que pode comprometer a ovulação; desenvolvimento de cistos ovarianos, e alteração na funcionalidade do CL, associada à menor secreção de progesterona (P<sub>4</sub>) (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000).

O CL, uma estrutura ovariana dinâmica devido a suas mudanças morfológicas e estruturais, auxilia na produção e secreção de P<sub>4</sub> (JEROME; THIRUMARAN; KALA, 2017). A secreção de P<sub>4</sub> é essencial para o controle do ciclo estral, juntamente com o efeito de sensibilização para o comportamento de estro e manutenção da gestação (NISWENDER et al., 2000). Estudos indicam que, na maioria dos casos, o estresse térmico por curto período não é associado à redução na concentração sanguínea de P<sub>4</sub> em vacas. Contudo, o aumento da concentração sanguínea de P<sub>4</sub> em animais sob estresse térmico por períodos curtos pode ocorrer devido à secreção de P<sub>4</sub> pela glândula adrenal ou à severidade do estresse térmico (BRIDGES; BRUSIE; FORTUNE, 2005). Por outro lado, quando se trata de estresse térmico por período prolongado, Wolfenson et al. (2002) observaram queda na concentração de P<sub>4</sub>, que foi associada à má formação do CL, ou baixa síntese de P<sub>4</sub> em animais hipertérmicos, ou pode ser o resultado de folículos pré-ovulatórios subdesenvolvidos, os quais levariam a formação de um CL com função subótima.

Os ovários das fêmeas possuem um *pool* de folículos em desenvolvimento responsivos às gonadotrofinas, os quais são sensíveis à elevação da temperatura. O estágio de desenvolvimento relaciona-se ao grau de resistência ou sensibilidade do oócito ao insulto térmico. O oócito adquire seu potencial de desenvolvimento em uma sequência passo-a-passo durante o desenvolvimento folicular; portanto, alterações causadas pelo estresse térmico podem reduzir a competência do oócito antes mesmo da ovulação (WOLFENSON; ROTH,

2019). Gendelman et al. (2010) examinaram a associação entre estação do ano e expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial, com ênfase na taxa de clivagem e momento da primeira clivagem embrionária. Oócitos aspirados durante a estação fria se desenvolveram para o estágio de duas e quatro células mais cedo e resultaram em maior proporção de embriões na primeira clivagem, em relação aos aspirados na estação quente. Com o uso de uma câmera para acompanhar a clivagem durante a estação quente, os autores observaram que a clivagem para o estágio de duas células ocorreu em duas ondas distintas, sendo a clivagem inicial entre 18 e 25 h após a ativação química, e a clivagem tardia entre 27 e 40 h após a ativação química. Os autores concluíram que em oócitos coletados de vacas Holandês durante o verão a primeira divisão embrionária é tardia. Roth et al. (2001b) realizaram um estudo para caracterizar o efeito residual do estresse térmico do verão na qualidade oocitária no outono e concluíram que são necessários de dois a três ciclos estrais para recuperação dos danos causados pelo estresse térmico e aparecimento de oócitos competentes no outono subsequente, o que indica que o estresse térmico tem efeitos de longa duração sobre o *pool* de oócitos.

Embora a maior parte dos efeitos do estresse térmico envolva alterações na foliculogênese e na ovogênese, embriões em estágio de pré-implantação também são sensíveis à elevação da temperatura, e, assim como no caso do oócito, a sensibilidade aos efeitos do estresse térmico depende do estágio de desenvolvimento no qual o embrião se encontra. Embriões em estágio de duas células são mais sensíveis ao estresse térmico do que aqueles em estágio de quatro e oito células. Embriões em estágios de desenvolvimento mais tardios, como mórula e blastocistos, são mais resistentes ao estresse térmico (HANSEN, 2007). O mecanismo intrínseco à aquisição de termotolerância de embriões em estágios de desenvolvimento mais tardios está associado a mudanças no balanço entre a geração de radicais livres e proteção antioxidante (WOLFENSON; ROTH, 2019).

### **2.2.3 Alterações celulares induzidas pelo estresse térmico em oócitos**

O dano celular causado pelo calor em oócitos bovinos pode ser observado nos compartimentos citoplasmático e nuclear (PAULA-LOPES et al., 2012), mas a sensibilidade do citoplasma ao estresse térmico é maior do que a do núcleo. Shen et al. (2010) realizaram um estudo a fim de comparar a sensibilidade térmica do ooplasma receptor e do núcleo doador de vacas Holandesas e nativas Taiwan. Esses autores concluíram que o ooplasma pode ser o principal determinante da sensibilidade térmica em oócitos e futuros embriões bovinos e

que o ooplasma de animais *Bos indicus* possui maior quantidade de componentes resistentes ao calor, os quais podem ser mitocôndrias, RNA mensageiro (RNAm), antioxidantes e/ou proteínas (BLOCK; CHASE; HANSEN, 2002).

A maturação citoplasmática pode ser dividida, didaticamente, em: 1) redistribuição de organelas; 2) dinâmica do citoesqueleto; e 3) maturação molecular. Análises ultra estruturais mostram que mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, grânulos corticais e os complexos de Golgi assumem morfologia e posições diferentes durante a transição do estágio de vesícula germinativa (VG) para o estágio de meiose II (FERREIRA et al., 2009), tais como grânulos corticais e mitocôndrias na posição cortical, em aglomerados e complexos de Golgi se deslocam do núcleo para o citoplasma, adjacente ao oolema (KRUIP et al., 1983). Payton et al. (2004) expuseram complexos *cumulus*-oócito (CCOs) ao choque térmico de 41 °C e observaram prejuízo à translocação de grânulos corticais nos oócitos.

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas encontradas em células eucarióticas, as quais são capazes de gerar adenosina trifosfato (ATP), que é a maior fonte de energia para as células; as mitocôndrias são essenciais para várias funções celulares (ROTH, 2017). A localização das mitocôndrias no oócito durante a maturação e a segregação em blastômeros no embrião em processo de clivagem é finamente regulada. Os gradientes de distribuição das mitocôndrias no oócito apresentam potencial de gerar blastômeros que irão abrigar quantidades diferentes de mitocôndrias, e tem papel na definição da viabilidade do blastômero (DUMOLLARD; DUCHEN; CARROLL, 2007). O estresse térmico é capaz de comprometer a distribuição das mitocôndrias em oócitos. O transporte e reposicionamento mitocondrial na célula ocorrem por meio de microtúbulos e rearranjo de microfilamentos de actina (ZAMPOLLA et al., 2011), os quais são comprometidos pela elevação da temperatura.

Durante a meiose é característico do oócito se manter em uma pausa prolongada no estágio de diplóteno, denominada diacinese. O oócito permanece no estágio de diacinese até que o pico de LH promova a sua maturação final (CRICHTON; PLAYFOOT; ADAMS, 2014). A competência meiótica é adquirida durante a foliculogênese, acompanhada pelo silenciamento progressivo da transcrição e mudanças estruturais profundas na cromatina, para o controle da expressão gênica dentro do compartimento nuclear do oócito (LUCIANO; LODDE, 2013). A condensação da cromatina no oócito é importante para aquisição da competência meiótica, isto é, a habilidade de retomar e completar a meiose (ROTH, 2017).

Durante o desenvolvimento folicular as atividades de transcrição e tradução dentro do oócito são intensas, e o RNAm materno armazenado em oócitos contidos em folículos antrais é disponível para uso imediato no processo de crescimento folicular e para alcançar estágios

de desenvolvimento avançados (PICCIONI; ZAPPAVIGNA; VERROTTI, 2005). Memili et al. (1998) realizaram um estudo a fim de determinar a atividade transcricional em oócitos imaturos (estágio de VG), oócitos em metáfase II, embriões bovinos de 2, 4 e 8 células. Os autores relataram que a atividade transcricional se torna plenamente ativa em embriões no estágio entre 8 e 16 células. Gendelman e Roth (2012) avaliaram a confiabilidade de modelos para experimentação animal (*in vivo* e *in vitro*) para o estudo dos efeitos da elevação da temperatura no oócito em estágio de VG, com ênfase na expressão de genes envolvidos na maturação e no desenvolvimento embrionário inicial. Nesse trabalho, a conclusão mais relevante foi que a abundância relativa dos transcritos gênicos avaliados foi similarmente reduzida em oócitos expostos ao estresse térmico em ambos os modelos experimentais.

Os efeitos do choque térmico na maturação nuclear foram estudados em oócitos em estágio de VG. Pesquisas com o oócito em estágio VG são bastante complexas de serem conduzidas, pois, uma vez que se retira o oócito do ambiente folicular, ocorre a retomada da divisão meiótica (MERMILLOD; MARCHAL, 1999). Payton et al. (2004) avaliaram os efeitos da elevação da temperatura *in vitro* no CCO em estágio de VG e relataram que a progressão para a meiose II foi menor em oócitos expostos a 41 °C do que em oócitos maturados a 38,5 °C. Adicionalmente, a proporção de oócitos que se desenvolveu a blastocistos foi reduzida pelo choque térmico. Similarmente, Paula-Lopes et al. (2012) cultivaram oócitos provenientes de animais mestiços de *Bos indicus* no estágio de VG a 41 °C por 14 h e observaram redução do desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto nos dias 8 e 9 após a fertilização.

Em uma sequência de experimentos, Roth e Hansen (2005) avaliaram a capacidade do choque térmico em alterar a progressão do oócito pela meiose, fertilização e formação do embrião. CCOs foram cultivados a 38,5; 40 ou 41 °C pelas primeiras 12 h de maturação. Os autores observaram que um subgrupo dos oócitos maturados à 41 °C apresentavam fuso meiótico deformado, com microtúbulos desorganizados e cromossomos desalinhados. Esses autores concluíram que o choque térmico é capaz de prejudicar a maturação nuclear e induzir apoptose.

### **2.3 Estresse oxidativo e antioxidantes**

Uma das principais causas de estresse oxidativo em animais durante o verão nos trópicos é o estresse térmico (MONTILLA et al., 2014). O estresse térmico é capaz de comprometer a função celular por alteração da membrana plasmática e das organelas, além de

interferir no potencial de membrana mitocondrial (ROTH, 2018), uma situação que interfere no status *redox* da célula. O estresse oxidativo caracteriza-se pelo acúmulo de EROs no interior da célula, seja pela falha na neutralização, ou pela indução ao aumento de produção desses compostos. Em condições normais, EROs são mantidos em equilíbrio, porém diversos fatores podem interferir no balanço dessas moléculas, e, assim, ocorre o estresse oxidativo (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005). Os radicais livres são altamente instáveis e reativos, e para se estabilizarem adquirem elétrons de ácidos nucleicos, lipídios, proteínas, carboidratos ou qualquer outra molécula em seu ambiente, causando uma cascata de reações que resultarão em danos à célula (GUPTA et al., 2010).

Safa et al. (2019) observaram que concentração plasmática de EROs e a capacidade antioxidante total foi maior em vacas leiteiras Holandesas sob estresse térmico no período pré-parto do que naquelas mantidas em sistema com resfriamento. Os autores concluíram que o resfriamento de vacas no período pré-parto melhorou o desempenho produtivo, indicadores do *status* metabólico, resposta imune e capacidade antioxidante. Sakatani et al. (2012) investigaram o efeito do calor ambiental do verão no ciclo estral e nas concentrações sanguíneas de superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) em vacas Wagyu. Os autores observaram que as concentrações das enzimas antioxidantes foram menores durante o verão e concluíram que a temperatura ambiental elevada durante o verão acentua o estresse oxidativo.

Considerando os sistemas *in vitro*, a exposição a temperaturas elevadas pode aumentar a produção de EROs em oócitos e embriões (CAVALLARI et al., 2019; ORTEGA et al., 2016). O uso de antioxidantes na maturação de oócitos tem se mostrado uma alternativa para minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo (CAVALLARI et al., 2019). Contudo, para o embrião, os efeitos termoprotetores dos antioxidantes *in vitro* são inconsistentes, e isso pode ser explicado pelo fato de que EROs são mediadores mais importantes de ações de toxicidade relacionadas ao choque térmico para o oócito do que para o embrião (HANSEN, 2019).

As moléculas ou sistemas antioxidantes são definidas como qualquer substância que, presente em baixas concentrações comparadas àquelas de um substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os antioxidantes não enzimáticos estão a vitamina A, C, E, e o piruvato. Compostos sulfurados possuem propriedades de interesse particular, tais como glutathione, hipotaurina, taurina e

cisteamina (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001). Como exemplos de antioxidantes enzimáticos estão a SOD, catalase (CAT) e GPx (LI; FOOTE; SIMKIN, 1993). Outro modo de classificar os antioxidantes é pelo local na célula onde estes são encontrados primariamente (compartimento celular – citoplasma ou núcleo), bem como pelo seu modo de ação (HANSEN, 2010).

Diversos antioxidantes podem ser utilizados para mitigar os danos do estresse oxidativo. Compostos pertencentes ao grupo tiol, isto é, que possuem o radical -SH na sua estrutura química, de baixo peso molecular, tal como o  $\beta$ -mercaptoetanol, possuem potencial de melhorar a viabilidade celular, além de aumentar a glutatona intracelular (TAKAHASHI et al., 1993). Já foi também reportada melhora na maturação meiótica de oócitos cultivados *in vitro*, além da proteção contra o estresse oxidativo (PATEL et al., 2015). Sakatani et al. (2008) utilizaram o modelo de choque térmico para avaliar a geração de EROs no sistema *in vitro* de cultivo de embriões de oito células e o potencial do  $\beta$ -mercaptoetanol como neutralizador de EROs. Os autores encontraram que o  $\beta$ -mercaptoetanol melhorou a viabilidade dos embriões expostos ao choque térmico.

Antioxidantes carotenoides também podem ser utilizados como neutralizadores de radicais livres. A astaxantina é um carotenoide pertencente à classe das xantofilas e tem despertado grande interesse devido à sua capacidade antioxidante e possível redução de risco de algumas doenças. A astaxantina pode ser encontrada naturalmente em microalgas e leveduras e é considerada o principal carotenoide em salmão e crustáceos (SEABRA; PEDROSA, 2010). Alguns autores relataram a habilidade de neutralização de radicais hidroxila pela astaxantina em solução aquosa (HAMA et al., 2012), além da capacidade de inibir a peroxidação lipídica (LI et al., 2015a). Ispada et al. (2018) determinaram o papel da astaxantina na produção de EROs pelo oócito, no perfil *redox* e na competência de desenvolvimento de CCOs após choque térmico durante a MIV. A exposição dos oócitos ao choque térmico elevou as concentrações de EROs e reduziu a capacidade de clivagem e desenvolvimento ao estágio de blastocisto. Porém, a astaxantina foi capaz de mitigar os efeitos negativos do choque térmico ao diminuir a produção de EROs e restaurar a competência de desenvolvimento oocitária, além de estimular a atividade da enzima SOD.

A vitamina A é conhecida por ter papel essencial na reprodução das fêmeas, incluindo crescimento folicular, esteroidogênese e desenvolvimento oocitário e embrionário (GAD et al., 2018). Nos ruminantes, a vitamina A é ingerida como  $\beta$ -caroteno das forragens, absorvida por células da mucosa intestinal e por ação enzimática é convertida a retinal e, posteriormente, a retinol (WEISS, 1998). Já foi relatado que a adição de retinol durante a

MIV de oócitos aumentou a capacidade de desenvolvimento, pela redução da taxa de apoptose de células do *cumulus* ou de células embrionárias, por meio de sua atuação em vias que alteram a produção do TNF- $\alpha$  (PU et al., 2014). Lawrence et al. (2004) utilizaram retinol na MIV de oócitos bovinos expostos ao choque térmico e observaram que essa molécula preveniu reduções induzidas pelo calor na competência de desenvolvimento de oócitos até o estágio de blastocisto. Os resultados indicam que o retinol pode proteger oócitos dos efeitos deletérios do estresse térmico.

