



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

TAYS FREITAS MARTINS BENTO

Estresse térmico na gestação: desenvolvimento
somático e aspectos reprodutivos da progênie
masculina de camundongos C57BL/6

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

Orientadores: Dr^a Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Dr. Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista



Niterói
2021

TAYS FREITAS MARTINS BENTO

Estresse térmico na gestação: desenvolvimento somático e aspectos reprodutivos da progênie masculina de camundongos C57BL/6

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

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

**Orientador(es): Prof.^a Dr^a Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Prof. Dr. Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista**

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

B478e Bento, Tays Freitas Martins

Estresse térmico na gestação: desenvolvimento somático e aspectos reprodutivos da progênie masculina de camundongos C57BL/6 / Tays Freitas Martins Bento ; Joanna M. Gonçalves de Souza Fabjan, orientador ; Ribrio Ivan T. Pereira Batista, coorientador. Niterói, 2021.
65 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPBI.2021.m.12374935795>

1. Peso ao nascimento. 2. Mudanças climáticas. 3. Espermatogênese. 4. Fertilidade. 5. Produção intelectual.

I. Fabjan, Joanna M. Gonçalves de Souza, orientador. II. Batista, Ribrio Ivan T. Pereira, coorientador. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD -

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

TAYS FREITAS MARTINS BENTO

Estresse térmico na gestação: desenvolvimento somático e aspectos reprodutivos da progênie masculina de camundongos C57BL/6

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

Banca Examinadora:

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

Prof.^a Dra. Andrea Regina de Souza Baptista – Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFF

Prof.^a Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes – Departamento de Ciências Biológicas – UNIFESP

Prof.^a Dra. Clara Slade Oliveira – EMBRAPA Gado de Leite

Prof. Dr. Cláudio Cesar Cirne dos Santos – Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFF (Suplente)

Prof. Dr. Luiz Sergio De Almeida Camargo – EMBRAPA Gado de Leite (Suplente)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder a bênção da vida e o mistério da ciência.

À toda a minha família, principalmente meus pais, por me proporcionarem a oportunidade do estudo, me incentivarem a crescer, por sempre depositarem confiança em mim e serem exemplos de força e honestidade.

Ao meu esposo Felipe, por toda compreensão e apoio em todos os momentos.

Aos meus orientadores, Dra. Joanna e Dr. Ribrio, pela oportunidade de participar deste projeto magnífico e inovador, por todos os ensinamentos, por serem pacientes e sempre solícitos e cuidadosos comigo. Vocês são exemplos de excelência em pesquisa, dedicação e amor com a profissão.

Às agências de fomento: CNPq, CAPES e FAPERJ que promoveram a idealização deste projeto e contribuem para o desenvolvimento da pesquisa em nosso país.

À Universidade Federal Fluminense e ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia com todo com seu corpo docente, por inspirarem jovens pesquisadores a trilharem uma carreira sólida de qualidade e almejem a excelência científica.

À Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e o Laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Biológicas, onde o estudo foi executado.

Aos alunos, professores e profissionais que colaboraram com a realização do experimento, em especial Dr. Robson Silva, Sâmara Dias, Cristiane Moura e Isaías Gino. Sem a colaboração e dedicação de vocês, a execução deste experimento teria sido muito difícil ou até mesmo impossível.

Aos técnicos de biotério que cuidaram dos camundongos utilizados neste estudo.

Ao Ricardo Neves da Silva, por todo apoio, incentivo, compartilhamento de ideias e amizade que construímos a partir deste projeto. Você é um exemplo de dedicação e sinônimo de orgulho para mim.

Ao grupo de estudos de reprodução em animais domésticos (GERAD) da UFF, por me proporcionar a oportunidade de escutar os melhores profissionais da área de reprodução animal, compartilhar conhecimento e promover discussões sobre os estudos mais recentes da área.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	VII
Lista de ilustrações.....	VIII
Resumo	IX
Abstract	X
1. Introdução	1
1.1 Modelo animal e reprodução de camundongos	2
1.2 Impacto do aquecimento global na reprodução	4
1.3 Efeito do estresse térmico na espermatogênese.....	7
1.4 Efeito do estresse térmico induzido em camundongos.....	10
1.5 Alterações na avaliação espermática e histológica dos túbulos seminíferos	14
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Material e métodos.....	19
3.1 Animais e ética	19
3.2 Desenho experimental.....	19
3.3 Indução do estresse térmico.....	20
3.4 Desenvolvimento somático	21
3.5 Avaliação espermática.....	21
3.6 Histologia e avaliação morfométrica dos túbulos seminíferos	22
3.7 Avaliação quantitativa dos embriões	23
3.8 Análise estatística	23
4. Resultados	25
4.1 Taxa de prenhez, tamanho da ninhada e peso ao nascimento	25
4.2 Desenvolvimento somático	25
4.3 Avaliação espermática.....	27
4.4 Avaliação morfométrica dos túbulos seminíferos	27
4.5 Avaliação quantitativa dos embriões.....	29
5. Discussão.....	30
6. Considerações finais.....	39
6.1 Conclusões	39
6.2 Perspectivas	39

7. Referências bibliográficas	40
8. Apêndices e anexos.....	52
8.1 Apêndices.....	52
8.1.1 Apêndice 1 – Certificado de apresentação oral de resumo em evento.....	52
8.2 Anexos.....	53
8.2.1 Anexo 1 – Certificado de aprovação da ceua	53

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Altura do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico, do inglês *Adrenocorticotropic hormone*

BSA – Albumina do soro bovino, do inglês *Bovine serum albumin*

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

D – Diâmetro dos túbulos seminíferos

DHL – Enzima desidrogenase láctica

DIC – Contraste diferencial de interferência, do inglês *Differential interference contrast*

DPBS – Solução salina tamponada de fosfato de Dulbecco, do inglês *Dulbecco's phosphate-buffered saline*

eCG – Gonadotrofina coriônica equina, do inglês *equine chorionic gonadotropin*

E – Dia embrionário

EGF – Estresse térmico na gestação final

EGI – Estresse térmico na gestação inicial

EGT – Estresse térmico na gestação total

EROs – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

ET – Estresse térmico

F1 – Geração 1, do inglês *first filial generation*

GABA – Ácido gama-aminobutírico, do inglês *Gamma-aminobutyric acid*

GDNF – Fator neurotrófico derivado de célula glial, do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*

hCG – Gonadotrofina coriônica humana, do inglês *human chorionic gonadotropin*

HSP – Proteína de choque térmico, do inglês *heat shock protein*

HSPA2 – Proteína de choque térmico família A, do inglês *Heat shock protein Family A member 2*

H&E – Hematoxilina e eosina

IgG – Imunoglobulina G

IPCC – *Intergovernmental Panel on Climate Change*

mM – milimolar

pRNAnc – Pequenos RNA não codificantes

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa, do inglês *Tumor necrosis factor alpha*

UR – Umidade relativa

w/w – Peso por peso, do inglês *weight/weight*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Quadro 1: Protocolos experimentais de indução de estresse térmico em machos	11
Figura 1: Desenho experimental	20
Figura 2: Imagem ilustrativa da câmara ambiental utilizada para a indução do estresse térmico de camundongos fêmeas C57BL/6 em diferentes momentos durante a gestação, de acordo com o grupo experimental	20
Figura 3: Imagem das medições de altura do epitélio germinativo (A) e diâmetro dos túbulos seminíferos (D)	23
Tabela 1: Taxa de prenhez, número de crias nascidas e peso ao nascimento da progênie de camundongos fêmeas gestantes C57BL/6 estressadas termicamente.....	25
Figura 4: Desenvolvimento somático da progênie masculina de camundongos fêmeas C57BL/6 estressadas termicamente durante a gestação, do nascimento até a oitava semana de idade	26
Tabela 2: Avaliação espermática da progênie (F1) masculina com oito semanas de idade, provenientes dos diferentes grupos de estresse térmico induzido durante a gestação em camundongos C57BL/6	27
Figura 5: Imagens histológicas dos túbulos seminíferos na avaliação morfométrica. *CONT: controle; EGI: estresse térmico durante a gestação inicial; EGF: estresse térmico durante a gestação final; EGT: estresse térmico durante a gestação total	28
Tabela 3: Morfometria dos túbulos seminíferos da progênie (F1) masculina de camundongos C57BL/6 dos diferentes grupos de estresse térmico induzido durante a gestação	28

Tabela 4: Média do número de estruturas recuperadas por fêmea, quando acasaladas com a progênie masculina de camundongos C57BL/6 dos diferentes grupos estressados termicamente durante a gestação	29
Quadro 2: Protocolos experimentais de indução de estresse térmico	35

RESUMO

O estresse térmico (ET) afeta a eficiência reprodutiva de muitas espécies, causando subfertilidade ao reduzir a gametogênese. Este estudo avaliou o efeito do ET em diferentes estágios da gestação em camundongos C57BL/6, sobre o desenvolvimento somático e os parâmetros reprodutivos da progênie masculina. Após a confirmação do acasalamento (presença de tampão vaginal), as fêmeas foram submetidas ao ET durante a gestação inicial (EGI - do 1º ao 10º dia), gestação final (EGF - do 11º dia ao parto), gestação total (EGT) ou mantidas em condições normotérmicas (CONT). O ET foi induzido em uma câmara aquecida por duas lâmpadas vermelhas a 41 °C e 65% de umidade relativa por duas horas diárias. Fêmeas controle receberam protocolo hormonal de superovulação com 5 UI de eCG e 5 UI de hCG por via intraperitoneal, e em seguida foram acasaladas com a progênie masculina na relação 2:1. Após 72 h foram coletados os epidídimos e os testículos dos machos para a avaliação espermática e histologia dos túbulos seminíferos, respectivamente. Também foram coletados os embriões produzidos *in vivo* com estes machos. Não houve diferença ($P > 0,05$) na taxa de prenhez e no número de crias nascidas. No entanto, o peso ao nascimento foi maior ($P < 0,05$) no CONT ($2,2 \pm 0,1$ g) do que nos demais grupos (EGI = $1,1 \pm 0,2$; EGF = $1,8 \pm 0,1$; EGT = $1,2 \pm 0,1$ g). O peso da progênie manteve-se superior ($P < 0,05$) no CONT até a quarta semana e foi similar ($P > 0,05$) aos demais grupos a partir da quinta semana. A qualidade espermática estimada pelos parâmetros de concentração, motilidade espermática e porcentagem de espermatozoides normais não diferiu ($P > 0,05$). O diâmetro dos túbulos seminíferos foi menor ($P < 0,03$) no EGI ($178,1 \pm 41,9$ μm) em comparação ao CONT ($199,2 \pm 28,2$ μm), não havendo diferença ($P > 0,05$) em EGT ($197,5 \pm 27,9$ μm) e EGF ($204,0 \pm 17,1$ μm). Quanto à altura do epitélio seminífero, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os diferentes grupos e a proporção volumétrica de compartimento tubular nos testículos foi significativamente menor ($P < 0,0001$) no grupo EGT ($71,7 \pm 16,0\%$) em relação ao CONT ($89,9 \pm 2,8\%$). O número de embriões produzidos do acasalamento entre fêmeas controle e machos do EGI, EGF e EGT foi similar ($P > 0,05$) entre os grupos. Conclui-se que o ET comprometeu o crescimento intrauterino, resultando em menor peso ao nascimento nos grupos submetidos ao ET, alterou a morfometria dos túbulos seminíferos, porém não afetou a qualidade espermática da progênie masculina e a fertilização *in vivo*.