A cisteína é um aminoácido nutricionalmente semi-essencial e, aparte da síntese de proteínas, serve primariamente como precursor da glutatona reduzida, juntamente com o glutamato e glicina (YIN et al., 2015). Nabenishi et al. (2011) investigaram os efeitos da cisteína adicionada ao meio MIV de oócitos bovinos expostos ao choque térmico na maturação nuclear e desenvolvimento embrionário. Os autores observaram que a adição de cisteína mitigou os efeitos do choque térmico na competência de desenvolvimento oocitário pelo aumento da concentração de glutatona e a inibição da produção de EROs, seguida por apoptose de células do *cumulus*.

Entre os diversos antioxidantes estudados, a melatonina destaca-se por ser uma molécula multifuncional (TIAN et al., 2014) e com característica anfifílica, o que a torna capaz de atravessar qualquer compartimento celular com facilidade, incluindo membrana, citoplasma e núcleo (FU et al., 2014).

#### **2.4 Melatonina na maturação *in vitro* de oócitos e cultivo de embriões bovinos**

A melatonina é um hormônio sintetizado naturalmente pelo organismo, na glândula pineal. Sua função primária é o controle do ciclo circadiano, e sua produção é estimulada pelo decréscimo do fotoperíodo. Nos mamíferos, a função mais importante desse hormônio é a regulação do ritmo sazonal (BITTMAN; KARSCH, 1984). Essa molécula foi isolada pela primeira vez na glândula pineal de vacas de corte (ALBERTI, 1958; LERNER, 1958). No ano seguinte, Lerner et al. (1959) foi capaz de isolar a melatonina em tecidos periféricos, provando a existência sistêmica dessa molécula. Desde os primeiros achados até os dias de hoje, muito se descobriu acerca da melatonina e seu uso foi amplamente disseminado entre as áreas do conhecimento.

A melatonina na circulação se liga a receptores de membrana (subtipos MT1 e MT2), que são acoplados à proteína G, ativando AMPc (monofosfato cíclico de adenosina; TAMURA et al., 2014) ou por receptor nuclear, sinalizando para a produção de RNAm

(SMIRNOV, 2001; WANG et al., 2015). No que diz respeito ao potencial antioxidante da melatonina, essa molécula é um potente neutralizador de radicais livres, por meio da doação de elétrons, a fim de eliminar EROs e ERNs, além do radical hidroxila, que é extremamente tóxico para a célula (VIJAYALAXMI et al., 2004). A melatonina como antioxidante é capaz de proteger o DNA nuclear, membranas lipídicas, e, possivelmente proteínas citosólicas do dano oxidativo. Adicionalmente, a melatonina pode alterar a atividade de enzimas que aumentam a capacidade antioxidante total do organismo, isto é, SOD, GPx, glutathione redutase, glicose-6 fosfato desidrogenase e óxido nítrico sintase (REITER et al., 1997). A melatonina é produzida após aproximadamente 3 h do início do sono e, a fim de poupar a célula do estresse oxidativo, promove o metabolismo basal celular, para restauração dos sistemas orgânicos (CHEN et al., 2019). No fluido folicular de bovinos a melatonina foi encontrada na concentração de  $10^{-11}$  mol/L (TIAN et al., 2014), a mesma concentração encontrada em suínos (SHI et al., 2009).

Diversos estudos já foram realizados a fim de verificar as propriedades antioxidantes da melatonina no CCO e embriões *in vitro*, seja em condição convencional (38,5 °C) ou sob choque térmico (40 - 42 °C). Sob condição convencional de maturação de oócitos bovinos em estágio de VG, Tian et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de melatonina ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$  mol/L) sobre o desenvolvimento a embriões. Em concentrações de  $10^{-9}$  e  $10^{-7}$  mol/L a melatonina estimulou a maturação oocitária, assim como o desenvolvimento de embriões e o número médio de células por blastocisto. Os autores também observaram a expressão de genes dos receptores de melatonina tipo MT1 e MT2 em células do *cumulus*, células da granulosa e oócitos. A investigação acerca dos mecanismos de ação da melatonina revelou que a suplementação desse antioxidante durante a MIV aumentou a expressão de genes associados à maturação (*GDF9*, *MARF1 - meiosis arrest female protein 1* e *DNMT1a - DNA methyltransferase 1*) e à expansão de células do *cumulus* (*PTX3 - pentraxin 3*, *HAS1/2 - hyaluronan synthase 1/2*) e que *LHR1/2 (luteinizing hormone receptor 1/2)* e *EGFR (epidermal growth factor receptor)* estão envolvidos na tradução de sinais e na reprogramação epigenética. Yang et al. (2020) observaram que a adição de melatonina na concentração  $10^{-5}$  mol/L ao meio durante a maturação convencional de CCOs de suínos aumentou a taxa de extrusão do primeiro corpúsculo polar, a expansão de células do *cumulus*, a taxa de clivagem e a formação de blastocistos. Ocorreu também o aumento significativo da concentração de glutathione no ooplasma e decréscimo das concentrações intracelulares de EROs. Em um experimento, utilizando também o modelo de maturação convencional, An et al. (2019) adicionaram melatonina na concentração  $10^{-9}$  mol/L ao meio de MIV de oócitos

bovinos e observaram que essa dose foi eficiente em mitigar os danos causados pelo estresse oxidativo, além de diminuir a apoptose, recuperar a integridade de mitocôndrias e melhorar o arranjo do fuso meiótico e o alinhamento de cromossomos. Li et al. (2019) estudaram o poder antioxidante da melatonina durante a maturação de oócitos humanos. Os resultados apontaram que a concentração ótima de melatonina para a maturação oocitária foi  $10^{-11}$  mol/L, a qual proporcionou maiores taxas de maturação, fertilização e blastocisto.

Em diversos estudos em que o modelo de choque térmico foi utilizado foram observados efeitos benéficos da melatonina no cultivo de células da granulosa (FU et al., 2014) e na maturação de oócitos (CEBRIAN-CERRANO et al., 2013; TIAN et al., 2014; LI et al., 2015b; ASCARI, 2016; PAULA, 2017; LIMA, 2018; CAVALLARI et al., 2019). Em todos esses trabalhos foi utilizado material proveniente de ovários de abatedouros. Fu et al. (2014) realizaram um estudo com cultivo de células da granulosa de ovelhas, em que as células foram expostas ao choque térmico para indução da apoptose, e a melatonina foi adicionada ao meio de cultivo na concentração  $10^{-7}$  mol/L. Os resultados demonstraram que a eficiência da formação de colônias de células da granulosa foi menor e a taxa de apoptose foi maior em células da granulosa sob choque térmico, comparado às células cultivadas a 37 °C. Adicionalmente, a melatonina reduziu de forma acentuada os efeitos negativos do choque térmico em células da granulosa.

Cebrian-Cerrano et al. (2013) testaram diferentes concentrações de melatonina na MIV e no cultivo *in vitro* (CIV): 0;  $10^{-12}$ ;  $10^{-9}$ ;  $10^{-4}$  mol/L e 0;  $10^{-3}$  mol/L, ambos com e sem (38,5 °C) choque térmico (41,5 °C por 24 h). Os autores observaram que, sob choque térmico, oócitos maturados com  $10^{-4}$  mol/L de melatonina resultaram em maior taxa de blastocisto comparados aos oócitos maturados em meio sem melatonina, atingindo valor semelhante ao observado nos oócitos do grupo controle (sem melatonina na condição convencional). A dose  $10^{-3}$  mol/L resultou em menores taxa de clivagem e de blastocisto em oócitos maturados sob choque térmico e menor taxa de blastocisto em oócitos maturados em condição convencional quando comparados a oócitos não tratados com melatonina. Os autores concluíram que a dose  $10^{-4}$  mol/L de melatonina adicionada ao meio MIV foi capaz de mitigar os efeitos deletérios do choque térmico sobre os oócitos.

Li et al. (2015b) investigaram os efeitos da adição de melatonina ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  mol/L) ao meio MIV de oócitos suínos submetidos ao choque térmico (20 - 24 h, 42 °C). A adição da dose  $10^{-7}$  mol/L de melatonina aumentou a taxa de extrusão do corpúsculo polar e a taxa de blastocisto, reduziu a formação de EROs nos oócitos, aumentou a produção de GPx e inibiu a

apoptose celular. Os autores concluíram que a melatonina foi efetiva em proteger os oócitos do choque térmico.

Ascari (2016) adicionou melatonina nas concentrações  $10^{-6}$  mol/L e  $10^{-4}$  mol/L na MIV de oócitos bovinos sob choque térmico e observou redução da produção de EROs em comparação aos oócitos maturados sob choque térmico, sem melatonina. O autor observou ainda que a adição de  $10^{-4}$  mol/L de melatonina na MIV reduziu a taxa de apoptose na MCI dos blastocistos. Paula (2017) também utilizou o modelo do choque térmico para avaliar o efeito protetor da melatonina nas concentrações  $10^{-12}$ ;  $10^{-9}$ ;  $10^{-6}$  e  $10^{-3}$  mol/L adicionada ao meio MIV de oócitos bovinos. Os oócitos foram também maturados sem melatonina (0 mol/L) sob choque térmico ou na condição convencional (38,5 °C). A melatonina na concentração  $10^{-6}$  mol/L protegeu os oócitos dos danos causados pelo choque térmico, como demonstrado pela taxa de maturação similar àquela observada em oócitos maturados em condição convencional, menor produção de EROs e maior expressão gênica do transcrito *GDF9*. Lima (2018) avaliou as mesmas concentrações de melatonina testadas por Paula (2017) na MIV de oócitos bovinos em condição de choque térmico sobre a produção e a qualidade dos embriões. A adição de melatonina até a concentração  $10^{-3}$  mol/L estimulou o desenvolvimento embrionário ao estágio de 16 células e, por meio de análise de regressão, o autor estimou que a proporção de células da MCI foi aumentada pela adição de melatonina na concentração  $10^{-4}$  mol/L. Nos estudos de Ascari (2016), Paula (2017) e Lima (2018) foram utilizados oócitos de vacas predominantemente mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*.

Cavallari et al. (2019) utilizaram oócitos bovinos de vários genótipos, incluindo *Bos taurus* e uma mistura de *Bos taurus* e *Bos indicus* a fim de determinar se o choque térmico e a menadiona aumentariam a produção de EROs pelos oócitos e se a melatonina seria capaz de mitigar os efeitos deletérios do choque térmico. Para a produção de EROs, CCOs foram aleatoriamente distribuídos a um de seis tratamentos em um arranjo fatorial 3 x 2, sendo os efeitos principais: atmosfera – 1) controle (38,5 °C por 22 h), 2) choque térmico (41 °C por 14 h e 38,5 °C por 8 h) ou 3) menadiona (5 µmol/L, 38,5 °C por 22 h, para indução do estresse oxidativo) e melatonina (0 ou 1 µmol/L). A melatonina reduziu a intensidade de EROs em oócitos expostos ao choque térmico e à menadiona, mas não em oócitos do grupo controle. Com relação à competência de desenvolvimento, a exposição de oócitos ao choque térmico e à menadiona reduziu a taxa de clivagem, em comparação ao grupo controle. A melatonina aumentou a taxa de clivagem de oócitos expostos ao choque térmico e à menadiona, mas não alterou a clivagem de oócitos do grupo controle. A melatonina tendeu a aumentar a

competência de desenvolvimento de embriões produzidos a partir de oócitos maturados sob choque térmico, mas esse efeito não foi observado em oócitos maturados com menadiona e nos do grupo controle. Os autores concluíram que a melatonina diminuiu a produção de EROs em oócitos durante a maturação, e os protegeu dos efeitos deletérios do choque térmico e da menadiona na competência de desenvolvimento após fertilização.

Ortega et al. (2016) testaram se a melatonina é capaz de mitigar os efeitos do choque térmico sobre o desenvolvimento embrionário e se a frequência do alelo termoprotetor *HSPAIL* é aumentada em blastocistos formados de zigotos que sofreram choque térmico. A hipótese testada foi que a melatonina preveniria os efeitos deletérios do choque térmico sobre o desenvolvimento embrionário pela redução do acúmulo de EROs e que os embriões que herdaram o alelo termoprotetor *HSPAIL* provavelmente sobreviveriam ao choque térmico. A dose de melatonina testada foi 1  $\mu\text{mol/L}$ . O choque térmico no cultivo aumentou EROs; a melatonina diminuiu EROs. O choque térmico diminuiu a porcentagem de zigotos que se desenvolveram até o estágio de blastocisto, independente da melatonina. A frequência do genótipo para *HSPAIL* foi afetada pela temperatura. Os autores concluíram que a falta de efeito da melatonina no desenvolvimento embrionário indica que os efeitos negativos do choque térmico no zigoto não são mediados por EROs. Além disso, o efeito reportado previamente da melatonina na fertilidade de vacas sob estresse térmico pode envolver ações independentes das propriedades antioxidantes dessa molécula.

## 2.5 Qualidade dos oócitos

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia da reprodução que vem sendo amplamente utilizada pelos produtores tanto de leite (97,2%) quanto de corte (90,2%) (VIANA; FIGUEIREDO; SIQUEIRA, 2017). O Brasil ocupa posição de destaque no que diz respeito à essa biotecnologia, passando de referência apenas regional, nos anos 1990, para maior produtor mundial entre os anos de 2012 e 2013, tornando-se líder no uso da PIVE e definindo tendências que seriam observadas nos anos subsequentes em diversos países (GONÇALVES; VIANA, 2019). O sucesso como um todo da PIVE é dependente do número e da qualidade dos CCOs coletados durante a aspiração folicular, sendo que diversos fatores podem afetar a qualidade do oócito. Alguns afetam negativamente a PIVE, tais como o estresse térmico, grupamento genético, idade e estágio de lactação de vacas doadoras (BARUSELLI et al., 2016).

Conforme descrito em sessões anteriores dessa revisão, o estresse térmico em vacas leiteiras é capaz de comprometer a qualidade do oócito pela alteração da dinâmica folicular (BADINGA et al., 1993), resultando na inabilidade de estabelecimento da dominância folicular ou na duração prolongada da dominância (WOLFENSON et al., 1995), o que leva a consequente codominância (TORRES-JÚNIOR et al., 2008). Adicionalmente, o estresse térmico durante o período de crescimento folicular tem potencial de comprometer o oócito, seja por ação direta da elevação da temperatura no oócito ou devido a alterações na função folicular (HANSEN; ARÉCHIGA, 1999). Um estudo conduzido por Ferreira et al. (2011) em ambiente tropical reporta que durante a estação mais quente do ano, os oócitos obtidos de vacas e novilhas Holandês apresentaram menor competência de desenvolvimento *in vitro* se comparados aos oócitos coletados na estação mais fria.

Outro fator que pode influenciar a qualidade oocitária é a origem genética dos animais (*Bos taurus taurus* ou *Bos taurus indicus*). A exposição a temperaturas elevadas leva a menos efeitos deletérios nas células de animais pertencentes à raças zebuínas do que em animais de raças europeias, devido à habilidade superior que os animais zebuínos apresentam em regular a temperatura corporal durante situações de estresse térmico, o que resulta em menor produção de calor metabólico (HANSEN, 2004). Uma vez que animais de origem zebuína são mais resistentes aos danos causados pelo estresse térmico, os efeitos do estresse oxidativo e os danos celulares serão menores nesse grupamento genético (HANSEN, 2004).

A produção de leite por vaca tem crescido constantemente devido à combinação de melhoras no manejo, nutrição adequada e intensa seleção genética, a qual foi associada ao decréscimo da eficiência reprodutiva (LUCY, 2001). Vacas leiteiras de alta produção usualmente entram em um estado chamado balanço energético negativo (BEN) no pós-parto, que ocorre quando o requerimento energético para manutenção e produção de leite excedem os valores de energia consumidos na dieta (MOORE; DE VRIES, 2020). Esse quadro de BEN no início da lactação determina baixas concentrações plasmáticas de glicose e insulina e elevadas concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE), corpos cetônicos e ureia no sangue (CARVALHO et al., 2015). O BEN resulta em aumento da mobilização de reservas corporais para suprir a deficiência do consumo, sendo esse déficit maior quando as vacas atingem o pico de produção de leite (MATOBA et al., 2012). O tecido adiposo representa a reserva energética corporal, a qual consiste em células repletas de triglicerídeos, os adipócitos. Os triglicerídeos são moléculas formadas por ácidos graxos de cadeia longa esterificadas a uma molécula de glicerol. Dentro dos adipócitos, os triglicerídeos são constantemente quebrados e sintetizados, e a quebra desses compostos, também chamada lipólise, se dá pela quebra da

ligação éster, o que resulta na liberação de AGNE (HERDT, 2000). Os AGNE podem ser utilizados de três formas pela vaca leiteira: 1) convertidos diretamente em energia (melhor alternativa), 2) convertidos em corpos cetônicos pelo fígado (menos desejável) e 3) armazenados como gordura no fígado. O  $\beta$ -hidroxibutirato (BHBA) é um dos principais corpos cetônicos produzidos pelo fígado e quando em altas concentrações no organismo (quadro clínico conhecido como cetose) reduz o consumo alimentar e, por consequência, a produção de leite, sendo, portanto, um indicador da adaptação da vaca ao BEN (FRIGOTTO; ALMEIDA, 2009).

Os efeitos de altas concentrações de AGNE durante a fase de maturação final do oócito foram testadas. Usando um modelo bovino *in vitro*, Van Hoeck et al. (2011) estudaram os efeitos de concentrações altas e patológicas dos três mais importantes AGNE (palmítico, esteárico e oleico) sobre a maturação oocitária. Os resultados apontaram que a maturação oocitária final em microambiente folicular com altas concentrações de AGNE (425  $\mu$ m) resulta em blastocistos com número de células significativamente menor e maior índice apoptótico.

Leroy et al. (2004) realizaram um estudo a fim de examinar como as mudanças metabólicas pós-parto se refletem no fluido folicular do folículo dominante (> 8 mm). Coletas de sangue dos animais (n = 9) foram realizadas 6 dias pré-parto e 47 dias pós-parto. Do dia 14 ao dia 47 pós-parto os animais foram submetidos à OPU, apenas do folículo dominante. Os autores concluíram que o CCO possui um mecanismo de defesa contra altas concentrações de AGNE, pois estes metabólitos foram encontrados em altas concentrações no soro e baixas no fluido folicular. A ureia, por outro lado, foi encontrada alta em ambos compartimentos, demonstrando seu efeito tóxico ao oócito. As concentrações de glicose também foram similares entre soro e fluido folicular, demonstrando que, embora a prioridade do animal seja produzir leite, o oócito é protegido contra baixas concentrações de glicose, pois esta é de suma importância para o seu desenvolvimento.

Leroy et al. (2005) estudaram a concentração e a composição de AGNEs no fluido folicular de vacas leiteiras de alta produção durante o período de BEN no início do pós-parto. Os AGNEs foram então adicionados durante a MIV em concentrações previamente mensuradas no fluido folicular, a fim de avaliar os efeitos na competência de desenvolvimento oocitária. O fluido folicular do folículo dominante e amostras de sangue foram coletados nos dias 16 e 44 pós-parto (n= 9). As concentrações de AGNE no fluido folicular (0,2 – 0,6 mmol/L) permaneceram  $\pm$  40% mais baixas do que a concentração encontrada no soro sanguíneo (0,4 – 1,2 mmol/L). A composição dos AGNE diferiu

significativamente entre o soro e o fluido folicular, sendo os ácidos oleico, palmítico e esteárico os componentes predominantes no fluido folicular. Baseado nesses resultados, 5115 oócitos foram maturados por 24 h sem (grupo controle) ou com a adição de 0,2 mmol de ácido oleico, 0,133 mmol de ácido palmítico ou 0,067 mmol de ácido esteárico dissolvidos em etanol. Posteriormente, os oócitos foram fertilizados e cultivados por 7 dias. A adição de ácido palmítico ou esteárico durante a MIV teve efeito negativo em todos os processos de produção de embriões, bem como maior número de células do *cumulus* apoptóticas. Ácido oleico não afetou a maturação. Esse estudo *in vitro* sugere que o BEN pode prejudicar a fertilidade de vacas leiteiras de alta produção devido à alta concentração de ácido palmítico ou esteárico no fluido folicular, o que afeta a qualidade do oócito. Em estudo posterior, Leroy et al. (2006) avaliaram o efeito das concentrações de glicose e BHBA observadas durante o BEN em vacas leiteiras sobre a MIV de oócitos. Nesse estudo, simulou-se ambientes de cetose clínica e subclínica, a fim de demonstrar a importância da glicose no ambiente folicular. Nesse sentido, a cetose clínica foi prejudicial ao desenvolvimento oocitário, não somente pela alta concentração de BHBA, mas também devido à hipoglicemia.

As concentrações plasmáticas de glicose, insulina e IGF-1 (*insuline-like growth factor I*) estão reduzidas em vacas em BEN, e sabe-se que a insulina e o IGF-1 são importantes para o desenvolvimento folicular ovariano (BUTLER, 2003). A hipoinsulinemia provoca redução na expressão hepática do receptor do GH, o que causa o desacoplamento do eixo somatotrófico, apesar das elevadas concentrações circulantes de GH no início da lactação. O efeito final é a redução nas concentrações plasmáticas de IGF-1, outra adaptação metabólica para priorizar glicose para a glândula mamária (BUTLER; PELTON; BUTLER, 2006).

Vacas leiteiras em lactação necessitam de grandes quantidades de aminoácidos metabolizáveis para a síntese de proteína do leite, e dietas com teor limitado de proteína bruta podem levar ao comprometimento do crescimento microbiano e da fermentação ruminal, os quais refletem em queda da produção de leite e do consumo (SANTOS, 2010). Por outro lado, o fornecimento de teores de proteína acima dos valores recomendados tem sido associado em valores de amônia e ureia aumentados, tanto no sangue quanto no leite, os quais têm sido considerados como marcadores para redução da fertilidade (BUTLER, 1998). Altas concentrações de ureia sistêmica têm sido associadas à redução do pH uterino (7,1 para 6,8) e à alteração na composição iônica do fluido folicular, sendo que ambos criam um ambiente hostil para o desenvolvimento embrionário (EROLD; BUTLER, 1993). Contudo, os resultados dos estudos são controversos, e estudos recentes reportam ausência de efeito de

proteína em dietas com valor alto desse nutriente em amônia e glicose plasmática, pH uterino, taxa de prenhez, taxa de clivagem e de blastocistos (AMUNDSON et al., 2016).

Fenwick et al. (2008) publicaram um estudo sobre as proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o BEN. Vacas da raça Holandesa foram divididas em dois grupos: BEN moderado e BEN severo. Após serem submetidas aos tratamentos, os animais foram sacrificados, as tubas uterinas coletadas, e a expressão gênica para os genes dos membros da família IGF foi realizada. Foi observada menor expressão das proteínas de ligação de IGF do tipo 2 e 6 no BEN severo se comparado ao moderado. Isso sugere que o BEN pode influenciar o ambiente de tuba não por diminuir a síntese de IGF, mas por prejudicar seu transporte.

Durante o período de BEN, as concentrações sanguíneas de GH (hormônio do crescimento) estão aumentadas, e isso direciona a partição de nutrientes e fornece suporte à produção de leite (LEROY, 2008). Vários tecidos são afetados pelo GH, mas os eventos coordenados por esse hormônio no fígado e no tecido adiposo possivelmente são os mais importantes para a lactação (BELL, 1995). No fígado, o aumento do GH pós-parto estimula o incremento da gliconeogênese para conseguir suprir os requerimentos para a síntese de lactose pela glândula mamária, e no tecido adiposo o GH promove a lipólise enquanto antagoniza a lipogênese, e bloqueia o aumento de glicose dependente de insulina (LEROY, 2008).

Após o parto, uma onda de desenvolvimento folicular ocorre no prazo de cinco a sete dias, independente do BEN. Assim, o início de uma onda folicular e a formação de um folículo dominante durante o BEN não limita a primeira ovulação. Todavia, o folículo dominante da primeira onda pós-parto pode ter três destinos: 1) ovulação do folículo dominante da primeira onda folicular pós-parto (16 a 20 dias pós-parto); 2) falha de ovulação do primeiro folículo dominante e surgimento de uma nova onda folicular e 3) falha de ovulação do primeiro folículo dominante e desenvolvimento de um cisto folicular. O desenvolvimento de um folículo dominante não ovulatório ou de folículos císticos prolonga o intervalo do parto à primeira ovulação para 40 a 50 dias pós-parto (BEAM; BUTLER, 1997; DE VRIES; VEERKAMP, 2000; GIULIODORI et al., 2011; MIQUEO et al., 2019). Considerando as alterações que ocorrem no BEN, Britt (1992) formulou a hipótese de que folículos que crescem durante este período podem ser afetados de forma negativa pelas mudanças metabólicas que ocorrem nos tecidos da vaca, o que resulta em efeito residual na qualidade do oócito que será potencialmente fertilizado 60 a 80 dias depois.

Essas alterações no microambiente folicular, ocasionadas pelo BEN interferem no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (WEBB et al., 2004; BISINOTTO et al., 2012). Por

exemplo, a frequência dos pulsos de LH tem se mostrado positivamente correlacionada ao balanço energético e negativamente correlacionada à concentração plasmática de AGNE. Adicionalmente, a leptina é um hormônio conhecido por ter sua concentração aumentada em situações de balanço energético positivo, a qual estimula a secreção de GnRH pelo hipotálamo, sendo a concentração sanguínea de leptina fortemente associada à frequência e amplitude dos pulsos de LH (KADOKAWA; BLACHE; MARTIN, 2006).

Contudo, nos últimos anos, um incremento na fertilidade de vacas leiteiras tem sido observado, mesmo com o aumento da produção de leite. Relatórios do USDA (United States Department of Agriculture, citado por SANTOS, 2018, p. 1) indicam que tanto a fertilidade fenotípica e genotípica atingiram o ponto mais baixo no início dos anos 2000 e, desde então, uma tendência ascendente começou, com ganhos fenotípicos observados muito mais rápidos do que os ganhos genotípicos, o que não é surpreendente dado a baixa herdabilidade (somente 4%) para a característica fertilidade da filha (SANTOS, 2018). Esse fato pode ser corroborado pela atualização da base genética nas avaliações que são divulgadas pelo USDA e pelo CDCB (*Council on Dairy Cattle Breeding*), na qual houve aumento no PTA (*predicted transmitting ability*) para leite de 512 libras e na DPR (*daughter pregnancy rate*) de 0,3 (FOGAÇA, 2020).

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O estresse térmico é capaz de comprometer diversos aspectos da reprodução bovina, desde parâmetros reprodutivos observados rotineiramente nas fazendas, como expressão do comportamento de estro e taxa de prenhez, até alterações em organelas celulares. Diversos estudos apontam efeito diferencial do estresse térmico em animais taurinos e zebuínos, o que é um agravante para a criação de raças europeias em países tropicais, pois esses animais são mais susceptíveis ao estresse térmico.

A elevação da temperatura dos sistemas orgânicos pode levar ao acúmulo de radicais livres nas células, o que gera o estresse oxidativo, que pode comprometer a competência de desenvolvimento oocitária. Por isso, a adição de antioxidantes como a melatonina, ao meio MIV pode auxiliar a mitigar os efeitos deletérios do estresse térmico em oócitos bovinos. Embora existam estudos nos quais a melatonina foi adicionada ao meio MIV de oócitos provenientes de abatedouro, muito ainda se especula acerca da melhor dose a ser adicionada a fim de melhorar a maturação, reduzir a apoptose e o estresse oxidativo. Adicionalmente, a literatura carece de estudos com oócitos aspirados de vacas.

Existem diversos estudos acerca da diferença na qualidade de oócitos *Bos taurus* e *Bos indicus*. Porém, é também importante associá-los a parâmetros fisiológicos que possam indicar em qual situação térmica o animal se encontra, que foi também um objetivo do presente trabalho.

Portanto, é importante avaliar a ação da melatonina em oócitos aspirados de vacas leiteiras sobre a competência de desenvolvimento. Além disso, a associação de parâmetros fisiológicos ao grupamento genético permite melhor avaliação da condição térmica dos animais.

## REFERÊNCIAS

- ABDELATTY, A.M.; IWANIUK, M.E.; POTTS, S.B.; GAD, A. Influence of maternal nutrition and heat stress on bovine oocyte and embryo development. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. S1-S5, Jan. 2018.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 3, p. 28, July 2005.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, Philadelphia, v. 18, n. 3, p. 325–332, June 2006.
- ALBERTI, C. Melatonin: the first hormone isolated from the pineal body. **Farmaco Science**, v. 13, n. 8, p. 604-605, 1958.
- ALLEN, J.D.; HALL, L.W.; COLLIER, R.J.; SMITH, J.F. Effect of core temperature, time of day, and climate condition on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 98, p. 118-127, 2015.
- AMUNDSON, O.L.; LARIMORE, E.L.; MCNEEL, A.K.; CHASE JR., C.C.; CUSHMAN, R.A.; FREETLY, H.C.; PERRY, G.A. Uterine environment and pregnancy rate of heifers with elevated plasma urea nitrogen. **Animal Reproduction Science**, v. 173, p. 56-62, 2016.
- ARMSTRONG, D.V. Symposium: Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 77, p. 2044-2050, 1994.
- ASCARI, I.J. **Adição do fator de crescimento semelhante à insulina – I ou melatonina ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico**. 2016. 120p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- ASCARI, I.J.; ALVES, N.G.; JASMIN, J.; LIMA, R.R.; QUINTÃO, C.C.R.; OBERLENDER, G.; MORAES, E.A.; CAMARGO, L.S.A. Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 60, p. 50-60, 2017.
- AZEVÊDO, D.M.M.R.; ALVES, A.A. **Bioclimatologia aplicada à produção de bovinos leiteiros nos trópicos**. 1ª edição. Teresina, PI: Embrapa Meio-Norte, 2009. 83 p.
- BADINGA, L.; THATCHER, W.W.; DIAZ, T.; DROST, M.; WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, Los Altos, v. 39, p. 797-810, 1993.
- BARUSELLI, P.S.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; FERREIRA, R.M.; GUERREIRO, B.G.; BAYEUX, B.M.; SALES, J.N.S.; SOUZA, A.H.; GIMENES, L.U. Factors that interfere with oocyte quality for *in vitro* production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 264-272, Jul./Set. 2016.