Palavras-chave: espermatogênese, qualidade espermática, mudanças climáticas, peso ao nascimento

ABSTRACT

Heat stress (HS) affects the reproductive efficiency of many species, causing subfertility by reducing gametogenesis. This study evaluated the effect of HS at different stages of pregnancy in C57BL/6 mice on the somatic development and reproductive parameters of male progeny. After mating confirmation (presence of vaginal plug), females were submitted to HS during initial gestation (EGI - from 1st to 10th day), final gestation (EGF - from 11th day to parturition), total gestation (EGT) or maintained under normothermic conditions (CONT). The HS was induced in an environmental chamber heated by two red lamps at 41 °C and 65% relative humidity for two hours daily. Control females received a hormonal superovulation protocol with 5 IU of eCG and 5 IU of hCG intraperitoneally, and then they were mated with the male progeny in a 2:1 ratio. After 72 h, male epididymis and testes were collected for sperm evaluation and seminiferous tubule histology, respectively. Embryos produced *in vivo* with these males were also collected. There was no difference ($P > 0.05$) in the pregnancy rate and the number of offspring born. However, birth weight was higher ($P < 0.05$) in CONT (2.2 ± 0.1 g) than in the other groups (EGI = 1.1 ± 0.2 ; EGF = 1.8 ± 0.1 ; EGT = 1.2 ± 0.1 g). Progeny weight remained higher ($P < 0.05$) in CONT until the fourth week and was similar ($P > 0.05$) to the other groups from the fifth week on. The sperm quality estimated by the parameters of concentration, sperm motility and percentage of normal sperm did not differ ($P > 0.05$). The diameter of the seminiferous tubules was smaller ($P < 0.03$) in EGI (178.1 ± 41.9 μm) compared to CONT (199.2 ± 28.2 μm), with no difference ($P > 0.05$) in EGT (197.5 ± 27.9 μm) and EGF (204.0 ± 17.1 μm). As for the height of the seminiferous epithelium, no differences were observed ($P > 0.05$) between the different groups and the volumetric proportion of tubular compartment in the testes was significantly lower ($P < 0.0001$) in the EGT group ($71.7 \pm 16.0\%$) compared to CONT ($89.9 \pm 2.8\%$). The number of embryos produced from mating between control females and EGI, EGF and EGT males was similar ($P > 0.05$) between groups. It is concluded that HS compromised intrauterine growth, resulting in lower birth weight in groups submitted to HS, altered the morphometry of the seminiferous tubules, but did not affect the sperm quality of male progeny and *in vivo* fertilization.

Keywords: birth weight, climate changes, spermatogenesis, sperm quality.

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas representam uma ameaça à sobrevivência de muitas espécies e ecossistemas, um impacto direto nos sistemas de produção animal em diversas partes do mundo (HOFFMANN, 2010). Segundo o relatório de síntese do *Intergovernmental Panel on Climate Change* – IPCC (2014), a temperatura global tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e as projeções para o final do século apontam para um aumento de 1 a 4 °C, em diferentes cenários. No entanto, o aumento de 2 °C implica drasticamente na redução da biodiversidade e no comprometimento da segurança alimentar mundial (IPCC, 2014). Por isso, foi elaborado o relatório especial (IPCC, 2018), abordando os impactos do aquecimento global em 1,5 °C e apresentando estratégias de mitigação, uma vez que o aquecimento global é inevitável, porém os riscos de extinção de espécies, biodiversidade e segurança alimentar seriam menos severos do que o aumento de 2 °C na temperatura global.

A manutenção da termorregulação corpórea é vital para os animais endotérmicos e é mantida através da troca (perda ou ganho de calor) com o ambiente, em uma faixa característica da espécie, denominada de zona termoneutra. A termorregulação é mantida pela combinação da produção de calor a partir do metabolismo e pela perda de calor para o meio ambiente através dos mecanismos de condução, convecção, radiação e evaporação (HANSEN, 2009). Em situações de temperatura ambiente mais elevada que o limite superior da zona de termoneutralidade, os animais perdem a capacidade de dissipar o calor, levando ao aumento da temperatura corporal e o indivíduo entra em estresse térmico (HANSEN, 2009). O estresse térmico (ET) produz diversas alterações fisiológicas, metabólicas e comportamentais que predisõem à incidência de doenças e problemas reprodutivos, além de reduzirem o bom rendimento de ganho de peso e produção dos animais (HANSEN, 2009; HUBER *et al.*, 2020; MCMANUS, 2020). Apesar de algumas raças bovinas apresentarem maior resistência (BAENA *et al.*, 2019), a busca por melhores condições ambientais e estratégias para promover o bem-estar animal nos sistemas de criação têm sido cada vez maior (NARDONE *et al.*, 2010). Dessa forma, tendo em vista que as mudanças climáticas decorrentes do aquecimento global afetam a reprodução de diferentes espécies, torna-se

imprescindível o estudo do efeito do estresse térmico na reprodução de mamíferos e a avaliação de seus descendentes quanto à sobrevivência, resistência e fertilidade. Em função da necessidade de um ambiente controlado termicamente para avaliar as consequências deste evento, os camundongos foram utilizados como modelo biológico experimental.

1.1 MODELO ANIMAL E REPRODUÇÃO DE CAMUNDONGOS

A escolha do modelo animal para qualquer pesquisa científica consiste em identificar uma espécie animal em que os processos fisiológicos e patológicos espontâneos ou induzidos sejam semelhantes aos encontrados em humanos ou na espécie de interesse. O modelo animal ideal deve ser de baixo custo, fácil manejo e alojamento, ter tamanho pequeno, com curto ciclo de vida e alta prolificidade. Por esse motivo, o camundongo (*Mus musculus*) é o modelo animal mais amplamente utilizado nas pesquisas biomédicas devido à sua fácil adaptação a vários ambientes e por possuírem características fisiológicas que podem ser extrapoladas para outros mamíferos (RAND, 2018).

A linhagem C57BL/6 é uma linhagem endogâmica adquirida através de acasalamentos entre irmãos por 20 gerações, sendo geneticamente uniforme, o que diminui a variabilidade experimental (WILDT *et al.*, 2008). Acredita-se que a zona de termoneutralidade dos camundongos esteja entre 28 e 34 °C (FISCHER *et al.*, 2018). Porém, estudos recentes identificaram apenas um ponto de neutralidade, sendo 29 °C no período claro e 33 °C no escuro, através de variações na temperatura ambiente que resultaram na produção de calor (termogênese) ou perda (termólise), quando abaixo ou acima, respectivamente, destes pontos (Škop *et al.*, 2020) mantendo a temperatura corporal entre 36,5 e 38 °C (GORDON, 2012). A reprodução dos camundongos é não-estacional, porém outras funções fisiológicas podem ser influenciadas pelo período circadiano. Eles são roedores noturnos, sendo mais ativos no período escuro, se comunicam por feromônios através da urina para sinalizar informações entre eles e sobre o período reprodutivo. Os camundongos possuem o olfato apurado e, por serem noturnos, encontram o parceiro sexual mesmo na escuridão e conseguem distinguir diferentes linhagens através do odor da urina (BAKKER, 2003).

As fêmeas de camundongo possuem o útero do tipo bicornual com os cornos laterais e um único corpo. O ciclo estral possui duração de quatro a cinco dias e a gestação tem duração de 18,5 a 21 dias (VANDENBERGH, 2008). A placenta é do tipo discoidal labiríntica, estando completamente formada no 12º dia da gestação (BOYD *et al.*, 2018). Após o nascimento, a sexagem dos animais é realizada medindo a distância ânus-genital, sendo esta maior nos machos que nas fêmeas. Apesar de ser possível a realização da sexagem em neonatos, necessita-se de treinamento e experiência, pois podem ocorrer erros quando os animais são muito jovens (MCCARTHY, 2018). Grupos de fêmeas juvenis alojadas juntas apresentam atraso na ovulação, sendo uma característica importante e comumente utilizada para a sincronização do ciclo estral. Em contrapartida, quando essas fêmeas são expostas a um macho ou sua urina, a ovulação ocorre em até três dias (VANDENBERGH, 2008).

Os machos possuem a glândula da próstata dividida em quatro lobos histologicamente diferentes, além das glândulas sexuais acessórias ampulares, prepuciais, bulbouretrais e vesículas seminais (KNOBLAUGH *et al.*, 2018). Os testículos são pares, pesando em média 0,92 mg cada, que se comunicam com a cavidade abdominal através dos canais inguinais que ficam abertos por toda a vida. Os túbulos seminíferos possuem diâmetro médio de 205 µm, com camadas compostas por células de Sertoli e células germinativas, responsáveis pela espermatogênese que ocorre em 39 dias, constituída de 12 estágios (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Os ductos eferentes variam de três a cinco e se localizam no interior da gordura do epidídimo, terminando em um único ducto de transição para o epidídimo. O epidídimo dos roedores é proporcionalmente mais longo que o de humanos (KNOBLAUGH *et al.*, 2018). O líquido seminal é formado pela junção das secreções das vesículas seminais, glândulas coagulantes (lobo anterior da próstata) e glândulas bulbouretrais, sendo responsáveis pelo tampão seminal em roedores a combinação das duas primeiras. Esta característica é importante para impedir a saída do sêmen, facilitando a fertilização e possibilitando a confirmação de cópula quando visualizado o tampão vaginal nas fêmeas após o acasalamento (KNOBLAUGH *et al.*, 2018).

Os acasalamentos podem ser monogâmicos ou poligâmicos, sempre utilizando apenas um macho para acasalar com uma ou mais fêmeas e a visualização do tampão vaginal nem sempre se confirma em gestação (DORSCH *et al.*, 2020). Os roedores possuem um par de glândulas prepuciais, que são glândulas sebáceas modificadas, responsáveis pela produção de feromônios. Elas estão presentes tanto nas fêmeas quanto nos machos e nestes ficam localizadas na região subcutânea, lateral à base do pênis (KNOBLAUGH *et al.*, 2018).