- BAUMAN, D.E.; CURRIE, B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 63, p. 1514-1529, 1980.
- BEAM, S.W.; BUTLER, W.R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. **Biology of Reproduction**, v.56, p. 133-142, 1997.
- BELL, A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Sciences**, v. 73, p. 2804-2819, 1995.
- BERMAN, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; MAMEN, M.; HERZ, Z.; WOLFENSON, D.; ARIELI, A.; GRABER, Y. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 68, p. 1488-1495, 1985.
- BISINOTTO, R.S.; GRECO, L.F.; RIBEIRO, E.S.; MARTINEZ, N.; LIMA, F.S.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 260-272, Jul./Set. 2012.
- BITTMAN, E.L.; KARSCH, F.J. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 30, p. 585-593, 1984.
- BLOCK, J.; CHASE JR, C.C.; HANSEN, P.J. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal *versus* paternal contribution. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 32-37, 2002.
- BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J.B. Temperature-humidity Indices as indicators of milk production losses due to heat stress. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 90, n. 4, p. 1947-1956, Apr. 2007.
- BOJKOVÁ, B.; KAJO, K.; KUBATKA, P.; SOLÁR, P.; PÉC, M.; ADAMKOV, M. Metformin and melatonin improve histopathological outcome of NMU-induced mammary tumors in rats. **Pathology - Research and Practice**, v. 4, p. 722-729, Abr. 2019.
- BRIDGES, P.J.; BRUSIE, M.A.; FORTUNE, J.E. Elevated temperature (heat stress) *in vitro* reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 508-522, 2005.
- BRITT, J.H. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **Bovine Practice**, v. 24, p. 39-43, 1992.
- BUFFINGTON, D.E.; COLLIER, R.J.; CANTON, G.H. Shade management systems to reduce heat stress for dairy cows in hot, humid climate. **American Society of Agriculture and Biological Engineers**, v. 26, n. 6, p. 1798-1802, 1983.
- BUTLER, W.R. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, p. 2533-2539, 1998.

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

BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 89, n. 8, p. 2938-2951, 2006.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; SERAPIÃO, R.V.; DE SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; GUIMARÃES, M.F.M.; VALE FILHO, V.R. Developmental competence and expression of the HSP 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, Los Altos, v. 68, p. 626-632, 2007.

CARVALHO, B.C.; SANTOS, G.B.; VARAGO, F.C.; PIRES, M.F.A.; VARGAS, M.W.; MACHADO, F.S.; CAMPOS, M.M. **Tópicos avançados em reprodução de bovinos leiteiros**. 1ª edição. Brasília, DF: Embrapa Gado de Leite, 2015.

CAVALLARI, F.C.; LEAL, C.L.V.; SVI, R.; HANSEN, P.J. Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock and oxidative stress during *in vitro* maturation. **Zygote**, v. 27, p. 180-186, 2019.

CEBRIAN-CERRANO, A.; SALVADOR, I.; RAGA, E.; DINNYES, A.; SILVESTRE, M.A. Beneficial effect of melatonin on blastocyst *in vitro* production from heat-stressed bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 738-746, 2013.

CENA, K.; MONTEITH, J.L. Transfer processes in animal coats. I. Radiative transfer. **Proceedings Royal Society London**, v. 188, p. 377-393, 1975a.

CENA, K.; MONTEITH, J.L. Transfer processes in animal coats. II. Conduction and Convection. **Proceedings Royal Society London**, v. 188, p. 395-411, 1975b.

CENA, K.; MONTEITH, J.L. Transfer processes in animal coats. III. Water vapour diffusion. **Proceedings Royal Society London**, v. 188, p. 413-423, 1975c.

CHEN, W.; CHEN, X.; CHEN, A.C.; SHI, Q.; PAN, G.; PEI, M.; YANG, H.; LIU, T.; HE, F. Melatonin restores the osteoporosis-impaired osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells by preserving SIRT1-mediated intracellular antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, 2019.

COLLIER, R.J.; RENQUIST, B.J.; XIAO, Y. A 100-year review: stress physiology including heat stress. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 100, n. 12, p. 10367-10380, 2017.

COPPOCK, C.E.; GRANT, P.A.; PORTZER, S.J.; CHARLES, D.A.; ESCOBOZA, A. Lactating dairy cow responses to dietary sodium, chloride, and bicarbonate during hot weather. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 65, p. 566-576, 1982.

CORSI, S.; HUGO, W.; KIENZLEJ.; MBA, C. Production and resources. Climate-smart crop production. **Climate-Smart Agriculture Sourcebook – FAO**, 2017. 3p.

CRICHTON, J.H.; PLAYFOOT, C.J.; ADAMS, I.R. The role of chromatin modifications in progression through mouse meiotic phase. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 41, p. 97-106, 2014.

DALCIN, V.C.; FISCHER, V.; DALTRO, D.S.; ALFONZO, E.P.M.; STUMPF, M.T.; KOLLING, G.J.; SILVA, M.V.G.B.; MACMANUS, C. Physiological parameters for thermal stress in dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 45, n. 8, p. 458-465, 2016.

DAS, R.; GUPTA, I.; VERMA, A.; SINGH, A.; CHAUDHARI, M.V.; SAILO, R.; UPADHYAY, R.C.; GOSWAMI, J. Genetic polymorphisms in *ATPIAI* gene and their association with heat tolerance in Jersey crossbred cows. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 1, p. 50-54, 2015.

DE VRIES, M.J.; VEERKAMP, R.F. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 83, n. 1, p. 62-69, 2000.

DIKMEN, S.; HANSEN, P.J. Is the temperature - humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 92, n. 1, p. 109-116, 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.

EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEAVER, L.D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 72, p. 68-78, 1989.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 55, p. 340-346, 1996.

EROLD, C.C.; BUTLER, W.R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 694-701, 1993.

FAÇANHA, D.A.E.; SILVA, R.G.; MAIA, A.S.C.; GUILHERMINO, M.M.; VASCONCELOS, A.M. Variação anual de características morfológicas e da temperatura de superfície do pelame de vacas da raça Holandesa em ambiente semiárido. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 837-844, 2010.

FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo, SP: GEN – Grupo Editorial Nacional, 2008. 1406 p.

FENWICK, M.A.; LLEWELLYN, S.; FITZPATRICK, R.; KENNY, D.A.; MURPHY, J.J.; PATTON, J.; WATHES, D.C. Negative energy balance in dairy cows is associated with specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct. **Reproduction**, v. 135, p. 63-75, 2008.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, p. 836-848, 2009.

FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M.R.; FERRAZ, M.L.; ARAÚJO, A.B.; RODRIGUES, C.A.; WATANABE, Y.F.; VIREQUE, A.A.; JOAQUIM, D.C.; SMITH, L.C.; MEIRELLES, F.V.; BARUSELLI, P.S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 94, p. 2383-2392, 2011.

FERREIRA, R.A. **Maior produção com melhor ambiente para aves, suínos e bovinos**. 3ª edição. Viçosa, MG: Aprenda Fácil Editora, 2016, 528 p.

FISCHER, A.E.; BERNAL, D.P.; GUTIERREZ-ROBAYO, C.; RUTLEDGE, J.J. Estimates of heterosis for *in vitro* embryo production using reciprocal crosses in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 54, p. 1433-1442, 2000.

FOGAÇA, F. Mudança base genética 2020. **Alta Genetics**. 22 abr. 2020. Disponível em <<https://altagenetics.com.br/noticias/leite/mudanca-base-genetica-2020>>. Acesso em: 31 ago. 2020.

FRIGOTTO, T.A.; ALMEIDA, R. Perfil metabólico em vacas leiteiras no período de transição. **MilkPoint**. 02 nov. 2009. Disponível em <<https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao-de-leite/perfil-metabolico-em-vacas-leiteiras-no-periodo-de-transicao-58340n.aspx>>. Acesso em: 02 set. 2020.

FU, Y.; HE, C.J.; JI, P.Y.; ZHUO, Z.Y.; TIAN, X.Z.; WANG, F.; TAN, D.X.; LIU, G.S. Effects of melatonin on the proliferation and apoptosis of sheep granulosa cells under thermal stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 21090-21104, 2014.

GAD, A.; HAMED, S.A.; KHALIFA, M.; AMIN, A.; EL-SAYED, A.; SWIEF, S.A.; EL-ASSAL, S. Retinoic acid improves maturation rate and upregulates the expression of antioxidant-related genes in *in vitro* matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. 279-285, 2018.

GANAI, A.H.; SHANKER, G.; BUMLA, N.A.; GHASURA, R.S.; MIR, N.A.; WANI, S.A.; DUDHATRA, G.B. Biochemical and physiological changes during thermal stress in bovines. **Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 4, p. 1-6, 2013.

GENDELMAN, M.; AROYO, A.; YAVIN, S.; ROTH, Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage time, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 140, p. 73-82, 2010.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. *In vivo vs in vitro* models for studying the effects of elevated temperature on the VG stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 134, p. 125-134, 2012.

GILARD, E.; MEIDAN, R.; BERMAN, A.; GRABER, Y.; WOLFENSON, D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotropin secretion in relation to concentration of

oestradiol in plasma of cyclic cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 315-321, 1993.

GIULIODORI, M.J.; DELAVALD, C.; CHILLIARD, Y.; BECÚ-VILLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I.; DE LA SOTA, R.L. High NEFA concentrations around parturition are associated with delayed ovulations in grazing dairy cows. **Livestock Science**, v. 141, p. 123-128, 2011.

GONÇALVES, R.L.R.; VIANA, J.H.M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 156-159, abr./jun. 2019.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.E.I.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

GUPTA, S.; SEKHON, L.; KIM, Y.; AGARWAL, A. The role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction. **Current Women's Health Reviews**, v. 6, p. 227-238, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 2<sup>nd</sup> ed., Oxford, EUA: Clarendon Press, 1989, 85 p.

HAMA, S.; UENISHI, S.; YAMADA, A.; OHGITA, T.; TSUCHIYA, H.; YAMASHITA, E.; KOGURE, K. Scavenging of hydroxyl radicals in aqueous solution by astaxanthin encapsulated in liposomes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 12, p. 2238-2242, 2012.

HANSEN, P.J.; ARÉCHIGA, C.F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 82, n. 2, p. 36-50, 1999.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 349-360, 2004.

HANSEN, P.J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. **Theriogenology**, Los Altos, v. 68S, p. S242-S249, 2007.

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

HANSEN, P.J. Supplemental antioxidants to enhance fertility in dairy cattle, Gainesville, Flórida, 2010, p. 157-167.

HANSEN, P.J. Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted reproduction. In: AETE, 35., 2019, Múrcia. **Proceedings...** Múrcia: Animal Reproduction, Jul/Set. 2019. p. 497-507.

HANSSON, H.; LAGERKVIST, C.J. Dairy farmers' use and non-use values in animal welfare: Determining the empirical content and structure with anchored best-worst scaling. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 99, n. 1, p. 579-592, 2016.

HERDT, T.H. Ruminant adaptation to negative energy balance – Influences of etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 215-230, Jul. 2000.

ISPADA, J.; RODRIGUES, T.A.; RISOLIA, P.H.B.; LIMA, R.S.; GONÇALVES, D.R.; RETTORI, D.; NICHI, M.; FEITOSA, W.B.; PAULA-LOPES, F.F. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 9, p. 1169-1179, 2018.

JEROME, A.; THIRUMARAN, S.M.K.; KALA, S.N. Repertoire of noncoding RNAs in corpus luteum of early pregnancy in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary World**, v. 10, p. 1129-1134, 2017.

JU, J.C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 79-90, abr/jun. 2005.

KADOKAWA, H.; BLACHE, D.; MARTIN, G.B. Plasma leptin concentrations correlate with luteinizing hormone secretion in early postpartum Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 89, n. 8, p. 3020-3027, 2006.

KADZERE, C.T.; MURPHY, M.R.; SILANIKOVE, N.; MALTZ, E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, v. 77, p. 59-91, 2002.

KRUIP, T.A.M.; CRAN, D.G.; VAN BENEDEN, T.H.; DIELEMAN, S.J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. **Gamete Research**, v. 8, p. 29-47, 1983.

LAWRENCE, J.L.; PAYTON, R.R.; GODKIN, J.D.; SAXTON, A.M.; SCHRICK, F.N.; EDWARDS, J.L. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 8, p. 2449-2454, Fev. 2004.

LERNER, A.B.; CASE, J.D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T.H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 2587-2587, May 1958.

LERNER, A.B.; CASE, J.D.; MORI, W.; WRIGHT, M.R. Melatonin in peripheral nerve. **Nature**, v. 183, p. 1821, Jun. 1959.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGUE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; DEWULF, J.; KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post-partum. **Theriogenology**, Los Altos, v. 62, p. 1131-1143, 2004.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; KRUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid

of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v. 130, p. 485-495, 2005.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. The *in vitro* development of bovine oocytes after maturation in glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 119-123, 2006.

LEROY, J.L.M.R. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 2, p. 31-39, 2008.

LI, J.; FOOTE, R.H.; SIMKIN, M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 48, p. 33-37, 1993.

LI, R.; WU, H.; ZHUO, W.W.; MAO, Q.F.; LAN, H.; ZHANG, Y.; HUA, S. Astaxanthin normalizes epigenetic modifications of bovine somatic cell cloned embryos and decreases the generation of lipid peroxidation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 793-799, 2015a.

LI, Y.; ZHANG, Z.; HE, C.; ZHU, K.; XU, Z.; MA, T.; TAO, J.; LIU, G. Melatonin protects porcine oocyte *in vitro* maturation from heat stress. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 59, p. 365-375, 2015b.

LI, Y.; LIU, H.; WU, K.; LIU, H.; HUANG, T.; CHEN, Z.J.; ZHAO, S.; MA, J.; ZHAO, H. Melatonin promotes human oocyte maturation and early embryo development by enhancing clathrin-mediated endocytosis. **Journal of Pineal Research**, v. 67, p. 1-12, 2019.

LIMA, P.H. **Adição de melatonina ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico *in vitro*: efeitos sobre as taxas de produção e qualidade dos blastocistos**. 2018. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.

LUCIANO, A.M.; LODDE, V. **Changes of large-scale chromatin configuration during mammalian oocyte differentiation**. London, EN: Springer-Verlag, 2013, 17 p.

LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 84, p. 1277-1293, 2001.

MARQUES, T.C.; SANTOS, E.C.S.; DIESEL, T.O.; LEME, L.O.; MARTINS, C.F.; DODE, M.; ALVES, B.G.; COSTA, F.; OLIVEIRA, E.B.; GAMBARINI, M.L. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the *in vitro* production and quality of bovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 226-236, Fev. 2018.

MATOBA, S.; O'HARA, L.; CARTER, F.; KELLY, A.K.; FAIR, T.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 95, n. 3, p. 1257-1266, 2012.

- MATSUZUKA, T.; SAKAMOTO, N.; OZAWA, M.; USHITANI, A.; HIRABAYASHI, M.; KANAI, Y. Alleviation of maternal hyperthermia-induced early embryonic death by administration of melatonin to mice. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 39, n. 3, p. 217-223, Oct. 2005.
- MCMANUS, C.; PRESCOTT, E.; PALUDO, G.R.; BIANCHINI, E.; LOUVANDINI, H.; MARIANTE, A.S. Heat tolerance in naturalized Brazilian cattle breeds. **Livestock Science**, v. 120, p. 256-264, 2009.
- MEMILI, E.; DOMINKO, T.; FIRST, N.L. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 36-41, 1998.
- MERMILLOD, P.; MARCHAL, R. Oocyte of domestic mammals: a model for the study of *in vitro* maturation. **Contraception, Fertilité, Sexualité**, v. 6, p. 440-448, 1999.
- MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZLNSKA, E. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 76, n. 9, p. 2812–2823, Sept. 1993.
- MIQUEO, E.; CHIARLE, A.; GIULIODORI, M.J.; RELLING, A.E. Association between prepartum metabolic status and resumption of postpartum ovulation in dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 69, p. 62-67, 2019.
- MONTILLA, S.I.R.; JONHSON, T.P.; PEARCE, S.C.; GARDAN-SALMON, D.; GABLER, N.K.; ROSS, J.W.; RHOADS, R.P.; BAUMGARD, L.H.; LONERGAN, S.M.; SELSBY, J.T. Heat stress causes oxidative stress but not inflammatory signaling in porcine skeletal muscle. **Temperature**, v. 1, n. 1, p. 42-50, 2014.
- MOORE, S.M.; DE VRIES, T.J. Effect of diet-induced negative energy balance on the feeding behavior of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 103, n. 8, p. 7288-7301, Ago. 2020.
- NABENISHI, H.; OHTA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZAWA, K.; TSUZUKI, Y. The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. **Zygote**, v. 20, p. 249-259, Ago. 2011.
- NABENISHI, H.; NAKAGI, S.; KAMATA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZAWA, K.; TSUKURI, Y. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as a determined by effects of cyclosporine. **A Molecular Reproduction & Development**, v.79, p. 31-40, 2012.
- NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-29, Jan. 2000.
- OLIVEIRA, C.S.; SERAPIÃO, R.V.; CAMARGO, A.J.R.; FREITAS, C.; IGUMA, L.T.; CARVALHO, B.C.; CAMARGO, L.S.A.; OLIVEIRA, L.Z.; VERNEQUE, R.S. Oocyte origin affects the *in vitro* embryo production and development of Holstein (*Bos taurus taurus*)

- Gyr (*Bos taurus indicus*) reciprocal cross embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 209, p. 1061-1065, 2019.

ORTEGA, M.S.; ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; MINGOTI, G.Z.; ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Modification of embryonic resistance to heat shock in cattle by melatonin and genetic variation in *HSPAIL*. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 99, p. 9152-9164, 2016.

OSEI-AMPONSAH, R.; CHAUHAN, S.S.; LEURY, B.J.; CHENG, L.; CULLEN, B.; CLARKE, I.J.; DUNSHEA, F.R. Genetic selection for thermotolerance in ruminants. **Animals**, v. 9, p. 1-18, 2019.

PATEL, P.A.; CHAUDHARY, S.S.; PURI, G.; SINGH, V.K.; ODEDARA, A.B. Effects of  $\beta$ -mercaptoethanol on *in vitro* maturation and glutathione level of buffalo oocytes. **Veterinary World**, v. 8, n. 2, p. 213-216, 2015.

PAULA, F.A.P. **Efeito da melatonina na maturação *in vitro* sobre a expressão gênica e a qualidade de oócitos bovinos sob choque térmico**. 2017. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

PAULA-LOPES, F.F.; LIMA, R.S.; SATRAPA, R.A.; BARROS, C.M. Physiology and endocrinology symposium: Influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 1143-1153, 2013.

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

PAYTON, R.R.; RISPOLI, R.A.; SAXTON, A.M.; EDWARDS, J.L. Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 57, n. 4, p. 481-91, Sept. 2011.

PICCIONI, F.; ZAPPAVIGNA, V.; VERROTTI, A.C. Translational regulation during oogenesis and early development: The cap-poly (A) tail relationship. **Comptes Rendus Biologies**, v. 328, p. 863-881, 2005.

PU, Y.; WANG, Z.; BIAN, Y.; ZHANG, F.; YANG, P.; LI, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; FANG, F.; CAO, H.; ZHANG, X. All-trans retinoic acid improves goat oocyte nuclear maturation and reduces apoptotic *cumulus* cells during *in vitro* maturation. **Animal Science Journal**, v. 85, p. 833-839, 2014.

RAMIS, M.R.; ESTEBAN, S.; MIRALLES, A.; TAN, D.X.; REITER, R.J. Caloric restriction, resveratrol and melatonin: Role of SIRT1 and implications for aging and related-diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 146, p. 28-41, 2015.

REITER, R.; TANG, L.; GARCIA, J.J.; MUÑOZ-ROYOS, A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. **Life Sciences**, v. 60, n. 25, p. 2255-2271, 1997.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; TERRON, M.P.; FLORES, L.J.; CZARMOCKI, Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 1, p. 1-9, 2007.

ROBICHAUD, M.V.; RUSHEN, J.; PASSILÉ, A.M.; VASSEUR, E.; ORSEL, K.; PELLERIN, D. Associations between on-farm animal welfare indicators and productivity and profitability on Canadian dairies: I. On free-stall farms. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 102, n. 5, p. 1-11, 2019.

ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R.; LIM, J.M.; BLAIR, R.M.; ROUSSEL, J.D.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, n. 3, p. 657-665, Fev. 1998.

ROJAS-DOWNING, M.M.; NEJADHASHEMI, A.P.; HARRIGAN, T.; WOZNICKI, S.A. Climate change and livestock: impacts, adaptation, and mitigation. **Climate Risk Management**, v. 16, p. 145-163, 2017.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 83-90, 2000.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **Reproduction**, v. 121, p. 745-751, 2001a.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v. 122, p. 737-744, 2001b.

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

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

ROTH, Z.; AROYO, A.; YAVIN, S.; ARAV, A. The antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) moderates the deleterious effects of maternal hyperthermia on follicle-enclosed oocytes in mice. **Theriogenology**, Los Altos, v. 70, n. 6, p. 887-897, 2008.

ROTH, Z.; WOLFENSON, D. Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 56, p. 218-227, 2016.

ROTH, Z. Effect of heat stress on reproduction in dairy cows – Insight into the cellular and molecular responses of the oocyte. **Annual Reviews in Animal Bioscience**, v. 5, p. 151-170, 2017.

ROTH, Z. Symposium review: Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 101, n. 4, p. 3642-3654, 2018.

SAFA, S.; KARGAR, S.; MOGHADDAM, G.A.; CILIBERTI, M.G.; CAROPRESE, M. Heat stress abatement during the postpartum period: effects on whole lactation milk yield, indicators of metabolic status, inflammatory cytokines, and biomarkers of the oxidative stress. **Journal of Animal Science**, v. 97, p. 122-132, 2019.

SAILO, L.; GUPTA, I.D.; VERMA, A.; DAS, R.; CHAUDHARI, M.V. Association of single nucleotide polymorphism of Hsp90ab1 gene with thermotolerance and milk yield in Sahiwal cows. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 9, n. 8, p. 99-103, Set. 2015.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 1896-1912, 2012.

SAKATANI, M.; YAMANAKA, K.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. Heat shock-derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in *in vitro* early stage bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 6, p. 496-501, 2008.

SAKATANI, M.; BALBOULA, A.Z.; YAMANAKA, K.; TAKAHASHI, M. Effect of summer heat environment on body temperature, estrous cycles and blood antioxidant levels in Japanese Black cow. **Animal Science Journal**, v. 83, p. 394-402, 2012.

SANTOS, J.E.P. Nutrition and reproduction in dairy cattle. In: Proceedings of 24th Annual Meeting Program - Southeast Dairy Herd Management Conference, 2010, Macon, GA, EUA. **Anais...** Macon: November 3 and 4, 2010. p. 1-128. *Online*.

SANTOS, J.E.P. Improving dairy cow reproduction while maintaining high milk production. In: *Proceedings* of XXII Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, 2018, Uberlândia, MG, Brazil. **Anais...** Uberlândia: March 22 and 23, 2018. p. 1-19. *Online*.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; CORDOVA, C.A.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GUTERRES, S.S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 289, n. 1/2, p. 209-213, Jan. 2005.

SEABRA, L.M.J.; PEDROSA, L.F.C. Astaxanthin: structural and functional aspects. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 6, p. 1041-1050, 2010.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2<sup>nd</sup> ed. Pullman, Washington, EUA: Current Conceptions, 2005, 381 p.

SHEN, P.C.; LEE, J.W.; CHENG, W.T.K.; SU, H.Y.; LEE, S.N.; LIU, B.T.; WANG, C.H.; CHEN, L.R.; JU, J.C. Differential thermal sensitivity between recipient ooplasm and the donor nucleus in Holstein and Taiwan native yellow cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 74, p. 1587-1595, 2010.

SHI, J.M.; TIAN, X.Z.; ZHOU, G.B.; WANG, L.; GAO, C.; ZHU, S.E.; ZENG, S.M.; TIAN, J.H.; LIU, G.S. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves *in vitro* maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 47, p. 318-323, 2009.

SILVA, R.G. Estimativa do balanço térmico por radiação em vacas Holandesas expostas ao sol e à sombra em ambiente tropical. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 1403-1411, 1999.

SMIRNOV, A.N. Nuclear melatonin receptors. **Biochemistry**, Moscow, v. 66, n. 1, p. 19-26, 2001.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; SUGINO, N.; REITER, R.J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 1, p. 328-343, Jul. 2009.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocrine Journal**, Tokyo, v. 60, n. 1, p. 1-13, 2013.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S.; KUWAIAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 49, p. 228-232, 1993.

TIAN, X.Z.; WANG, F.; HE, C.J.; ZHANG, L.; TAN, D.X.; REITER, R.J.; XU, J.; JI, P.Y.; LIU, G.S. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 57, p. 239-247, 2014.

TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PIRES, M.F.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; RAMOS, A.A.; FOLHADELLA, I.M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; SÁ FILHO, M.F.; PAULA-LOPES, F.F.; BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 69, p. 155-166, 2008.

VAN HOECK, V.; STURMEY, R.G.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LEESE, H.J.; BOLS, P.E.J.; LEROY, J.L.M.R. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 1-8, Ago. 2011.

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

VIJAYALAXMI, REITER, R.J.; TAN, D.X.; HERMAN, T.S.; THOMAS JR, C.R. Melatonin as a radioprotective agent: a review. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 59, n. 3, p. 639-653, 2004.

WANG, R.X.; LIU, H.; XU, L.; ZHANG, H.; ZHOU, R.X. Involvement of nuclear receptor RZR/ROR $\gamma$  in melatonin-induced HIF-1 $\alpha$  inactivation in SGC-7901 human gastric cancer cells. **Oncology Reports**, v. 34, p. 2541-2546, 2015.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. E63-E74, 2004.

WEISS, W.P. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: a review. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, p. 2493-2501, 1998.

WEST, J.W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 21-35, 1997.

WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, n. 6, p. 2131–2144, June 2003.

WISE, M.E.; ARMSTRONG, D.V.; HUBER, J.T.; HUNTER, R.; WIERSMA, F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response do thermal stress. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 71, n. 9, p. 2480-2485, 1988.

WOLF, C.A.; TONSOR, G.T.; MCKENDREE, G.S.; THOMSON, D.U.; SWANSON, J.C. U.S. Dairy farmer welfare perceptions and attitudes: survey summary. **MSU AFRE Staff Paper, Michigan State University, East Lansing**, Jul. 2015.

WOLFENSON, D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; SAVIO, J.D.; MEIDAN, R.; LEW, B.J.; BRAW-TAL, R.; BERMAN, A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 52, p. 1106-1113, 1995.

WOLFENSON, D.; LEW, B.J.; THATCHER, W.W.; GRABER, Y.; MEIDAN, R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 47, p. 9-19, 1997.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 535-547, 2000.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 32-38, 2019.

YANG, L.; WANG, Q.; CUI, M.; LI, Q.; MU, S.; ZHAO, Z. Effect of melatonin on the *in vitro* maturation of porcine oocytes, development of parthenogenetically activated embryos, and expression of genes related to the oocyte developmental capability. **Animals**, v. 10, p. 1-13, 2020.

YIN, J.; REN, W.; YANG, G.; DUAN, J.; HUANG, X.; FANG, R.; LI, C.; LI, T.; YIN, Y.; HOU, Y.; KIM, S.W.; WU, G. L-Cysteine metabolism and its nutritional implications. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 0, p. 1-13, 2015.

ZAMPOLLA, T.; SPIKINGS, E.; RAWSON, D.; ZHANG, T. Cytoskeleton proteins F-actin and tubulin distribution and interaction with mitochondria in the granulosa cells surrounding stage III zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 76, p. 1110-1119, 2011.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Title\*: Quality of dairy cows' oocytes and embryo production from oocytes *in vitro* matured with melatonin

Authors: Débora Regina da Silva, João Pedro Araújo Campos, Marcelo Siqueira El Azzi, Pedro Henriques Lima, José Camisão de Souza, Renato Ribeiro de Lima, Nadja Gomes Alves

\*Artigo redigido conforme a norma para publicação periódica científica NBR 6022 (ABNT, 2003a). Esse formato segue o manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações e será um artigo padrão que poderá atender, em qualquer momento, qualquer norma de revista científica.

**Abstract:** Melatonin has potential to scavenge free radicals and has anti-apoptosis properties, so its addition to the *in vitro* maturation (IVM) medium of oocytes may have potential to mitigate the effects of heat stress. The primary objective was to test whether the cleavage rate (CR), production and quality of blastocysts of lactating dairy cow oocytes aspirated during the summer was increased by the addition of melatonin to the IVM medium. Secondly, we aimed to establish an association between oocyte quality and genetic groups, considering the physiological and environmental variables recorded throughout the trial. Oocytes from Holstein cows (H, n = 15, farm 1) and Holstein x Zebu crossbred (HZ n = 16, farm 2; n = 7, farm 3) were obtained by *ovum pick-up* (n = 52; 29 sections on Holstein cows and 23 sections on HZ-crossbred cows) during the summer and spring in Brazil. Oocytes were classified in grades 1, 2, 3, denuded and degenerate. Grades 1, 2, 3, and denuded oocytes obtained during the summer were IVM in medium containing 0, 10<sup>-6</sup> or 10<sup>-4</sup> mol/L melatonin concentrations. The CR was evaluated on day 3 after *in vitro* fertilization (IVF) and embryo production on day 8. The quality of blastocysts was evaluated by the count of cell number and apoptotic cell number. Rectal and superficial temperature, respiratory rate, milk production and days in milk (DIM), were measured. The temperature-humidity index (THI) was 79.0 ± 1.4 on farm 1; 77.7 ± 3.2 on farm 2 and 68.5 ± 1.8 on farm 3. Genetic group did not affect (P > 0.05) physiological variables: respiratory frequency (movements/minute) - H = 74.2 ± 10.5 and HZ = 53.4 ± 6.9; rectal temperature - °C: H = 38.3 ± 0.3 and HZ = 38.3 ± 0.2; superficial temperature - °C: H = 36.6 ± 1.4 and HZ = 36.9 ± 0.9). Genetic group influenced oocyte quality (P < 0.05). In Holstein cows, the proportions of grade 1 (H = 3.2 ± 1.2; HZ = 27.6 ± 4.6; P < 0.0001) and grade 2 (H = 1.6 ± 0.6; HZ = 12.9 ± 2.2; P < 0.0001) oocytes were lower and the proportion of degenerate (H = 5.2 ± 1.5; HZ = 1.7 ± 0.6; P = 0.05) was greater, compared to HZ-crossbreds. Respiratory frequency was negatively associated to grade 1 and positively associated to grade 2 oocytes (P < 0.05). DIM was positively associated to grade 1 and negatively associated to degenerate oocytes (P < 0.05). The proportion of viable oocytes (grade 1 and 2) was lower in Holstein than in HZ-crossbred cows. Relative humidity and respiratory frequency were negatively associated to good oocytes (P < 0.01). There was a treatment x farm interaction effect (P = 0.03) on CR, such that only on farm 1, the 10<sup>-4</sup> mol/L concentration increased (P = 0.09) CR (70.0 ± 17.0%) compared to control (22.0 ± 15.6%); and only on farm 2, CR was increased (P = 0.09) by the 10<sup>-6</sup> mol/L melatonin concentration (50.0 ± 20.3%) compared to control (20.0 ± 13.5%). In conclusion, physiological parameters

did not differ between genetic groups, but HZ-crossbred cows produced greater quality oocytes in comparison to Holstein. The addition of melatonin on IVM medium may be a strategy to increase oocyte CR from lactating dairy cows during the summer. Based on the results, we may suggest that the best concentration differs between genetic groups, e.g., a higher melatonin concentration is necessary for Holstein compared to HZ-crossbred cows.