Especificamente na linhagem C57BL/6, a maturidade sexual ocorre entre cinco e seis semanas de idade nas fêmeas, com a ovulação de múltiplos folículos, e seis semanas nos machos, produzindo ninhadas com média de seis filhotes (CURRER *et al.*, 2009). Os machos adultos apresentam concentração espermática média entre $4,1 \times 10^6$ e $7,8 \times 10^6$ células/mL e motilidade de 37 a 65% (BAHRAMI *et al.*, 2019). As fêmeas ovulam em média 10 oócitos por ciclo e respondem bem à superovulação, produzindo 25 oócitos em média, apresentando melhores taxas na idade entre 25 e 32 dias (BYERS *et al.*, 2006; KOLBE *et al.*, 2015). O peso ao nascimento é de 1,5 g e os filhotes ganham, em média, 3 g por semana até a idade de três semanas (SPANGENBERG *et al.*, 2014). A partir dessa idade, os machos ganham mais peso em relação às fêmeas, atingindo a média de 25 g com oito semanas de vida (The Jackson Laboratory - *Body Weight Information for C57BL/6J*; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

1.2 IMPACTO DO AQUECIMENTO GLOBAL NA REPRODUÇÃO

As mudanças climáticas aumentam o risco de extinção das espécies que não conseguem mudar para outro *habitat* ou que são incapazes de se adaptarem às novas condições ambientais (GRAZER E MARTIN, 2012). À exemplo disso, podemos citar o urso polar, que teve mudanças no período reprodutivo e diminuição da oferta de alimentos, prejudicando a reprodução, já que as fêmeas precisam utilizar toda a sua reserva energética para sobreviver, manter a gestação e amamentar (MOLNÁR *et al.*, 2010). Os mamíferos marinhos também são afetados devido ao aquecimento dos oceanos, que promove o estresse, aumenta o índice de doenças e afeta o desempenho reprodutivo (ALBOUY *et al.*, 2020). A reprodução dos peixes também é prejudicada em algumas espécies, pois altas temperaturas inibem a atividade da enzima conversora de esteroide, causando

redução na síntese de estrógeno ovariano, além de prejudicar a maturação dos oócitos e a ovulação (PANKHURST E MUNDAY, 2011).

Quando a elevação de temperatura corporal ultrapassa a capacidade do organismo de ajustá-la, é gerado o ET. Em condições ambientais normais com elevadas temperaturas, como durante as estações mais quentes do ano, ocorre o ET (ROSS *et al.*, 2015). Ele pode interferir nos processos reprodutivos por uma redistribuição do fluxo sanguíneo para as regiões periféricas do corpo, na tentativa de aumentar a perda de calor sensível. Os animais apresentam alterações fisiológicas, como aumento das frequências cardíaca e respiratória, sudorese e diminuição na produção de leite, fezes e urina (HANSEN, 2009; HUBER *et al.*, 2020), além do aumento na incidência de mastite. Além disso, há redução no consumo de alimento, aumento no consumo de água e conseqüentemente menor digestibilidade e absorção dos nutrientes. Estes são direcionados para regiões vitais de manutenção do organismo, como cérebro e músculos, seguidos de produção e, por último, a reprodução. Neste caso, a reprodução é o primeiro sistema a falhar nos animais de produção, quando o organismo não se encontra em homeostase (MCMANUS, 2020).

Em bovinos leiteiros há redução do apetite e aumento da necessidade de água, diminuindo a produção de calor metabólico, dissipando o calor para o ambiente. A redução na produção de leite é ainda maior sem o sistema de aspersão de vapor de água para resfriamento (TAO *et al.*, 2020). Com a redução no consumo de alimento, ocorre o desequilíbrio energético e a alteração na disponibilidade de nutrientes essenciais na ciclicidade reprodutiva, manutenção de gestação e desenvolvimento fetal (HANSEN, 2009).

O ET pode ainda comprometer as células germinativas, o desenvolvimento inicial embrionário e outras células envolvidas na reprodução. Em bovinos, o ET leva à redução na detecção dos sinais do estro, diminuição das taxas de prenhez por inseminação artificial, diminuição da competência oocitária e do número de embriões recuperados após a fertilização (HANSEN, 2009). Sabe-se que o ET altera o eixo hipotalâmico-hipófise-gonadal, reduzindo a esteroidogênese folicular e a secreção do hormônio luteinizante (LH) e da progesterona. Com isso, a dominância folicular é reduzida pela carência de LH, que conseqüentemente

provoca o aumento dos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH) pela ausência de *feedback* negativo; e a gestação não é mantida pela concentração insuficiente de progesterona secretada. Com isso, o ET causa a perda de fertilidade, atraso no desenvolvimento folicular, diminuição da taxa de prenhez e aumento de perda embrionária (HANSEN, 2019; ROTH, 2020). Para contornar estes problemas, estratégias como a utilização de biotecnologias reprodutivas, como a transferência de embriões, podem ser empregadas. Neste caso, os embriões em estágio de mórula ou blastocisto são produzidos durante as estações mais frias do ano, criopreservados e transferidos em momentos mais propícios, pois nestas fases de desenvolvimento os embriões se tornam mais resistentes ao ET (BARUSELLI *et al.*, 2020).

Para Grazer e Martin (2012), a reprodução envolve múltiplos fatores que podem ser erroneamente interpretados quando analisados por um único dado, como número de embriões produzidos ou filhotes nascidos. Desta forma, outras variáveis ficam ocultas, como as disputas dos machos por fêmeas nas espécies de vida livre, a imunidade dos animais e a resistência a doenças. A avaliação por meio de um único fator que englobe todos os aspectos pode ser mais relevante, como o sucesso reprodutivo durante a vida, por incluir a fecundidade e sobrevivência da mãe e o desenvolvimento da prole até a fase adulta.

Quando ocorre o ET no período final da gestação em bovinos criados em regiões tropicais, há diminuição do fluxo sanguíneo placentário, restringindo a nutrição do útero e o crescimento fetal. Consequentemente, os bezerros nascem abaixo do peso, com baixas concentrações plasmáticas de imunoglobulinas IgG e imunidade reduzida. É importante ressaltar que estes bezerros sofrem adaptações epigenéticas que os conferem maior capacidade de termorregulação e termotolerância na idade adulta (DADO-SENN *et al.*, 2020). Também ocorrem modificações epigenéticas durante o desenvolvimento embrionário, na fase de diferenciação sexual gonadal, quando a linhagem de células germinativas tem o DNA remetilado. Então, a progênie pode apresentar alterações fenotípicas e reprodutivas (HUBER *et al.*, 2020). O ET natural durante a gestação em suínos, causa alterações fenotípicas na progênie, como teratogênias, menor conversão alimentar, pouco desenvolvimento das fibras musculares, baixa imunidade,

aumento de mortalidade durante a fase de pré-desmame, menor tamanho testicular na puberdade e comportamento agressivo e estereotipado (JOHNSON *et al.*, 2020).

A pelagem funciona como uma barreira de proteção contra a radiação solar direta na pele dos animais. No entanto, a pelagem de coloração escura absorve mais radiação térmica do que a pelagem clara. Em ovinos, a lã também impede a perda de calor por transpiração, sendo os animais com lã de coloração escura mais sensíveis ao ET. Os animais mais resistentes ao calor apresentam lã de coloração clara e pele de cor escura, sendo as raças deslanadas mais adaptadas a regiões tropicais. Porém, esta adaptação é multifatorial e envolve também funções endócrinas, respiratórias, circulatórias, excretoras e neurológicas, que variam entre os indivíduos (MCMANUS, 2020).

1.3 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA ESPERMATOGÊNESE

As células germinativas primordiais são formadas a partir das células do epiblasto durante o desenvolvimento embrionário, que nos camundongos ocorre durante o dia embrionário (E) 6,5 e a migração destas células para a gônada bipotente acontece entre E8 e E11. Na presença do cromossomo Y, a expressão da proteína Sox9 é aumentada, provavelmente pelo estímulo do gene SRY, conferindo a diferenciação sexual gonadal masculina no dia E12,5 (MAATOUK E CAPEL, 2008; MÄKELÄ *et al.*, 2018).

A espermatogênese é caracterizada por três fases: espermatogonial ou proliferativa, espermatocitária ou meiótica e espermiogênese ou de diferenciação. A fase proliferativa se inicia logo após o nascimento nos camundongos, quando as espermatogônias indiferenciadas sofrem sucessivas mitoses para auto-renovação ou diferenciação em espermatogônias A e depois em espermatogônias B (BELLVÉ, 1993). Posteriormente, ocorre o crescimento celular, a síntese de DNA e a diferenciação em espermatócitos primários, caracterizando o início da meiose, que nos camundongos acontece aproximadamente a partir dos 15 dias de vida. Durante a prófase ocorrem alterações fenotípicas na célula, sendo denominadas de: pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Nesta fase, há síntese de DNA e recombinação genética pelo *crossing over* na primeira meiose, importante para a variabilidade genética dos indivíduos, formando os espermatócitos

secundários. A segunda meiose produz duas células haploides, originando as espermátides que, por sua vez, sofrem diferenciação na fase espermiogênica para a completa formação dos espermatozoides (LARA *et al.*, 2018). Um camundongo adulto produz, em média, 40 milhões de espermatozoides por grama de tecido testicular diariamente (FAYOMI E ORWIG, 2018).

Altas temperaturas podem comprometer a espermatogênese, visto que a maioria dos mamíferos possuem os testículos suspensos para permanecerem em temperatura inferior a corporal. Este mecanismo é promovido pelo sistema de termorregulação testicular, através do plexo pampiniforme, com a entrada de sangue quente da cavidade abdominal para os testículos e a drenagem de sangue frio dos testículos para o organismo. Além disso, auxiliam neste processo a túnica dartos, por sua ação muscular que altera a espessura da pele e a área de superfície de contato, e o músculo cremáster (HAFEZ, 2004). A temperatura elevada nos testículos provoca uma redução na espermatogênese, na motilidade espermática e aumenta a ocorrência de patologias espermáticas. Esses efeitos são frequentemente encontrados em animais criptorquidas, que possuem os testículos internalizados na cavidade abdominal, ou quando há aumento da temperatura corporal. Porém, normalmente não ocorrem imediatamente após o ET devido às células afetadas serem ainda imaturas, por causa do tempo de duração do ciclo da espermatogênese (HANSEN, 2009), que é de 39 dias em camundongos da linhagem C57BL/6 (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

As células de Leydig são responsáveis pela síntese de testosterona, hormônio andrógeno. Elas estão localizadas no interstício que envolve os túbulos seminíferos, próximas a vasos sanguíneos e vasos linfáticos. A produção de testosterona ocorre ainda na fase fetal, logo na diferenciação sexual, porém as células de Leydig fetais sintetizam apenas o hormônio intermediário, androstenediona, sendo finalmente convertido em testosterona pelas células de Sertoli. Logo após o nascimento, as células de Leydig fetais são substituídas por outras maduras, que assumem a produção completa do andrógeno (SHIMA E MOROHASHI, 2017). Estas células em situações de choque térmico, apresentaram aumento proliferativo anormal em ratos adultos. A hiperplasia em questão, não foi associada ao estímulo do LH, pois os animais apresentavam concentrações séricas

normais. Em contrapartida, as concentrações testicular e sérica de testosterona foram significativamente reduzidas. Sendo assim, verificou-se que tanto a expressão da proteína Cyp17, catalisadora da conversão de pregnenolona em andrógeno, como a da proteína StAR, que regula o transporte de colesterol, foram reduzidas (LI *et al.*, 2015).