**Keywords:** Heat stress. Oxidative stress. Genetic group. Cleavage rate of embryos. Bovine.

## 1 INTRODUCTION

Heat stress is defined as the sum of external forces acting on an animal that causes an increase in body temperature and evokes a physiological response, and it is caused by the combined effects of temperature, humidity, solar radiation and wind speed (DIKMEN; HANSEN, 2009). This disturbance is able to impair the reproductive performance of dairy cows by acting on several levels as LH (BRIDGES; BRUSIE; FORTUNE, 2005) and FSH (ROTH et al., 2000) secretion by pituitary gland, CL development (WOLFENSON; ROTH, 2019), developmental competence of oocytes and delay in the first two embryonic divisions (GENDELMAN et al., 2010). It appears that the detrimental effect of heat stress on reproductive performance is more pronounced in *Bos taurus*, rather than in *Bos indicus* cows (ROCHA et al., 1998). Lower quality of *Bos taurus* oocytes in comparison to *Bos indicus* oocytes have been reported (BATISTA et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2020).

The exposure of bovine oocytes and embryos to elevated temperatures may increase the production of radical oxygen species or ROS (reactive oxygen species; ORTEGA et al., 2016; ASCARI et al., 2017; CAVALLARI et al., 2019), such as  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  and  $OH^-$ , which are very reactive molecules (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001). The accumulation of ROS inside the cell may occur, characterizing oxidative stress (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005), which can disrupt the function of bovine maturing oocytes and impair the subsequent embryo development and quality (HANSEN, 2009; CHEUQUEMÁN et al., 2015).

Antioxidants are defined as any substance that, when present at low concentrations compared to that of an oxidizable substrate, significantly delays or inhibits its oxidation (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Antioxidants have been largely used during *in vitro* embryo production, such as retinol (LAWRENCE et al., 2004), cysteine (NABENISHI et al., 2011),  $\beta$ -mercaptoethanol (PATEL et al., 2015), IGF-1 (ASCARI et al., 2017), astaxanthin (ISPADA et al., 2018), and melatonin (CEBRIAN-CERRANO et al., 2013; YANG et al., 2017; LIRA et al., 2020). The multifunctional hormone melatonin (N-acetyl-5-

methoxytryptamine) may exert protective effects on the oocyte. Melatonin is a highly lipophilic and somewhat hydrophilic molecule that easily crosses cell membranes, reaching intracellular organelles including mitochondria and nucleus (TALPUR et al., 2018). At the cellular level, melatonin acts directly as a ROS scavenger, and stimulates the activity of endogenous antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase, while inhibiting the activity of prooxidant enzymes such as cyclooxygenase (TAN et al., 2015). Some reported benefits of melatonin addition to the *in vitro* maturation (IVM) medium of bovine oocytes are effective alleviation of oxidative stress and markedly decreased early apoptosis (AN et al., 2019), higher blastocyst formation rate (PANG et al., 2018), and improved cytoplasmic maturation (ZHAO et al., 2017).

The endogenous melatonin concentration in bovine follicular fluid is approximately  $10^{-11}$  mol/L (TIAN et al., 2014). In order to understand the effects of heat shock, studies usually test doses of melatonin during IVM that are greater than the physiological, such as  $10^{-4}$  mol/L, which resulted in a greater blastocyst rate (CEBRIAN-CERRANO et al., 2013). Rodrigues-Cunha et al. (2016) tested the  $10^{-9}$  and  $10^{-6}$  mol/L melatonin concentrations and observed decreased fragmentation and lower ROS in the oocyte. Using the  $10^{-9}$  and  $10^{-7}$  mol/L melatonin concentrations, Tian et al. (2014) reported improvement in embryo development and total cell number after IVF and upregulation of genes associated to IVM, such as *GDF9*, *MARF1* and *DNMT1 $\alpha$* . On the other hand, Farahavar et al. (2010) did not find difference in maturation rate of oocytes matured with melatonin (0, 0.01 and 1  $\mu$ mol). Studies have been conducted by our research group using melatonin as an antioxidant during IVM, under heat shock conditions. For instance, Ascari (2016) reported that the  $10^{-4}$  mol/L concentration during IVM decreased apoptotic cell number in the inner cell mass (ICM) in comparison to the total cell number in bovine embryos. Later, Paula (2017) observed that the  $10^{-6}$  mol/L melatonin concentration resulted in maturation rates similar to the ones observed under conventional conditions (24 h at 38.5 °C e 5% CO<sub>2</sub>), as well as decreased ROS production and greater *GDF9* expression. Lima (2018) observed that the proportion of  $\geq 8$  cells-embryos increased concomitantly with melatonin concentrations also, reaching a maximum value at the  $10^{-3}$  mol/L concentration. Additionally, the  $10^{-4}$  mol/L concentration resulted in a greater proportion of ICM compared to the total cell number in blastocysts. Therefore, considering the previous results, we decided to test the  $10^{-4}$  and  $10^{-6}$  mol/L concentration in oocytes obtained from dairy cows during the spring and the summer seasons in Southeastern Brazil.

Despite all the research, the optimal bovine IVM melatonin concentration still remains unclear in order to mitigate heat stress effects, and lead to greater embryo yields. Therefore, we hypothesized that the inclusion of melatonin to the IVM medium promotes increases in the cleavage rate of oocytes from lactating dairy cows, as well as benefits embryo production and quality. Oocytes from Holstein and HZ-crossbred cows aspirated during months of high temperature and humidity were *in vitro* matured in different concentrations of melatonin, and their CR evaluated. Since oocytes from *Bos taurus* and *Bos indicus* cows have different susceptibility to heat stress, the objective was to establish an association between oocyte quality and genetic groups, considering the physiological and environmental variables recorded throughout the trial. The literature regarding *abattoir-ovary-oocytes in vitro* matured under heat shock in medium containing antioxidants is extensive, however, to the best of our knowledge, this is the first study in which oocytes from lactating dairy cows in tropical environment were tested during *in vitro* maturation with melatonin.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Ethics**

The methods and procedures described were approved by the Ethics Commission on the Use of Animals from the Federal University of Lavras (UFLA), under the protocol number 102/2018.

### **2.2 Animals, facilities and seasons**

The first part of the study was conducted on the summer (February and March) of 2019, in two facilities: Palmital Experimental Farm / UFLA, in Ijaci, Minas Gerais State, Brazil (Farm 1) and in a commercial dairy herd located in Ingaí, Minas Gerais State, Brazil (Farm 2). The second part of the study was conducted on the spring (September) of 2019 in a commercial dairy herd located in Candeias, Minas Gerais State, Brazil (Farm 3). Thirty-eight lactating dairy cows were used, 15 Holstein cows on Farm 1; 16 HZ-crossbred cows on Farm 2; and 7 HZ-crossbred cows on Farm 3. The average milk production and days in milk (DIM) on farms 1, 2 and 3 were, respectively,  $27.1 \pm 2.9$  L/day and  $142.3 \pm 1.4$  DIM;  $17.0 \pm 2.9$  L/day and  $133.0 \pm 1.4$  DIM, and  $32.8 \pm 2.6$  L/day and  $118.9 \pm 1.4$  DIM. On farm 1, cows

were kept in a free-stall equipped with sprinklers; on farm 2, cows were grazed on *Brachiaria decumbens* pastures, and on farm 3, cows were kept in a *compost barn* with a cross ventilation system (wind tunnel). Cows were milked twice a day on all farms. On farms 1 and 3, cows received total mixed ration (TMR) based on corn silage, Tifton hay and concentrate (soybean meal, rehydrated corn silage, citrus pulp, soyhulls, cottonseed meal, urea, vitamin and minerals). On farm 2, animals also received TMR based on corn silage and concentrate (soybean meal, rehydrated corn silage, vitamin and minerals).

### 2.3 Measurements of physiological and environmental parameters

Before each ovum pick-up (OPU) section, the rectal temperature and respiratory frequency of each donor were measured (SOUZA-CÁCARES et al., 2019). Rectal temperature was measured with a veterinary digital thermometer. The respiratory frequency was obtained by counting the flank movements per minute. Values above normal range for rectal temperature (38 to 39.3 °C; ROBINSON, 1999) and respiratory frequency (24 to 36 breaths per minute - BPM; STOBER, 1993, cited by FERREIRA et al., 2006, p. 733) were indicative of heat stress. Skin temperature was also evaluated through infrared thermography (Termovisor Flir E5 Thermal Resolution 120 x 90 - Flir Systems, Boston, MA, USA), using pictures of the head, neck, left and right side of the animals. Means were calculated from assigning a 25% weight to each evaluated region.

Environmental temperature and relative humidity were recorded with termohigrometer (model HT-7020, Icel<sup>®</sup>, Manaus, AM, Brazil) at the moment of follicular aspirations, on all farms. The temperature humidity index (THI) was generated by using the formula proposed by Buffington, Collier and Canton (1983):  $THI = 0.8 DBT + RH (DBT - 14.3) / 100 + 46.3$ , in which DBT stands for dry-bulb temperature and RH for the percentage of relative humidity.

The local climate of Lavras, MG, Brazil is classified as Cwa (Monsoon-influenced humid subtropical) according to the Köppen classification, with dry winter and rainy summer (DANTAS; CARVALHO; FERREIRA, 2007). During the experimental period, environmental parameters were, during summer and spring, respectively: average daily temperature of  $22.3 \pm 1.5$  and  $19.2 \pm 2.3$  °C; precipitation of  $8.3 \pm 13.8$  and  $8.3 \pm 12.8$  mm, relative humidity of  $77.5 \pm 8.1$  and  $68.5 \pm 16.2$  %, maximum daily temperature of  $29.4 \pm 2.6$  and  $26.0 \pm 3.8$  °C, minimum daily temperature of  $19.0 \pm 0.9$  and  $14.7 \pm 1.4$  °C, according to

data daily recorded from a weather station located in Lavras (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET, 2020).

#### **2.4 Ovum pick-up**

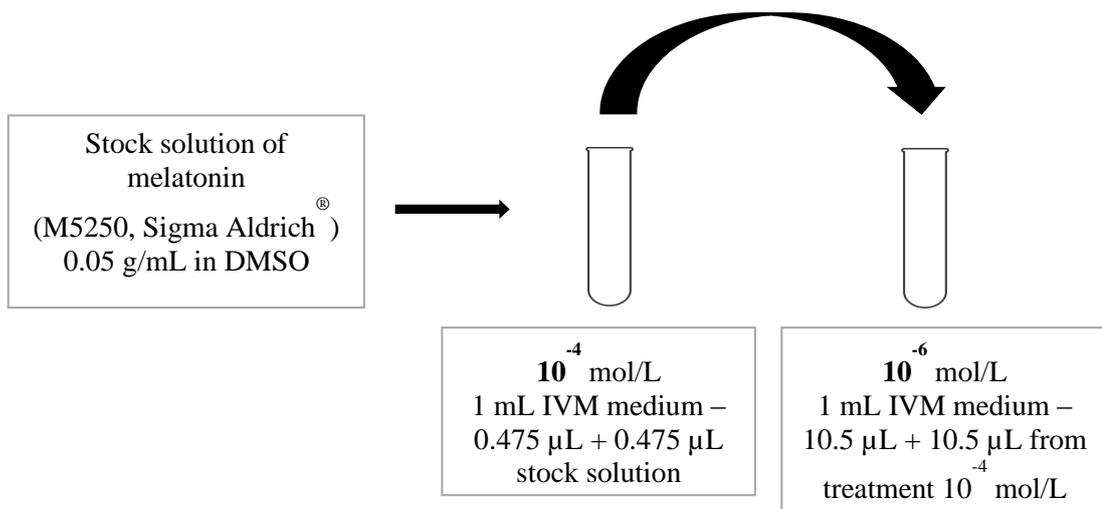
In the first part of the experiment, *cumulus* oocyte complexes (COCs) were recovered from 52 OPU sections. Twenty-nine OPU sections were performed in 15 cows on farm 1 and 16 OPU sections in 16 cows on farm 2. In the second part of the study, 7 OPU sections were performed in a total of 7 cows on farm 3. Some animals were subjected to follicular aspiration more than one time, with mean interval of  $14.9 \pm 5.0$ ; other were aspirated only once. Ovarian follicles ( $\geq 3$  mm) were visualized and aspirated on a random day of the estrous cycle. All OPUs were performed by assisted ultrasonography (ultrasound Aloka SSD 500, Tokyo, Japan) with a 5 MHz micro convex probe, inserted into a rigid vaginal guide. The follicular fluid was collected into 50 mL plastic tubes (Falcon<sup>®</sup>, Ciencor Scientific Ltda, São Paulo, Brazil), containing 10 mL of Dulbecco's Modified Phosphate Buffered Saline (DMPBS<sup>®</sup>, Nutricell Cellular Nutrients, Campinas, SP, Brazil), plus 125 IU of sodium heparin/mL (Liquemine<sup>®</sup>, Roche, São Paulo, SP, Brazil), and maintained at 37 °C. The aspirated content was taken to the laboratory, poured on an OPU collector filter (WTA, Cravinhos, SP, Brazil) and washed with DMPBS until attaining a translucent liquid, containing the recovered COCs, which were selected and classified according to Oliveira, Sarapião and Quintão (2014): grade 1 (more than three compact layers of *cumulus* cells and homogeneous cytoplasm), grade 2 (one to three layers of *cumulus* cells, homogeneous cytoplasm or subtle granulations), grade 3 (less than three layers of *cumulus* cells or partially denuded, irregular cytoplasm), denuded and degenerated (expanded *cumulus* cells and heterogeneous cytoplasm, with severe granulations).

#### **2.5 Experimental design and treatments**

In each OPU section on farms 1 and 2 during the summer, grades 1, 2, 3 and denuded oocytes obtained from each cow were distributed to one the following 3 treatments: control (0 mol/L) – no melatonin (M5250 – Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA),  $10^{-6}$  mol/L and  $10^{-4}$  mol/L of melatonin. On farm 1, 13 oocytes were allocated to the control, 15 oocytes to  $10^{-6}$  mol/L, and 16 oocytes to  $10^{-4}$  mol/L treatments. On farm 2, 36 oocytes were allocated to the control group, 34 oocytes to  $10^{-6}$  mol/L, and 34 oocytes to  $10^{-4}$  mol/L treatments, respectively.

Dilutions were prepared from a stock solution of 0.05 g of melatonin mixed into 1 mL of dimethylsulfoxide (DMSO). For the  $10^{-4}$  mol/L melatonin (tube 1) dilution, 0.475  $\mu$ L were taken from a tube containing 1 mL of maturation medium and the same volume of stock solution was added. For the  $10^{-6}$  mol/L melatonin dilution, a second tube (tube 2) was prepared with 1 mL of maturation medium from which 10.5  $\mu$ L were taken and an equal volume of the  $10^{-4}$  mol/L solution added (Figure 1).

Figure 1 - Schematic overview of the treatment dilutions.



## 2.6. *In vitro* maturation, fertilization and culture

Maturation was performed in 50  $\mu$ L of a commercial medium (BotuFIV – MIV; Botupharma®, Botucatu, SP, Brazil), composed of TCM 199 with Earl's salts, 75  $\mu$ g/mL amikacin, 4 mg/mL bovine serum albumin, 1  $\mu$ g/mL L-glutamine, 0.01 UI/mL rFSH, 0.01 UI/mL 17- $\beta$ -estradiol and 10% fetal calf serum, covered by mineral oil (M410 - Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). After 22 to 24 h of maturation at 38.5  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>, oocytes were *in vitro* fertilized (IVF) with frozen-thawed semen from a single Holstein bull ejaculate, tested for *in vitro* embryo production (IVP) efficiency. Semen was previously evaluated for motility and vigor and only doses with motility equal or higher than 50% and vigor equal or higher to 3.0 were used. Motility and vigor were evaluated in bright field microscopy at 400 x magnification. Semen was diluted in an appropriate volume of fertilization medium to reach  $2.0 \times 10^6$  sperm/mL. The commercial gradient Select Sperm (BotuFIV, Botupharma®, Botucatu, SP, Brazil) was used to wash and select spermatozoa. In this procedure, 200  $\mu$ L of Select Sperm and posteriorly, 200  $\mu$ L of washing medium (CAP, Botupharma®, Botucatu, SP, Brazil) were added into a 1.5 mL microtube and homogenized.

Next, 400  $\mu\text{L}$  of Select Sperm were added to the bottom of the microtube, so that two phases were obtained.

The IVF process was performed from 20 to 22 h at 38.5 °C, in a 5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$  and 90%  $\text{N}_2$  atmosphere, and saturated humidity within 70  $\mu\text{L}$  drops of IVF medium (BotuFIV – FIV, Botupharma<sup>®</sup>, Botucatu, SP, Brazil) composed of TALP-FIV supplemented with 6 mg/mL BSA (bovine serum albumin; fatty acid- free), 0.2 mM pyruvate, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparin, 20  $\mu\text{M}$  penicilamine, 10  $\mu\text{M}$  hypotaurine, 1  $\mu\text{M}$  epinephrine, 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  amikacin covered by mineral oil. After IVF, presumable zygotes were transferred to Petri dishes of 35 x 10 mm containing drops of 50  $\mu\text{L}$  of culture medium (BotuFIV – CIV, Botupharma<sup>®</sup>, Botucatu, SP, Brazil), with 3% fetal bovine serum (FBS) covered by mineral oil. During all *in vitro* culture (IVC) processes, dishes containing the embryos were maintained in a culture incubator under a 5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$  and 90%  $\text{N}_2$  atmosphere (Alfagás Ltda, Lavras, MG, Brazil) and maintained at 38.5 °C.

## 2.7 Embryo development and quality evaluation

The cleavage rate on day 3 (D3) was determined 48 h after IVF. The numbers and development stage of putative embryos were evaluated on day 8 (D8) after IVF. Embryos were fixed in 4% PBS + formaldehyde solution for 30 minutes at 8 °C and stored at the same temperature in microtubes with 200  $\mu\text{L}$  PBS + PVA until quality assessment.

Embryo quality was assessed by the total number of cells by DAPI stain and total number of apoptotic cells by TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) assay. Both analyses were done on the same embryos. Briefly, the previously fixed blastocysts and expanded blastocysts were washed three times in PBS + PVA drops and thereafter permeabilized in 0.2% Triton X-100 (T8787; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluted in PBS + PVA for 5 minutes. Then, embryos were maintained in equilibration buffer (DeadEnd<sup>™</sup>) drops for 10 minutes until the incubation solution was prepared using 54  $\mu\text{L}$  equilibration buffer, 6  $\mu\text{L}$  nucleotide mix and 1.2  $\mu\text{L}$  recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme (rTdT) containing fluorescein-5(6)-carboxaminocaproyl-[5-{3-aminoallyl}-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate (dUTP-12-fluorescein) dye. Subsequently, embryos were incubated in 10  $\mu\text{L}$  incubation solution drops for 1 hour in a humidified chamber at 37 °C. For each replicate, a sample of two embryos for positive and negative controls was processed for validation. For the positive control, embryos were incubated in drops containing 10 u/mL of DNase (RQ1 RNase-Free DNase; Promega, Madison, USA) for

10 minutes in order to fragment embryo cell's DNA, and incubated as previously described. For the negative control, embryos were incubated as described, except that the rTdT enzyme and the dUTP-12-fluorescein dye were not included in the incubation solution. Next, embryos were incubated in SSC 2X (DeadEnd™) drops for 15 minutes to stop the reaction, washed in PBS + PVA drops, and mounted in Prolong Diamond with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, USA) drops placed on microscopy slides without coverslips. Slides were examined under an Axio Observer Z1 microscope attached with an Axiocam 305 Color digital camera to capture images with 6 x 100 magnification. To identify the fluorescence emitted by the TUNEL assay, a 520 nm excitation filter was used. The fluorescence emitted by DAPI was identified using a 460 nm excitation filter.

Images were capture in an epifluorescence inverted microscope (Axio Observer Z1, Zeiss®, Jena, Germany). Total and apoptotic cell numbers were determined by the Image J software (v. 1.52a).

## 2.8 Statistical analysis

Physiological parameters that were collected on each day of follicular aspirations, such as milk production, rectal and superficial temperature and respiration rate of Holstein and HZ-crossbred cows were compared by using the Mixed procedure, while number of DIM was compared by using the Glimmix procedure of SAS® (version 9.2), considering aspiration within farm and animal within farm as random effects.

Proportion of grades 1, 2, 3, denuded and degenerate oocytes, as well as proportion of good (grade 1 and 2) and poor qualities (grade 3, denuded, degenerate) were analyzed by the Glimmix procedure of SAS® (version 9.2), considering the binomial distribution and the *logit* link function. In the analysis the effect of genetic group and the effect of the covariates temperature, relative humidity, THI, milk production, DIM, rectal and superficial temperature and respiration rate were evaluated. Since some animals were subjected to follicular aspiration more than one time, the total number of oocytes, as well as the average of physiological variables (rectal temperature, respiration rate, milk production and DIM) from each animal and environmental variables measured per each OPU section were considered in the analysis.

In the first two OPU sections a problem in semen processing was identified and the data were removed from the analyses. Cleavage rate on D3 was analyzed by using Glimmix procedure of SAS® (version 9.2), considering the binomial distribution and the *logit* link function. The model considered effects of farm, treatment and treatment x farm interaction,

and the Dunnett test was used to compare LS-means. Values of  $P < 0.05$  were considered significant. Tendency was considered when  $0.10 > P > 0.05$ .

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

The THI index was above 68 during the experimental period (Farm 1 =  $79.0 \pm 1.4$ ; Farm 2 =  $77.7 \pm 3.2$ ; Farm 3 =  $68.5 \pm 1.8$ ). Physiological parameters were not influenced by genetic group (Table 1). However, milk production and rectal temperature were affected ( $P < 0.001$ ) by farm. Milk production was lower ( $P = 0.0013$ ) on farm 2 ( $17.0 \pm 2.9$ ) than on farm 3 ( $32.8 \pm 2.6$ ). For rectal temperature, significance was observed ( $P = 0.0174$ ) when considering farm 2 ( $37.8 \pm 0.3$ ) vs farm 3 ( $38.7 \pm 0.2$ ). These results may be attributed to the different management between farms, as well as greater Holstein component in crossbred animals on farm3

Table 1 - Physiological variables obtained during spring and summer from Holstein and crossbred Holstein x Zebu (HZ) cows (LS means  $\pm$  standard error)

<b>Variable</b>	<b>Holstein</b>	<b>Holstein x Zebu</b>	<b>P-value</b>
Milk production	$24.1 \pm 3.4$	$27.2 \pm 2.2$	0.57
Respiratory frequency	$74.2 \pm 10.5$	$53.4 \pm 6.9$	0.23
Rectal temperature	$38.3 \pm 0.3$	$38.3 \pm 0.2$	0.91
Superficial temperature	$36.6 \pm 1.4$	$36.9 \pm 0.9$	0.88
Days in milk (DIM)	$141.0 \pm 1.4$	$121.7 \pm 1.3$	0.77

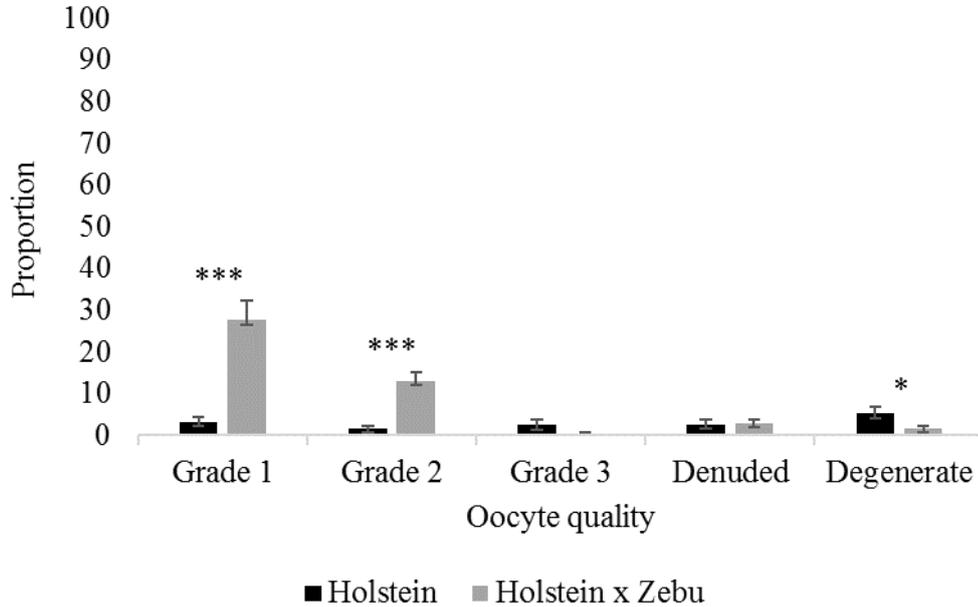
The proportions of grade 1 and 2 oocytes were higher ( $P < 0.0001$ ) in HZ crossbred than in Holstein cows, for which the proportion of degenerate oocytes was higher ( $P = 0.05$ ) (Figure 2). The exposure to elevated temperatures leads to less deleterious effects in organic systems of Zebu cattle than in European breeds, due to the Zebu cattle superior ability to regulate their body temperature in face of heat stress, which results in reduced metabolic heat production as well as greater capacity of heat loss (HANSEN, 2004). The different genetic groups (Holstein and crossbred-HZ) may present different response to the same value of THI. There are reports in the literature that establish a THI of 68 that affects Holstein dairy cows adversely (ZIMBELMAN et al. 2009; ALLEN et al., 2015). THI values above 68 were observed in all farms, corroborating that animals faced environmental challenge. However,

animals from farm 1 (Holstein) may have suffer more intensely the deleterious effects of the high THI. On the other hand, HZ-crossbred animals may not have experienced the same degree of disruption on their thermoneutral comfort. Therefore, we can suggest that reproductive losses, i.e., lower quality oocytes, are observed in HZ-crossbred when values of THI are way above what is detrimental for Holstein cows.

For the proportion of grade 1 oocyte analysis, the covariate respiratory frequency was significant ( $P < 0.0001$ ) and displayed a negative coefficient, which shows that the increase in respiratory frequency is related to the decrease in grade 1 oocyte proportion. Nevertheless, respiratory frequency was positively associated to grade 2 and degenerate oocytes ( $P < 0.05$ ). The proportion of good oocytes (grades 1 and 2) was higher ( $P < 0.0001$ ) in HZ-crossbreds ( $57.1 \pm 5.5$ ) compared to Holsteins ( $8.2 \pm 2.6$ ), and for this measure the covariates respiratory rate and humidity were negatively associated ( $P < 0.01$ ). Respiratory rate is one of the first primary autonomic responses exhibited by animals under heat stress (GEBREMEDHIM et al., 2008). In the present study, respiration rate of both genetic groups was above what is considered in the normal range (Holstein =  $74.2 \pm 10.5$ ; HZ-crossbred =  $53.4 \pm 6.9$  flank movements per minute), suggesting that the cows were in heat stress. This observation may explain our findings, specially for Holstein cows. The inverse relationship between respiration rate and the proportion of good quality oocytes may be associated to oxidative stress as reported by other authors (MONTILLA et al., 2014; ROTH et al., 2018). Heat stress can lead to oxidative stress due to the accumulation of free radicals inside the cell, that could impair oocyte quality (CAVALLARI et al., 2019). Furthermore, it is well known that *Bos taurus* animals produce lower quality oocytes in comparison to *Bos indicus* (ROCHA et al., 1998), what was observed considering Holstein vs crossbred-HZ animals.

The covariate DIM was positively ( $P = 0.0084$ ) associated to the proportion of grade 1 oocytes and negatively ( $P < 0.05$ ) associated to the proportion of degenerate oocytes. In other words, the greater number of DIM, the less the proportion of poor oocyte quality was observed. The direct negative relationship between DIM and oocyte quality may be related to physiological and metabolic changes throughout lactation. During the negative energy balance (NEB) period intense metabolic and hormonal changes in the blood stream reflect on the follicular fluid, altering the oocyte environment (LEROY, 2008; VAN HOECK et al. 2011; MATOBA et al., 2012; MOORE; DE VRIES, 2020). In metabolically compromised high producing dairy cows the NEB has been shown to influence oocyte and embryo quality (LEROY et al., 2017).

Figure 2 - Distribution of oocytes aspirated during spring and summer from Holstein and crossbred Holstein x Zebu (HZ) cows according to its classification.



Legend: \* ( $P < 0.05$ ), \*\*\* ( $P < 0.0001$ ).

Oocytes were classified according to Oliveira, Sarapião and Quintão (2014). Twenty-nine OPU sections were performed in 15 cows on farm 1 (Holstein), 16 OPU sections in on farm 2 (HZ-crossbred) and seven OPU sections were performed on farm 3 (HZ-crossbred).

There was a farm x treatment interaction ( $P = 0.03$ ) effect on the cleavage rate, such that on farm 1, but not on farm 2, the  $10^{-4}$  mol/L concentration tended ( $P < 0.09$ ) to increase it, compared to the control IVM. Additionally, the  $10^{-6}$  mol/L tended ( $P < 0.09$ ) to increase the cleavage rate on farm 2 compared to the control IVM. However, cleavage rate in the control group did not differ ( $P = 0.96$ ) from the cleavage rate observed in the group  $10^{-4}$  mol/L (Table 2).

Table 2 – Cleavage rate of oocytes obtained from lactating dairy cows during summer and *in vitro* matured in media with melatonin.