Nos mamíferos, duas vias metabólicas são utilizadas para a energia necessária na espermatogênese: glicólise e fosforilação oxidativa. Ambas produzem ATP e espécies reativas de oxigênio (EROs), essenciais para a motilidade e regulação da apoptose na espermatogênese. Porém, na presença de íons ferrosos livres há produção do radical hidroxila (OH), levando à oxidação desordenada de proteínas, lipídeos e DNA, gerando o estresse oxidativo (GIBB *et al.*, 2020). O ET provoca o estresse oxidativo nas células germinativas, principalmente nas espermátides, aumentando as reações oxidativas mitocondriais, os danos no DNA, a taxa metabólica e a demanda por oxigênio, causando infertilidade durante os meses mais quentes nos suínos (GIBB *et al.*, 2020). No entanto, os javalis se mostram mais resistentes a esses efeitos, produzindo bons volumes de sêmen viável durante todo o ano (SCHULZE *et al.*, 2019), diferente da maioria das espécies de mamíferos. À exemplo disso, o bovino (RAHMAN *et al.*, 2018) e o carneiro (MCMANUS *et al.*, 2020) são considerados mais susceptíveis aos efeitos do ET, sendo demonstradas diversas alterações de avaliação espermática decorrentes do ET natural ou induzido. Os bovinos apresentam queda na qualidade espermática durante o verão, com baixa concentração e motilidade espermática, além de aumento na porcentagem de espermatozoides anormais. As reações oxidativas danificam o DNA, causam peroxidação lipídica e induzem a apoptose. Isto é mais visualizado nos *Bos taurus* do que nos *Bos indicus* (MORELL, 2020).

As aves possuem características anatômicas mais adaptáveis ao aumento de temperatura, com os testículos internalizados na cavidade abdominal e funcionamento normal da espermatogênese em 40 – 41 °C de temperatura corporal. A expressão da proteína do choque térmico HspA2 nas aves, tem sido uma seleção positiva de mudanças evolutivas para adaptação em temperaturas elevadas (PADHI *et al.*, 2016) e algumas linhagens de frango de corte sob ET

apresentaram alterações na expressão de genes relacionados ao choque térmico que lhes conferem recuperação imediata (WANG *et al.*, 2015).

Na ordem taxonômica díptera, um estudo realizado com a mosca *Drosophila suzukii*, demonstrou que os indivíduos sobreviventes ao ET durante a fase de desenvolvimento, apresentaram redução de oviposição, do número de ovários, no comprimento testicular e curta longevidade. No entanto, filhotes de fêmeas que receberam ET antes da ovipostura mostraram-se mais resistentes, com maior número de sobreviventes até a fase adulta. Esta resistência pode ser adquirida através da herança epigenética, pois as proteínas de choque térmico atuam na proteção aos danos causados pelo ET (GREEN *et al.*, 2019). Dessa forma, as moscas submetidas ao ET antes da ovipostura transmitiram resistência a altas temperaturas para a sua prole.

1.4 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO INDUZIDO EM CAMUNDONGOS

O ET induzido é realizado em ensaios experimentais para simular condições ambientais de forma controlada, possibilitando o estudo de seus efeitos. O ET pode ser do tipo crônico ou agudo, seguindo a relação inversamente proporcional de tempo e temperatura, na qual se estabelece que quanto maior a temperatura, menor a duração do evento. Ele pode ser induzido por diferentes maneiras, como por exemplo com banho-maria, câmara térmica ambiental ou colchão térmico (KING *et al.*, 2002; YAERAM *et al.*, 2006; HOUSTON *et al.*, 2018; WAN *et al.*, 2020a) (Quadro 1). Camundongos adultos que receberam ET agudo através de banho-maria por 20 min a 43 °C, apresentaram queda significativa no peso médio dos testículos após quatro e 15 dias. Contudo, mesmo com o aumento de peso gradual, seus valores eram inferiores aos animais controle até 68 dias depois (ROCKETT *et al.*, 2001). Em outro estudo, com duração de 60 min sob temperatura de 42 °C, o peso testicular foi reduzido em apenas um dia, sendo mantido por no mínimo 35 dias após. No entanto, temperaturas de até 40 °C não foram capazes de afetar o peso testicular, acometendo apenas a porcentagem de células haploides, portanto espermátides, 14 dias depois. Esse período indica que, no momento do ET, as células estavam no estágio de espermátócito (SAILER *et al.*, 1997).

Quadro 1: Protocolos experimentais de indução de estresse térmico em machos.

Espécie/sexo	Tipo de Estresse	Temperatura e umidade relativa	Duração	Referência
Camundongos machos adultos	Câmara térmica	35 °C / 60 – 65%	8 h	(YAERAM <i>et al.</i> , 2006)
		35 °C / 30%	24 h única exposição ou 8 h diárias por uma semana	(HOUSTON <i>et al.</i> , 2018)
		36 °C / 66%	24 h	(ZHU E SETCHELL, 2004)
		35 °C	24 h	(CAMMACK <i>et al.</i> , 2009)
		37 – 38 °C	8 h diárias por 3 dias	(WECHALEKAR <i>et al.</i> , 2010)
	Sala térmica	32 °C	3 semanas	(COSTA <i>et al.</i> , 2018)
	Colchão térmico	41 °C	15, 30 e 45 min*	(KING <i>et al.</i> , 2002)
	Banho-maria	39 e 41 °C	30 min semanalmente por cinco semanas	(WAN <i>et al.</i> , 2020a)
		38 – 42 °C	30 min*	(PAUL <i>et al.</i> , 2008)
		40 °C	20 min*	(RIZZOTO <i>et al.</i> , 2020)
		40 e 42 °C	60 min*	(SAILER <i>et al.</i> , 1997)
		42 °C	30 min*	(PÉREZ-CRESPO <i>et al.</i> , 2008)
		43 °C	15 min*	(ZAPRJANOVA <i>et al.</i> , 2013)
	Ratos adultos		20 min*	(ROCKETT <i>et al.</i> , 2001)
		43 °C	30 min*	(LI <i>et al.</i> , 2015)
Ratos recém-nascidos ou adultos	Sala térmica	34 °C	45 ou 90 dias	(KUROWICKA <i>et al.</i> , 2013)

* Única exposição.

De fato, o ET afeta todas as células germinativas, sendo predominantemente mais prejudicados os tipos celulares em processo de crescimento e divisão meiótica. Quando machos estressados termicamente são acasalados em diferentes momentos, foi identificado que os espermátócitos foram os mais afetados. Por sofrerem apoptose, eles acabam interrompendo a espermatogênese e produzindo o menor número de fetos 28 dias após o ET (ROCKETT *et al.*, 2001). Vale ressaltar que as espermátides também são afetadas pelo choque térmico. Há relatos de que machos acasalados sete dias após receberem ET, resultaram em menor número de zigotos que desenvolveram até o estágio de mórula e blastocisto (ZHU E SETCHELL, 2004). Outros estudos corroboram para a redução significativa da taxa de gestação e fertilização *in vitro*, que resultaram na diminuição da fertilização de oócitos, com porcentagem reduzida de zigotos e de embriões que desenvolveram até blastocisto (WAN *et al.*, 2020a; YAERAM *et al.*, 2006). No entanto, animais podem apresentar diferentes expressões gênicas testiculares após ET, com potencial de herdabilidade de resistência aos seus descendentes, possibilitando uma forma de identificar e selecionar indivíduos resistentes ao ET (CAMMACK *et al.*, 2009).

Os zigotos recuperados de camundongos fêmeas submetidas ao ET uma única vez por 12 h a partir do dia de verificação do tampão vaginal, apresentaram desenvolvimento *in vitro* mais afetado quando comparado ao desenvolvimento *in vivo*. Este último sofreu efeito apenas com ET crônico, durante 12 h por três dias consecutivos, resultando em menor número de fetos (OZAWA *et al.*, 2003). As fêmeas de camundongos gestantes expostas ao ET no início da gestação, apresentaram menor porcentagem de embriões que evoluíram no estágio de desenvolvimento, tanto de zigoto para embrião de duas células quanto de duas células para mórula. As fêmeas também tiveram maior mortalidade embrionária precoce, apresentando maiores danos ao DNA embrionário no estágio de duas células (OZAWA *et al.*, 2002; MATSUZUKA *et al.*, 2005), aumento na expressão de genes relacionados à autofagocitose nos ovários e diminuição sérica de progesterona (ULLAH *et al.*, 2019). Além disso, menor concentração de glutatona e maior concentração de peróxido de hidrogênio foram relatadas nas fases de zigoto e embrião de duas células, aumentando o estresse oxidativo. Curiosamente, quando os zigotos coletados de fêmeas não estressadas receberam ET no cultivo

in vitro de forma direta durante as primeiras 12 h após a confirmação da cópula pela verificação do tampão vaginal, essas diferenças foram insignificantes (OZAWA *et al.*, 2002). Este achado confirma a capacidade de termotolerância dos embriões, como demonstrado em estudo anterior. Neste, os embriões de cultivo *in vitro* pré-estressados sob temperatura de 40 °C, se desenvolveram até oito células sob 42 °C (EALY E HANSEN, 1994). Com isso, pode-se concluir que os embriões expostos a temperaturas moderadas antes de serem submetidos a temperaturas superiores, podem adquirir mecanismos de adaptação. No entanto, esta adaptação não necessariamente resulta no desenvolvimento normal dos embriões até o final da gestação, podendo haver retardo na diferenciação do trofotoderma e redução no número de células (CHOI *et al.*, 2015).

O ET induzido até o dia E4 reduz os sítios de implantação embrionária e o número de fetos nascidos (TIAN *et al.*, 2013). Mais tardiamente, entre o 6^o e o 15^o dia da gestação nos camundongos, além de causar maiores perdas pré e pós-implantação, o ET eleva níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no líquido amniótico (KUMAR *et al.*, 2006). Já na gestação final, ocorre diminuição do consumo de alimento materno e aumento no consumo de água. Conseqüentemente, há redução no ganho de peso diário materno e o peso placentário também é reduzido. Além disso, a largura da cabeça dos fetos em relação ao comprimento corporal deles, foi menor nos indivíduos nascidos de fêmeas estressadas. A complexidade dos ninhos fabricados pelas mães submetidas ao ET também foi reduzida (OLIVIER *et al.*, 2020). As fêmeas lactantes submetidas ao ET diariamente após o parto, apresentaram redução no consumo de alimento diário, diminuição no ganho peso corporal e na produção de leite (HAN *et al.*, 2019).

Com relação às alterações fisiopatológicas, estudos demonstraram que o ET aumenta os níveis plasmáticos de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, em resposta ao estresse (LIN *et al.*, 2019). Porém, em fêmeas prenhes, pode ocorrer a disfunção de termorregulação corpórea, causada por lesões em células hipotalâmicas e aumento do número de células apoptóticas no hipotálamo, pulmão, rins e fígado. A disfunção da termorregulação corpórea se deve ao comprometimento do eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal, reduzindo os

níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona, que são normalmente liberados em resposta ao estresse (LIN *et al.*, 2019). Por outro lado, YIN *et al.* (2011) encontraram um aumento de células com receptores GABA no hipotálamo de fetos sob ET intrauterino. Uma vez que neurotransmissores GABA inibem tanto o ACTH como a corticosterona induzida por estresse, isto sugere uma certa tentativa de adaptação ao ET. Posteriormente, houve rápida recuperação gradual e o número de células com receptores GABA foram reduzidas a níveis normais.

Temperaturas acima de 42 °C são capazes de causar malformações externas no feto, bem como o aumento de mortalidade, principalmente quando o ET realizado no dia 8,5 da gestação (SHIOTA, 1988). Estes dados são imprescindíveis para se estabelecer o limite de temperatura na indução do ET, sem comprometer a vida da prole. Seja por quais tipos de estímulos estressores que ocorrem durante a gestação, incluindo o ET, as fêmeas de camundongo apresentam comportamento materno de cuidado e proteção aos filhotes. Este cuidado é mantido por longos períodos, similar às fêmeas não-estressadas (MEEK *et al.*, 2001). Isto assegura o aleitamento materno da prole, que seria uma variável a ser considerada, caso fosse insuficiente para a sobrevivência e ganho de peso dos animais até a idade de desmame.

Em camundongos machos nascidos de fêmeas submetidas ao ET durante a gestação, houve redução significativa da distância ânus-genital ao nascimento. Esta análise foi normalizada na idade de desmame, onde os animais também apresentaram peso testicular reduzido (DESAULNIERS *et al.*, 2016). Também foi demonstrada a redução do peso ao nascimento de filhotes de ratas, porém estes não apresentaram diferença de peso na idade de desmame, indicando que não houve redução na qualidade do leite materno (JOHNSON *et al.*, 2015).

1.5 ALTERAÇÕES NA AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA E HISTOLÓGICA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

Durante a espermatogênese, as células imaturas em fase produtiva de material genético e organelas são mais vulneráveis a fatores externos. Dessa forma, a incapacidade da termorregulação testicular pode levar ao comprometimento do desenvolvimento espermático, causando o aumento de dano

tecidual e anomalias. Nesse sentido, um estudo realizado por Pérez-Crespo *et al.* (2008) mostrou que após o ET, a concentração espermática nos camundongos foi significativamente reduzida, principalmente 28 dias depois, indicando maior comprometimento na população de células em estágio de espermatócito. Também foram afetados os índices de motilidade, viabilidade espermática e de movimento progressivo retilíneo, além do aumento no percentual de células com DNA danificado e de patologias espermáticas. Além disso, há modificações na membrana de espermatozoides da cauda do epidídimo que promovem a apoptose (WECHALEKAR *et al.*, 2010). Um estudo recente desenvolvido por Houston *et al.* (2018) confirmou que as células mais afetadas pelo ET são espermatócito paquíteno e espermátide redonda, enquanto as espermatogônias A são mais resistentes.

As alterações causadas pelo ET se estendem à porcentagem de células espermáticas em diferentes fases e à taxa de diferenciação. Nesse sentido, camundongos estressados sob temperatura de 42 °C apresentaram redução acentuada na população de células haploides depois de três dias, que se manteve em baixos níveis enquanto a população de células diploides aumentava. Da mesma forma, sob temperatura de 40 °C houve redução de células haploides apenas entre o dia 11 e 14 após o ET e, concomitantemente, aumento de células diploides no mesmo momento (SAILER *et al.*, 1997). Essas modificações na dinâmica populacional espermática sugerem o aumento da taxa de diferenciação, promovendo o aumento numérico de espermatogônias, enquanto a população de espermátides é comprometida. Adicionalmente, essas modificações também acontecem entre as células haploides, de forma que o ET aumenta o percentual de espermátides alongadas e em alongamento, que são células mais diferenciadas, enquanto o percentual de espermátides arredondadas é reduzido (SAILER *et al.*, 1997). Recentemente, Costa *et al.* (2018) identificaram que camundongos adultos mantidos sob altas temperaturas, apresentaram aceleração do ciclo espermatogênico, com maior frequência dos estágios de espermiação e divisões meióticas. No entanto, apesar da antecipação de diferenciação das espermátides em espermatozoides, houve elevada taxa de apoptose nas células germinativas, que culminou na redução de espermatozoides produzidos. Com relação a porcentagem sexual de espermatozoides provenientes de camundongos adultos

submetidos ao ET induzido, há divergências na literatura. Pérez-Crespo *et al.* (2008) não encontraram efeito na proporção de fetos cromossomos X e Y no útero de fêmeas acasaladas com machos que receberam o insulto, exceto quando a cópula ocorreu no mesmo dia do ET, apresentando maior porcentagem de fetos femininos. Já em outro estudo recente, os autores identificaram maior porcentagem de espermatozoides Y e maior porcentagem de filhotes do sexo masculino nascidos de machos submetidos ao ET (WAN *et al.*, 2020a).

Os túbulos seminíferos constituem o parênquima testicular e compreendem o epitélio germinativo, onde se desenvolve o ciclo da espermatogênese. Nos camundongos, ele é composto pela túnica própria formada por apenas uma camada de células mióides peritubulares, células de Sertoli e células germinativas. Em sua camada basal estão localizadas as espermatogônias, que seguem em direção ao lúmen conforme se diferenciam, sendo identificados diferentes tipos celulares em fase de desenvolvimento. O arranjo dessas células divide a espermatogênese em 12 estágios (LARA *et al.*, 2018). Os camundongos adultos da linhagem C57BL/6 possuem 11 túbulos seminíferos em cada testículo, medindo em média 144 mm de comprimento (NAKATA *et al.*, 2015) e 205 µm de diâmetro cada um (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Sabendo-se que o ET interfere na espermatogênese, estudos corroboram que alterações microscópicas podem ser evidenciadas em cortes histológicos. Testículos coletados imediatamente após o ET não apresentaram alteração histológica, no entanto, quando coletados horas depois, foram visualizados vacúolos nos túbulos seminíferos, células germinativas multinucleadas e com a cromatina densa, corpos apoptóticos e células degeneradas (ROCKETT *et al.*, 2001), além de forte redução de espermatozoides e espermatócitos (PAUL *et al.*, 2008). A proteína de choque térmico Hsp72 foi expressa após o ET induzido, e a expressão gênica da proteína Hsp73 foi aumentada, sinalizando uma possível prevenção à apoptose nos testículos (ZAPRJANOVA *et al.*, 2013). Em estudo realizado com ratos mantidos sob 34 °C por 45 dias, foi visualizada a degeneração do epitélio seminífero, além de redução na área dos túbulos seminíferos e no número de células de Sertoli (KUROWICKA *et al.*, 2013). Outro estudo recente demonstrou que camundongos expostos a um único insulto de ET, apresentaram

redução do diâmetro de túbulos seminíferos e redução do peso testicular 14 dias depois (RIZZOTO *et al.*, 2020). Em conjunto, esses dados demonstram que o ET afeta de forma significativa os parâmetros reprodutivos masculinos, diminuindo a capacidade espermatogênica, a qualidade, motilidade e concentração espermática. No entanto, pouco se sabe ainda a respeito do impacto do ET durante o desenvolvimento intrauterino sobre os parâmetros reprodutivos masculinos na vida adulta, e o período do desenvolvimento embrionário/fetal no qual o ET pode induzir maior comprometimento na capacidade reprodutiva.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ET na gestação sobre o crescimento pós-natal e características reprodutivas da progênie masculina de camundongos da linhagem C57BL/6.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aferir o efeito do ET gestacional na taxa de prenhez, no número de crias nascidas e na proporção sexual da progênie;

Avaliar o efeito do ET em diferentes fases gestacionais nos seguintes parâmetros da progênie masculina (geração F1):

- Peso ao nascimento e desenvolvimento somático até a oitava semana de idade;
- Motilidade progressiva espermática, concentração espermática e porcentagem de espermatozoides normais na oitava semana de idade;
- Histologia e morfometria dos túbulos seminíferos com oito semanas de idade;
- Quantidade dos embriões produzidos *in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E ÉTICA

Foram utilizados 80 camundongos C57BL/6 adquiridos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde eram mantidos em gaiolas convencionais, com fotoperíodo claro e escuro de 12 h e recebiam água e ração *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina – MG, sob o número 003/2018 (ANEXO 1) e conduzido na mesma instituição.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Para formação dos grupos experimentais, 40 machos e 40 fêmeas com idade de cinco a seis semanas foram acasalados na relação 1:1. As fêmeas foram observadas diariamente para a verificação do tampão vaginal, confirmativo de cópula, separadas e distribuídas aleatoriamente em um dos quatro grupos experimentais: i) grupo ET durante a primeira metade da gestação (gestação inicial, EGI, dias 1-10), ii) ET durante a segunda metade da gestação (gestação final, EGF, do dia 11 ao parto), iii) ET durante o período total da gestação (gestação total, EGT, do dia 1 ao parto) e iv) grupo controle (CONT), em que a gestação ocorreu na ausência de ET, em condições normotérmicas (25 °C e 45% de umidade relativa). Conforme fluxograma demonstrado na Figura 1, após o parto, o número de filhotes e o peso ao nascimento foram registrados e o desenvolvimento somático da progênie masculina foi monitorado até a oitava semana de idade. A progênie feminina foi avaliada separadamente por outro estudo. Neste momento, os machos foram acasalados na proporção 2:1 com fêmeas controle superovuladas [administração via intraperitoneal de 5 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e, depois de 48 h, de 5 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG)], formando quatro combinações: EGI-F1; EGF-F1; EGT-F1 e CONT-F1. Setenta e duas horas após o acasalamento, os embriões foram coletados para avaliação quantitativa. Os testículos e os epidídimos dos machos utilizados para o acasalamento foram coletados após a eutanásia (método físico de deslocamento cervical) e submetidos à análise espermática e histológica, respectivamente.

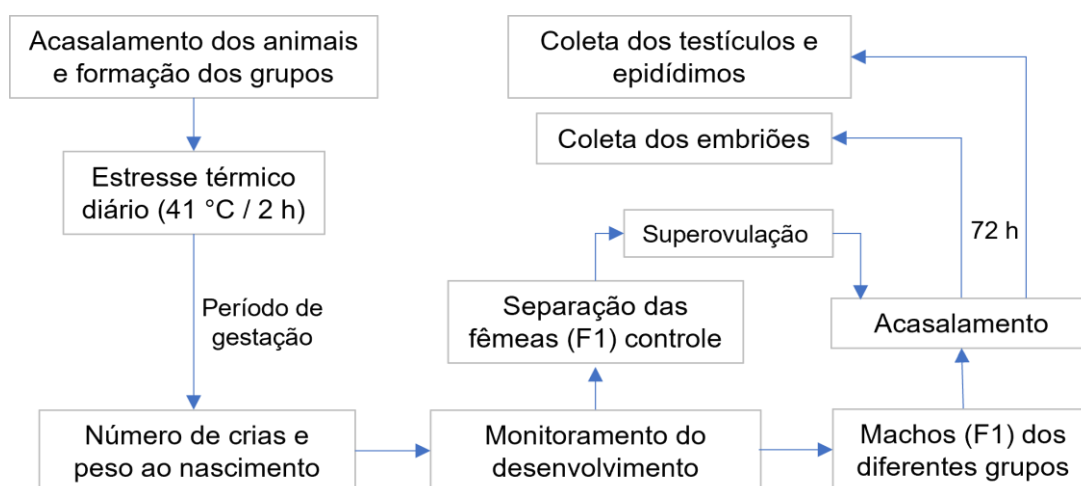


Figura 1: Desenho experimental.