	Melatonin concentration			P-value	
	0 mol/L(control)	$10^{-6}$ mol/L	$10^{-4}$ mol/L	Control vs $10^{-6}$ mol/L	Control vs $10^{-4}$ mol/L
Farm 1	21.5 ± 13.8	24.7 ± 14.1	71.2 ± 14.7	0.97	0.087
Farm 2	20.0 ± 10.9	49.9 ± 16.0	17.7 ± 10.1	0.09	0.96

Legend: LS-Means ± SE comparison by the Dunnett-Hsu test

Heat stress has detrimental effects on the oocyte which lead to alterations in the nuclear and cytoplasmic compartments of the cell and, resulting in decreased cleavage rates and developmental competence (GENDELMAN; ROTH, 2012). Nonetheless, in this study the addition of melatonin to the IVM medium of bovine oocytes in the concentrations  $10^{-6}$  and  $10^{-4}$  mol/L indicated its potential to mitigate the deleterious effects of heat stress on initial embryonic development, as can be inferred by the greater cleavage rates in these groups in comparison to control group. The greater cleavage rate provided by the addition of melatonin to the IVM medium may be associated to its action as an antioxidant, capable of reducing high concentrations of ROS and reactive nitrogen species - RNS (LOREN et al., 2017), which can cause lipid peroxidation, protein oxidation, and DNA damage (TAMURA et al., 2014). Nevertheless, it is important to highlight the differential effect of melatonin on IVM medium of Holstein and HZ-crossbred oocytes. The higher concentration ( $10^{-4}$  mol/L) of melatonin increased the cleavage rate of Holstein oocytes, and the lower concentration ( $10^{-6}$  mol/L) increased the cleavage rate of HZ-crossbred cow oocytes.

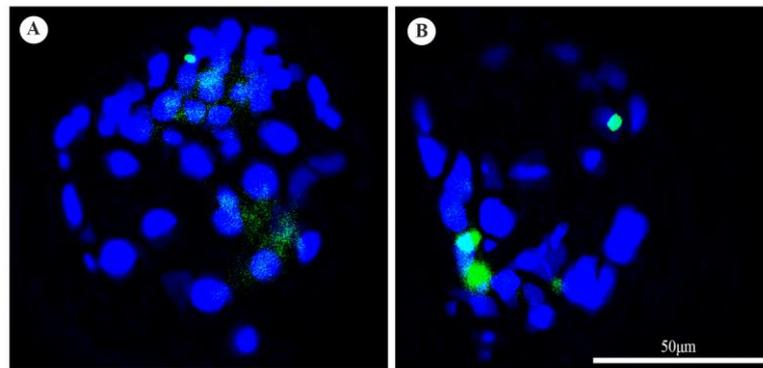
Furthermore, the cleavage rates of the  $10^{-4}$  mol/L and control groups did not differ considering HZ-crossbred cows. This result may be related to the effect of melatonin in the neutralization of free radicals; in this case, melatonin may have over neutralized free radicals impairing oocyte maturation and embryo development since physiological concentrations of ROS are necessary to restart meiosis (RAMALHO-SANTOS et al., 2009). Furthermore, the higher melatonin concentration may have compromised nuclear maturation. Nevertheless, the  $10^{-6}$  mol/L treatment did not differ from control group regarding cleavage rate of oocytes obtained from Holstein cows. It could be inferred that the dose  $10^{-6}$  mol/L was not sufficient to protect the oocytes from the harmful effects of heat stress. This result may be explained by to the susceptibility of Holstein cows to the elevation of temperature, as demonstrated by the higher respiration rate in Holstein compared to crossbreed cows, although there was no significance (Holstein =  $74.2 \pm 10.5$  vs crossbreed =  $53.4 \pm 6.9$ ,  $P = 0.23$ ).

The environmental condition plays an important role on the quality of oocytes, and consequently, on cleavage rate. As mentioned previously, Holstein cows are very inefficient on dissipating heat to the environment. On farm 1, animals were maintained in a free-stall equipped with sprinklers, but with poor ventilation, that may have exacerbated the effects of heat stress, especially during the summer. These animals had poorer quality oocytes. On farm 2, animals were HZ-crossbreds, which are more resistant. Furthermore, even though there was no difference in milk production between the genetic groups, and considering the

environmental challenge faced by animals on farm 1, it could be speculated that the effect of milk production may have intensified heat stress in the Holstein cows.

Considering both genetic groups, on D8 of IVC, 9 embryos were produced in the control, 9 embryos on the treatment  $10^{-6}$  mol/L and 10 in  $10^{-4}$  mol/L group. The embryo production regarding the total of oocytes matured were  $81.8 \pm 3.6$  % for control group,  $42.8 \pm 4.4$  % for  $10^{-6}$  mol/L and  $55.6 \pm 1.5$  % for  $10^{-4}$  mol/L. However, due to problems in the process of preserving the structures, they suffered intense deterioration and the analysis was compromised. All structures from control group were lost, 3 initial blastocysts from  $10^{-6}$  mol/L and 4 blastocysts from  $10^{-4}$  mol/L treatment had their quality evaluated by TUNEL and DAPI analysis. Therefore, a more precise analysis and comparison among treatments were not possible to be performed. A demonstrative image is displayed in Figure 3.

Figure 3 - Blastocyst from the  $10^{-6}$  mol/L (A) and initial blastocyst from  $10^{-4}$  mol/L (B) treatment.



Legend: Representative image of blastocyst cells stained with TUNEL (green) and DAPI (blue). Images were taken with a 6 x 100 magnification. A) blastocyst from  $10^{-6}$  mol/L treatment; B) initial blastocyst from  $10^{-4}$  mol/L treatment

#### 4 CONCLUSIONS

Holstein cows produced poorer quality oocytes in comparison to HZ-crossbred cows. Increased respiration rate is associated to decreased oocyte quality, which is a powerful indicator of the deleterious effects of heat stress on reproduction of dairy cows.

The addition of melatonin in the concentration  $10^{-4}$  mol/L during IVM of bovine oocytes obtained during summer may have a beneficial effect on cleavage rate of embryos of

Holstein cows and, the lower concentration of  $10^{-6}$  mol/L may benefit cleavage rate of oocytes obtained from crossbred cows.

## **5 ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was supported by a grant from National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, or CNPq number 427476/2016-0). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The authors thank the company GENEX Genética Brasil Ltda, for the donation of semen doses. We are also thankful to commercial farms for allowing the use of their animals in the OPU procedures. The authors thank the Group of Studies in Nutrition and Reproduction of Ruminants and Groups of Studies in Reproduction (UFLA, Lavras, Brazil) for helping in the field experiment and UFLA.

## REFERENCES

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 3, p. 28, July 2005.
- ALLEN, J.D.; HALL, L.W.; COLLIER, R.J.; SMITH, J.F. Effect of core temperature, time of day, and climate condition on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 98, p. 118-127, 2015.
- AN, Q.; PENG, W.; CHENG, Y.; LU, Z.; ZHOU, C.; ZHANG, Y.; SU, J. Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, p. 17370-17381, 2019.
- ASCARI, I.J. **Adição do fator de crescimento semelhante à insulina – I ou melatonina ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico**. 2016. 120p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- ASCARI, I.J.; ALVES, N.G.; JASMIN, J.; LIMA, R.R.; QUINTÃO, C.C.R.; OBERLENDER, G.; MORAES, E.A.; CAMARGO, L.S.A. Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 60, p. 50-60, 2017.
- BATISTA, E.O.S.; MACEDO, G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.D.V.; SÁ FILHO, M.F.; DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.V.R.; RENNÓ, F.P.; BARUSELLI, P.S. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 448-452, 2014.
- BRIDGES, P.J.; BRUSIE, M.A.; FORTUNE, J.E. Elevated temperature (heat stress) *in vitro* reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 508-522, 2005.
- CEBRIAN-CERRANO, A.; SALVADOR, I.; RAGA, E.; DINNYES, A.; SILVESTRE, M.A. Beneficial effect of melatonin on blastocyst *in vitro* production from heat-stressed bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 738-746, 2013.
- CHEUQUEMÁN, C.; LOREN, P.; ARIAS, M.; RISOPATRÓN, J.; FELMER, R.; ÁLVAREZ, J.; MOGAS, T.; SÁNCHEZ, R. Effects of short-term exposure of mature oocytes to sodium nitroprusside on *in vitro* embryo production and gene expression in bovine. **Theriogenology**, Los Altos, v. 84, n. 8, p. 1431-1437, 2015.
- DANTAS, A.A.A.; CARVALHO, L.G.; FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, Nov./Dez. 2007.
- DIKMEN, S.; HANSEN, P.J. Is the temperature - humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 92, n. 1, p. 109-116, 2009.

FARAHAVAR, A.; SHAHNE, A.Z.; KOHRAM, H.; VAHEDI, V. Effect of melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 17, p. 2579–2583, 2010

FERREIRA, F.; PIRES, M.F.A.; MARTINEZ, M.L.; COELHO, S.G.; CARVALHO, A.U.; FERREIRA, P.M.; FACURY FILHO, E.J.; CAMPOS, W.E. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 732-738, 2006.

GEBREMEDHIM, K.G.; HILLMAN, P.E.; LEE, C.N.; COLLIER, R.J.; WILLARD, S.T.; ARTHINGTON, J.D.; BROWN-BRANDL, T.M. Sweating rates of dairy cows and beef heifers in hot conditions. **Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 51, n. 6, p. 2167-2178, 2008.

GENDELMAN, M.; AROYO, A.; YAVIN, S.; ROTH, Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage time, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 140, p. 73-82, 2010.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. *In vivo vs in vitro* models for studying the effects of elevated temperature on the VG stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 134, p. 125-134, 2012.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.E.I.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

GUIMARÃES, A.S.B.; ROCHA, L.F.; JESUS, R.D.L.; VASCONCELOS, G.L.; ANGHINONE, G.; SANTANA, A.L.A.; BARBOSA, L.P. *In vitro* performance of Zebu (*Bos indicus*) and Taurus (*Bos taurus*) donor cow embryos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 21, p. 1-11, 2020.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 349-360, 2004.

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

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Histórico de dados meteorológicos**. Lavras: 2020. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos>. Acesso em 25 set. 2020.

ISPADA, J.; RODRIGUES, T.A.; RISOLIA, P.H.B.; LIMA, R.S.; GONÇALVES, D.R.; RETTORI, D.; NICHI, M.; FEITOSA, W.B.; PAULA-LOPES, F.F. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 9, p. 1169-1179, 2018.

LAWRENCE, J.L.; PAYTON, R.R.; GODKIN, J.D.; SAXTON, A.M.; SCHRICK, F.N.; EDWARDS, J.L. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 8, p. 2449-2454, Fev. 2004.

LEROY, J.L.M.R. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 2, p. 31-39, 2008.

LIMA, P.H. **Adição de melatonina ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico *in vitro*: efeitos sobre as taxas de produção e qualidade dos blastocistos**. 2018. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.

LIRA, A.S.; CHAVES, R.M.; MORAES JUNIOR, F.J.; COSTA JUNIOR, S.H.; AMARAL, B.K.L.; TROVÃO, H.M.P. use of melatonin in the *in vitro* production of bovine embryos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 21, p. 01-09, 2020.

LOREN, P.; SÁNCHEZ, R.; ARIAS, M.E.; FELMER, R.; RISOPATRÓN, J.; CHEUQUEMÁN, C. Melatonin scavenger properties against oxidative and nitrosative stress: Impact on gamete handling and *in vitro* embryo production in humans and other mammals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1–17, 2017.

MATOBA, S.; O'HARA, L.; CARTER, F.; KELLY, A.K.; FAIR, T.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 95, n. 3, p. 1257-1266, 2012.

MOORE, S.M.; DEVRIES, T.J. Effect of diet-induced negative energy balance on the feeding behavior of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 103, n. 8, p. 7288-7301, Ago. 2020.

NABENISHI, H.; OHTA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZAWA, K.; TSUZUKI, Y. The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. **Zygote**, v. 20, p. 249-259, Ago. 2011.

OLIVEIRA, C.S.; SARAPIÃO, R.V.; QUINTÃO, C.C.R. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Juiz de Fora, p. 1-54, out. 2014.

ORTEGA, M.S.; ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; MINGOTI, G.Z.; ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Modification of embryonic resistance to heat shock in cattle by melatonin and genetic variation in *HSPAIL*. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 99, p. 9152-9164, 2016.

PANG, Y.; ZHAO, S.; SUN, Y.; JIANG, X.; HAO, H.; DU, W.; ZHU, H. Protective effects of melatonin on the *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, v. 89, p. 648-660, 2018.

PATEL, P.A.; CHAUDHARY, S.S.; PURI, G.; SINGH, V.K.; ODEDARA, A.B. Effects of  $\beta$ -mercaptoethanol on *in vitro* maturation and glutathione level of buffalo oocytes. **Veterinary World**, v. 8, n. 2, p. 213-216, 2015.

PAULA, F.A.P. **Efeito da melatonina na maturação *in vitro* sobre a expressão gênica e a qualidade de oócitos bovinos sob choque térmico**. 2017. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

PAULA-LOPES, F.F.; LIMA, R.S.; RISOLIA, P.H.B.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 395-403, Jul/Set. 2012.

RAMALHO-SANTOS, J. et al. Mitochondrial functionality in reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 553–572, Oct. 2009.

ROBINSON, E.N. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 2<sup>nd</sup> ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara – Koogan, 1999, 435 p.

ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R.; LIM, J.M.; BLAIR, R.M.; ROUSSEL, J.D.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, n. 3, p. 657-665, Fev. 1998.

RODRIGUES-CUNHA, M.C.; MESQUITA, L.G.; BRESSAN, F.; DEL COLLADO, M.; BALIEIRO, J.C.C.; SCHWARS, K.R.L.; CASTRO, F.C.; WATANABLE, O.Y.; WATANABLE, Y.F.; COELHO, LEAL, C.L.V. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. **Theriogenology**, Los Altos, v. 86, p. 1685-1694, 2016.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 83-90, 2000.

SILVA, C.F.; SARTORELLI, E.S.; CASTILHO, A.C.S.; SATRAPA, R.A.; PUELKER, R.A.; RAZZA, E.M.; TICIANELLI, A.J.; EDUARDO, H.P.; LOUREIRO, B.; BARROS, C.M. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, v. 79, p. 351–357, 2013.

TALPUR, H.S.; CHANDIO, I.B.; BROHI, R.D.; WORKU, T.; REHMAN, Z.; BHATTARAI, D.; ULLAH, F.; JIAJIA, L.; YANG, L. Research progress on the role of melatonin and its receptors in animal reproduction: A comprehensive review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 831-849, 2018.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. Melatonin and female reproduction. **Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 40, n. 1, p. 1-11, Jan. 2014.

TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; ESTEBAN-ZUBERO, E.; ZHOU, Z.; REITER, R.J. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and metabolism. **Molecules**, v. 20, p. 18886-18906, 2015.

TIAN, X.Z.; WANG, F.; HE, C.J.; ZHANG, L.; TAN, D.X.; REITER, R.J.; XU, J.; JI, P.Y.; LIU, G.S. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 57, p. 239-247, 2014.

VAN HOECK, V.; STURMEY, R.G.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LEESE, H.J.; BOLS, P.E.J.; LEROY, J.L.M.R. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 1-8, Ago. 2011.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 32-38, 2019.

YANG, M.; TAO, J.; CHAI, M.; WU, H.; WANG, J.; LI, G.; HE, C.; XIE, L.; JI, P.; DAI, Y.; YANG, L.; LIU, G. Melatonin improves the quality of inferior bovine oocytes and promoted their subsequent IVF embryo development: mechanisms and results. **Molecules**, v. 22, p. 1-15, 2017.

ZHAO, X.M.; WANG, N.; HAO, H.S.; LI, C.Y.; ZHAO, Y.H.; YAN, C.L.; WANG, H.Y.; DU, W.H.; WANG, D.; LIU, Y.; PANG, Y.W.; ZHU, H.B. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **Journal of Pineal Research**, v. 64, p. 1-15, 2017.

ZIMBELMAN, R.B.; RHOADS, R.P.; RHOADS, M.L.; DUFF, G.C.; BAUMGARD, L.H.; COLLIER, R.J. A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. In: Southwest Nutrition & Management Conference, February 26 and 27, 2009, Savoy, IL. **Anais...** Savoy, IL: ARPAS Business Office, 2009. p. 158-169.