3.3 INDUÇÃO DO ESTRESSE TÉRMICO

A indução do ET foi realizada conforme a metodologia descrita por Aroyo *et al.* (2007), diariamente por 2 h (01:00 p.m. às 03:00 p.m.), iniciado seis horas após o início do ciclo de luz, durante o período gestacional, dependendo do grupo experimental. Em resumo, uma gaiola padrão contendo os camundongos foi colocada dentro de uma câmara ambiental (70 cm x 80 cm x 50 cm), com acrílico transparente de 4 mm de espessura na parte superior e duas portas para acesso frontal (figura 2). A câmara foi aquecida por duas lâmpadas vermelhas de Siccatherm®, de modo que os camundongos não foram expostos ao calor radiativo. Um recipiente com água foi mantido no interior da câmara para proporcionar a umidade relativa requerida. A temperatura e a umidade (41 °C, 65% UR) foram mensuradas por dois termômetros UNI-T UT330B mantidos no interior da câmara. Durante todo o período os animais tinham acesso a alimento e água.

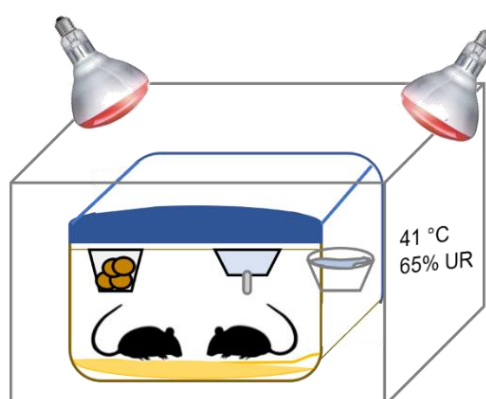


Figura 2: Imagem ilustrativa da câmara ambiental utilizada para a indução do estresse térmico de camundongos fêmeas C57BL/6 em

diferentes momentos durante a gestação, de acordo com o grupo experimental.

3.4 DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO

Após o parto, foram identificados e registrados o número de filhotes recém-nascidos vivos por fêmea. As ninhadas foram monitoradas semanalmente quanto ao desenvolvimento somático, pela pesagem de cada filhote em balança digital analítica (Ohaus®, modelo PR224BR). Foram registrados e analisados os dados dos animais de ambos os sexos até a idade de três semanas, quando foi realizada a sexagem e analisados apenas os dados referentes aos machos, seguindo com as mensurações semanais até oito semanas de vida (BATISTA, 2010).

3.5 AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

Para a análise espermática, foram selecionados aleatoriamente cinco machos provenientes de cada grupo experimental e acasalados com fêmeas controle. Às 72 h depois, eles foram eutanasiados para a coleta dos epidídimos e testículos. As caudas dos epidídimos foram depositadas em uma placa de Petri 35 mm e enxaguadas com DPBS, em seguida colocadas em 1 mL de meio FERT-TALP [2,0 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,2 mM KCl, 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 11,0 mM ácido láctico (60% w/w), 114,0 mM NaCl, 25,0 mM NaHCO_3 , 0,2 mM Piruvato de Na, 20,0 mM Penicilamine, 10,0 mM Hipotaurine, 1,0 mM Epinephrine, 6 mg/mL BSA (Fração V) e 50 µg/mL Gentamicina]. Foram realizados cinco cortes em cada cauda utilizando uma tesoura de íris, e os espermatozoides eram liberados no meio por incubação de 10 min a 37 °C. Uma gota deste material foi diluída na proporção de 1:1 no meio FERT-TALP e depositada sobre uma lâmina e selada a lamínula, pré-aquecida a 37 °C para a avaliação da motilidade espermática, que foi determinada pela porcentagem de espermatozoides moveis após a análise de cinco campos distintos da lâmina. Para a concentração espermática e avaliação morfológica dos espermatozoides, 5 µL da solução espermática foi adicionada a 95 µL de solução formol-salina tamponada. A concentração foi determinada na câmara de Neubauer e a morfologia analisada sob microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x. Para cada amostra,

200 células foram contabilizadas verificando os percentuais de defeitos espermáticos maiores e menores, segundo Blom (1973).

3.6 HISTOLOGIA E AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

Os testículos foram fixados em formol 10% por 10 h, antes de serem cortados transversalmente em três pedaços. Para análise histológica, a porção mediana foi mantida em formol por 72 h, antes de ser transferida para álcool 70% onde permaneceram por 24 h. Decorrido esse tempo, foi iniciada a série de desidratação em concentrações crescente de álcoois (80%, 90% e 100%) por um período de 24 h. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em xilol (duração de 30 min cada) e três vezes em parafina (duração de 1 h cada), antes da inclusão em blocos de parafina. Com a utilização do micrótomo, os blocos de parafina contendo amostras foram submetidos a cortes histológicos de 5 µm de espessura. Os procedimentos padrão de coloração com hematoxilina e eosina (H&E) foram realizadas para coloração das amostras. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 min e duas vezes na água destilada, antes de serem impregnadas com Eosina-Floxina por 45 seg. Esse material foi imediatamente lavado com água destilada, antes de ser desparafinado, desidratado e montado (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Todas as lâminas foram analisadas em fotomicroscópio Axiophoto (Zeiss, D-7082) e as imagens capturadas foram utilizadas para a análise dos parâmetros morfométricos: altura do epitélio do túbulo seminífero, diâmetro do túbulo seminífero e a proporção do compartimento tubular nos testículos. A obtenção da altura do epitélio germinativo e o diâmetro do túbulo seminífero foram realizados com auxílio do *software ImageJ* (Figura 3). Foram selecionados 10 campos microscópicos em cada corte histológico para realização das análises.

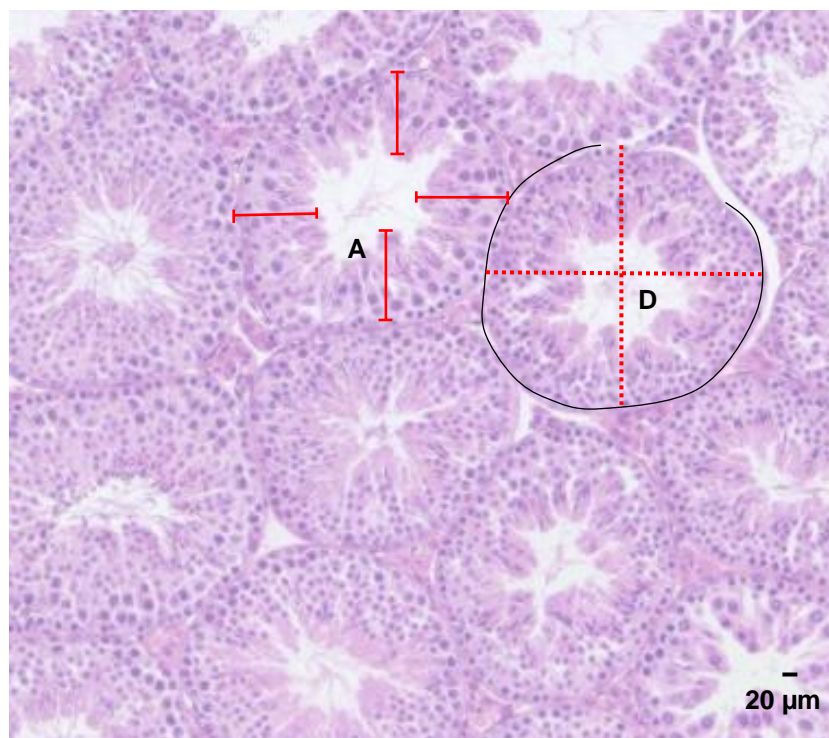


Figura 3: Imagem das medições de altura do epitélio germinativo (A) e diâmetro dos túbulos seminíferos (D).

3.7 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS EMBRIÕES

Após 72 h do acasalamento com fêmeas superovuladas provenientes do grupo controle para avaliação de produção de embriões *in vivo*, foi realizada a coleta de embriões, bem como a classificação destes quanto ao número de estruturas recuperadas e qualidade morfológica. Para a coleta dos embriões, as fêmeas foram eutanasiadas por deslocamento cervical e o trato reprodutivo retirado e colocado em placas de Petri para visualização sob estereomicroscópio. Em seguida, os cornos uterinos foram perfundidos com 0,5 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) adicionado com 0,4% de albumina sérica bovina (BSA). As estruturas recuperadas foram contabilizadas e classificadas quanto ao estágio de desenvolvimento (ZHANG *et al.*, 2009), sendo os embriões nos estágios de mórula e blastocisto considerados como viáveis; e degenerados aqueles com aspecto amorfo, blastômeros mal definidos ou destruídos.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão, com exceção da avaliação espermática, que foram apresentados como média \pm erro. A taxa de prenhez foi analisada pelo teste de qui-quadrado. Os valores do número de

crias nascidas, peso ao nascimento, desenvolvimento somático, concentração espermática, motilidade progressiva, porcentagem de espermatozoides normais e morfometria dos túbulos seminíferos foram testados quanto a normalidade pelo teste Shapiro-wilk, antes de serem submetidos a análise de variância (ANOVA). Posteriormente foram analisados pelo teste Tukey HSD. Os dados da resposta superovulatória: total de estruturas recuperados, embriões viáveis, óocitos não fecundados e embriões degenerados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados com valores $P < 0,05$ foram considerados como diferentes significativamente entre os grupos.

4. RESULTADOS

4.1 TAXA DE PREENHEZ, TAMANHO DA NINHADA E PESO AO NASCIMENTO

Os quatro grupos experimentais constituídos de 10 fêmeas cada, totalizaram a confirmação de gestação em 24 fêmeas (Tabela 1), sendo obtidos 163 filhotes. Não houve diferença entre os grupos experimentais ($P > 0,05$) quanto à taxa de prenhez e número médio de crias nascidas. No entanto, todos os grupos que receberam ET, apresentaram o peso médio ao nascimento das crias inferior ao grupo CONT ($P < 0,0001$). Quando a comparação foi realizada somente entre os grupos estressados termicamente, observou-se que o ET produziu maior efeito na primeira metade da gestação do que na segunda metade, reduzindo ($P < 0,05$) o peso ao nascimento nos grupos EGI e EGT em relação ao grupo EGF.

Tabela 1: Taxa de prenhez, número de crias nascidas e peso ao nascimento da progênie de camundongos fêmeas gestantes C57BL/6 estressadas termicamente.

Variáveis	Grupos			
	CONT	EGI	EGF	EGT
Taxa de prenhez (%)	80 (8/10)	40 (4/10)	60 (6/10)	60 (6/10)
Número de crias	7,0 ± 1,0	6,0 ± 1,5	6,5 ± 1,5	5,1 ± 1,5
Peso ao nascimento (g)	2,2 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,2 ^c	1,8 ± 0,1 ^b	1,2 ± 0,1 ^c

*CONT: controle; EGI: estresse térmico durante a gestação inicial; EGF: estresse térmico durante a gestação final; EGT: estresse térmico durante a gestação total. As letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos.

4.2 DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO

O monitoramento semanal de peso da progênie masculina desde o nascimento até a idade de oito semanas está apresentado na Figura 1. Das 163 crias nascidas, o desenvolvimento somático foi monitorado em 155, dos quais 79 eram machos (50,9% do total) e 76 fêmeas (49,1%). A diferença de peso ao nascimento observada nos grupos que receberam ET se manteve até a quarta semana de idade ($P < 0,05$), sendo os grupos com estresse térmico no início da

gestação mais afetados. Dessa forma, os animais provenientes dos grupos EGI (5,3 ± 0,5 g) e EGT (5,5 ± 0,8 g) também apresentaram menor peso em relação aos grupos EGF (6,4 ± 0,9 g) e grupo CONT (6,3 ± 0,9 g), na primeira semana. Com duas semanas de idade, os grupos EGT (7,1 ± 1,0 g) e EGI (7,5 ± 0,3 g) tiveram peso inferior ao grupo CONT (8,2 ± 0,7 g), sendo o grupo EGT o mais leve (P < 0,01). Posteriormente à quarta semana, não foram mais encontradas diferenças significativas entre os grupos, que apresentaram valores de peso gradativamente homogêneos até a idade adulta. A proporção sexual da progênie não foi diferente (P = 0,56) entre os grupos (CONT = 55,1% machos e 44,9% fêmeas; EGI = 48,8% machos e 51,2% fêmeas; EGF = 47,8% machos e 52,2% fêmeas; EGT = 50% machos e 50% fêmeas). A taxa de sobrevivência da progênie não foi reduzida (CONT= 88,9%; EGI= 90,5%; EGF= 90,9%; EGT= 90%).

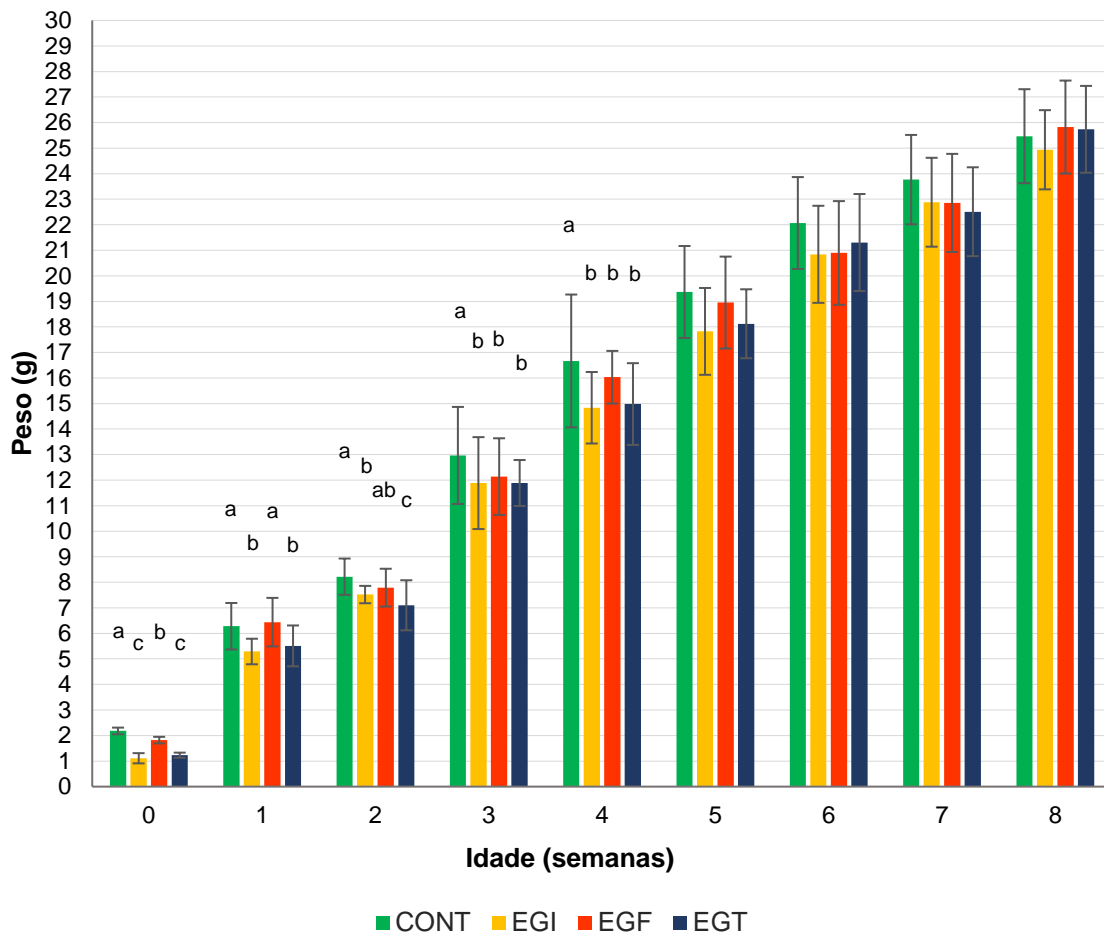


Figura 4: Desenvolvimento somático da progênie masculina de camundongos fêmeas C57BL/6 estressadas termicamente durante a gestação, do nascimento até a oitava semana de idade. *CONT: controle; EGI: estresse térmico durante a gestação inicial; EGF: estresse térmico durante a gestação final; EGT: estresse térmico durante a gestação total. As letras diferentes no mesmo eixo horizontal (idade) indicam diferença estatística (P < 0,05) entre os grupos.

4.3 AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

Na oitava semana de vida, 72 h após o acasalamento com fêmeas controle superovuladas, foram analisados os parâmetros de concentração, motilidade e porcentagem de espermatozoides normais para a avaliação espermática (Tabela 2). A concentração espermática não foi impactada pelo ET, não sendo evidenciada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos, apresentando variação de $1,4 \times 10^6/\text{mL}$ (EGT) a $7,8 \times 10^6/\text{mL}$ (EGF). Da mesma forma, a motilidade espermática progressiva não foi alterada pelo ET, não diferindo entre os grupos, variando entre 22,1% (EGT) e 65 % (CONT). Por fim, também não houve diferença ($P > 0,05$) na porcentagem de espermatozoides normais.

Tabela 2: Avaliação espermática da progênie (F1) masculina com oito semanas de idade, provenientes dos diferentes grupos de estresse térmico induzido durante a gestação em camundongos C57BL/6.

Avaliação espermática	CONT	EGI	EGF	EGT
Concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$)	$4,4 \pm 0,4$	$5,5 \pm 1,7$	$4,3 \pm 1,1$	$5,1 \pm 2,0$
Motilidade espermática (%)	$49,8 \pm 5,3$	$46,4 \pm 6,6$	$52,3 \pm 6,6$	$46,7 \pm 9,6$
Espermatozoides normais (%)	$74,5 \pm 6,2$	$69,3 \pm 5,6$	$61,4 \pm 6,2$	$63,2 \pm 5,2$

*CONT: controle; EGI: estresse térmico durante a gestação inicial; EGF: estresse térmico durante a gestação final; EGT: estresse térmico durante a gestação total. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais.

4.4 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

As lâminas histológicas dos testículos (Figura 5) foram analisadas quanto ao diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e proporção do compartimento tubular por testículo.

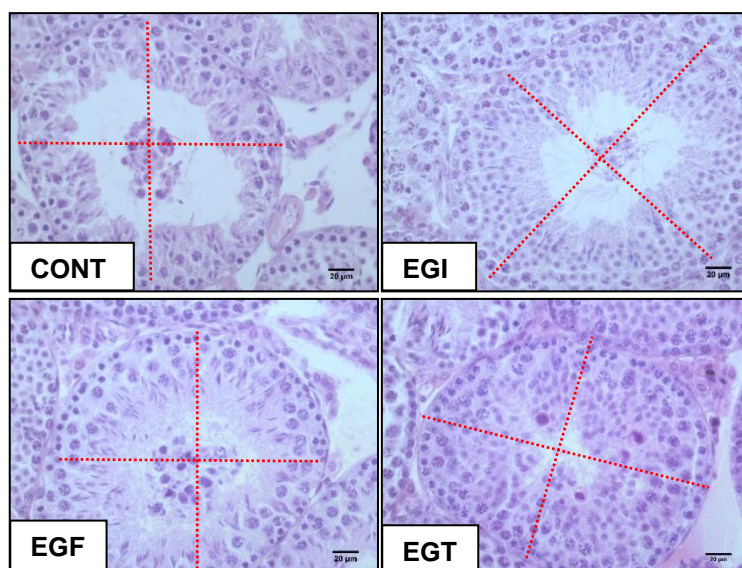


Figura 5: Imagens histológicas dos túbulos seminíferos na avaliação morfométrica. *CONT: controle; EGI: estresse térmico durante a gestação inicial; EGF: estresse térmico durante a gestação final; EGT: estresse térmico durante a gestação total.

Os resultados estão apresentados na tabela 3. O diâmetro dos túbulos seminíferos foi significativamente menor ($P < 0,03$) no grupo EGI em comparação com o grupo CONT, no entanto, sem diferença ($P = 0,99$) no grupo EGT, que também recebeu ET no início da gestação. Quanto à altura do epitélio seminífero, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos, variando entre 28,4 μm (EGI) e 82,4 μm (EGT). Já a proporção volumétrica de compartimento tubular foi significativamente menor ($P < 0,0001$) no grupo EGT em relação grupo CONT, não havendo diferença ($P > 0,05$) nos grupos EGI e EGF.

Tabela 3: Morfometria dos túbulos seminíferos da progênie (F1) masculina de camundongos C57BL/6 dos diferentes grupos de estresse térmico induzido durante a gestação.

Medidas	CONT	EGI	EGF	EGT
Diâmetro de túbulos seminíferos (μm)	199,2 \pm 28,2 ^a	178,1 \pm 41,9 ^b	204,0 \pm 17,1 ^a	197,5 \pm 27,9 ^a
Altura do epitélio seminífero (μm)	60,9 \pm 9,1	55,3 \pm 11,1	57,9 \pm 12,0	59,3 \pm 11,5
Proporção volumétrica de compartimento tubular (%)	89,9 \pm 2,8 ^a	85,6 \pm 5,9 ^a	84,4 \pm 5,8 ^a	71,7 \pm 16,0 ^b

*CONT: controle; EGI: estresse térmico durante a gestação inicial; EGF: estresse térmico durante a gestação final; EGT: estresse térmico durante a gestação total. As letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos.

4.5 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS EMBRIÕES

Após o acasalamento de machos dos diferentes grupos com fêmeas controle superovuladas, foram coletados os embriões para avaliar o efeito do ET sobre a fertilização *in vivo*. Como demonstrado na Tabela 4, não houve diferença ($P > 0,05$) quanto à média do número total de estruturas recuperadas por fêmea, variando entre 1 (EGI) e 37 (CONT). Da mesma forma, não foram evidenciadas diferenças ($P > 0,05$) na quantidade de embriões viáveis, estruturas não fecundadas e número de embriões degenerados por fêmea, entre os grupos.

Tabela 4: Média do número de estruturas recuperadas por fêmea, quando acasaladas com a progênie masculina de camundongos C57BL/6 dos diferentes grupos estressados termicamente durante a gestação.

Variáveis	CONT-F1	EGI-F1	EGF-F1	EGT-F1
Total de estruturas (n)	14,1 ± 3,4	14,5 ± 4,6	11,1 ± 1,3	11,5 ± 2,2
Embriões viáveis mórulas + blastocistos (n)	11,3 ± 2,9	13,7 ± 3,5	9,1 ± 1,5	8,0 ± 2,4
Embriões viáveis mórulas + blastocistos (%)	66,9 ± 0,12	64,9 ± 0,14	78,9 ± 0,0	66,0 ± 0,1
Oócitos não fecundados (n)	1,6 ± 0,6	1,5 ± 0,7	1,4 ± 0,6	1,6 ± 1,2
Oócitos não fecundados (%)	15,9 ± 0,1	5,5 ± 0,0	14,3 ± 0,0	13,6 ± 0,1
Degenerados (n)	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,5 ± 0,3	1,1 ± 0,4
Degenerados (%)	3,9 ± 0,0	4,1 ± 0,0	5,1 ± 0,0	10,4 ± 0,0

*CONT-F1: controle; EGI-F1: estresse térmico durante a gestação inicial; EGF-F1: estresse térmico durante a gestação final; EGT-F1: estresse térmico durante a gestação total.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, o ET induzido em camundongos fêmeas C57BL/6 durante diferentes fases da gestação, apesar do baixo número de animais, parece não ter afetado a taxa de prenhez, apresentando valores dentro da normalidade para a linhagem C57BL/6 de 61% das fêmeas com presença de tampão vaginal (DORSCH *et al.*, 2020). Portanto, estes achados divergem dos estudos que relataram perdas embrionárias e redução na taxa de implantação, possivelmente pelo número de gestantes confirmadas em nosso estudo não ter sido suficiente para demonstrar esta diferença, visto que o ET afeta principalmente os embriões em estágios iniciais, com a expressão de genes que induzem a apoptose (OZAWA *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2015).

Devido ao curto período de gestação nos camundongos (19 - 21 dias), não foi possível identificar se houve diminuição do tempo da gestação, como relatado na espécie bovina, antecipando o parto por cerca de dois dias em relação ao tempo previsto (DADO-SENN *et al.*, 2020). No caso de avaliar o efeito na duração da gestação em camundongos, seria necessário o monitoramento através de câmeras de vídeo noturnas desde o momento da cópula, pois caso haja diferença, esta pode ser de apenas algumas horas ou minutos. Em caso confirmativo desse efeito sobre o tempo de gestação, isto justificaria o menor crescimento e conseqüentemente menor peso ao nascimento dos filhotes.

O número de crias nascidas não diferiu entre os grupos, assim como a porcentagem de machos e fêmeas. Nossos dados corroboram com o estudo realizado por Olivier *et al.* (2020), no qual não foram encontradas diferenças no número de filhotes nascidos, proporção sexual da progênie e na taxa de reabsorção uterina. Outro estudo realizado em porcas, no qual o ET induzido também em câmara térmica ambiental não mostrou diferença no número de fetos nascidos (BERNHARD *et al.*, 2020). Esses resultados demonstram que o ET materno não produziu o mesmo efeito que provoca nas células germinativas de machos adultos, que acasalados com fêmeas não-estressadas resulta em baixa taxa de prenhez, maior porcentagem de espermatozoides Y e filhotes do sexo masculino (WAN *et al.*, 2020a). No presente estudo não foram identificados abortos espontâneos ou malformações fetais nas ninhadas dos diferentes grupos, diferentemente dos achados em estudos prévios com ET induzido em fêmeas de camundongos

gestantes (WEBSTER E EDWARDS, 1984; SHIOTA, 1988; HANDE E VEENA, 1993) e ratas (PADMANABHAN *et al.*, 2005). Nestes estudos, o ET foi realizado por meio de imersão em água quente, em temperaturas variando de 41 a 43 °C, que pode ter agravado ainda mais os efeitos, dificultando a atuação de mecanismos compensatórios para dissipar o calor.

Em contrapartida, o ET produziu efeito negativo no desenvolvimento intrauterino, apresentando redução no peso ao nascimento. Este efeito foi evidenciado em todos os grupos estressados, principalmente nos grupos que receberam ET no início da gestação (EGI e EGT). Os resultados encontrados vão de encontro a outros estudos que demonstraram o efeito pronunciado sobre embriões em estágios iniciais, prejudicando o desenvolvimento embrionário pela redução do número de células do trofotoderma (CHOI *et al.*, 2015). A redução do peso ao nascimento pode estar associada à deficiência nutricional do feto, em decorrência da diminuição do fluxo sanguíneo placentário, que é direcionado para as regiões periféricas do corpo, na tentativa de aumentar a perda de calor sensível (HUBER, 2020). O estudo realizado por Mayvaneh *et al.* (2020), demonstrou que camundongos fêmeas submetidas a temperaturas superiores a 42 °C por 40 min entre os dias 6,5 e 14,5 da gestação, tiveram crias menores e com peso reduzido em relação ao controle. Similarmente, o peso da placenta foi reduzido em temperaturas a partir de 44 °C.

Padmanabhan *et al.* (2005) demonstraram que uma única exposição ao ET em ratas, no nono dia de gestação, além de reduzir o peso ao nascimento, afetou as camadas da placenta. Foram evidenciados fibrose, hialinização e aumento do espessamento da camada decídua basal, aumento de células gigantes multinucleadas e de degeneração nas células de glicogênio da zona basal, com reduzida vascularização para a camada labiríntica. Um estudo desenvolvido por Cheong *et al.* (2016), avaliou o efeito da restrição nutricional fetal no final da gestação em ratas, sugerindo que altas concentrações de corticosterona, devido à baixa eficiência da barreira placentária de glicocorticoides nesta fase, contribuem para o menor peso ao nascimento. Adicionalmente, as fêmeas submetidas ao ET reduzem a ingestão de alimento, que conseqüentemente desacelera a curva de ganho de peso durante a gestação e contribui para a má nutrição do feto (JOHNSON *et al.*, 2015). Em conclusão, é possível que a natureza multifatorial do

ET seja responsável pelo comprometimento do crescimento intrauterino dos animais, sendo mais acentuado na primeira metade da gestação, possivelmente pelo comprometimento da angiogênese placentária.

Embora a redução do peso ao nascimento possa ter ocorrido por deficiência nutricional, a sobrevivência dos filhotes até a idade de desmame não foi comprometida. O desenvolvimento somático após o nascimento não foi impactado, visto que a mesma diferença de peso ao nascimento se manteve estável. Com isso, temos que a produção do leite materno, bem como a sua qualidade, não foram acometidas pelo ET, durante o período gestacional. Há relatos de redução na produção de leite em camundongos fêmeas lactantes submetidas ao ET somente a partir do quinto dia pós-parto, refletindo no baixo ganho de peso dos filhotes (HAN *et al.*, 2019). Em nosso estudo, no entanto, apesar da diferença do peso ao nascimento, o ganho de peso foi similar entre os grupos e, após a idade de desmame, na quinta semana de vida, esta diferença de peso não foi mais observada, mostrando que os animais previamente estressados atingiram peso similar ao grupo controle. Nossos resultados corroboram com estudo em ratas, cuja progênie atingiu o peso normal na idade de desmame (JOHNSON *et al.*, 2015). No entanto, foram divergentes do estudo realizado por Shiota e Kayamura (1989), no qual o peso ao nascimento dos camundongos foi normal e o desenvolvimento somático apresentou redução apenas na quinta semana de idade. Possivelmente esta divergência se deve à forma de indução do ET ter sido por banho-maria a 42 ou 43 °C por apenas 10 min, entre os dias E12 e E15. O que não reduziu o peso ao nascimento, mas afetou o ganho de peso após quatro semanas, e somente na progênie masculina.

Tendo em vista que os animais nascidos dos grupos estressados apresentaram menor peso ao nascimento e posteriormente peso similar ao grupo controle, demonstra-se que os grupos submetidos ao ET apresentaram maior ganho de peso. Para justificar este efeito, nossa hipótese é que tenham ocorrido alterações no metabolismo da progênie, pois estudos relatam que o estresse durante a gestação, incluindo o ET, aumentam a resistência à insulina e a tolerância a glicose nos descendentes (WAN *et al.*, 2020b). Desta forma, como a insulina é um hormônio lipogênico, ou seja, promove o aumento percentual de tecido adiposo, a hiperinsulinemia favoreceria a obesidade futura (JOHNSON *et al.*, 2020;

CHEONG *et al.*, 2016). No entanto, para comprovar esta teoria, seria necessário monitorar o peso dos animais por mais tempo. Esta hipótese é sustentada pelos relatos de Wan *et al.* (2020b), cuja progênie masculina de camundongos submetidos ao ET apresentaram aumento no peso corporal a partir da nona semana de idade.

No presente estudo não foram encontradas diferenças em nenhuma das análises de avaliação espermática dos machos submetidos ao ET pré-natal, indicando que o ET não afetou o desenvolvimento e a produção de células germinativas, bem como a porcentagem de espermatozoides normais. Isto corrobora com o estudo em suínos, realizado por Lugar *et al.* (2018), que não encontraram diferença nos parâmetros de concentração e motilidade espermática, apesar de relatarem maior incidência de anormalidades espermáticas. Estes resultados caracterizam divergência entre o ET pré-natal e o ET pós-natal, pois em machos adultos ocorre subfertilidade temporária causada principalmente por estresse oxidativo e apoptose de espermatócitos e espermátides arredondadas, bem consolidada na literatura (SAILER *et al.*, 1997; ROCKETT *et al.*, 2001; YAERAM *et al.*, 2006; PAUL *et al.*, 2008; PÉREZ-CRESPO *et al.*, 2008; WECHALEKAR *et al.*, 2010; HOUSTON *et al.*, 2018; GIBB *et al.*, 2020; MORELL, 2020; RIZZOTO *et al.*; 2020; WAN *et al.*, 2020a). Com isso, nossos resultados demonstram que as células-tronco conseguiram se desenvolver na presença do ET materno no início da gestação, quando há a ativação do genoma zigótico (SCHULTZ, 1993); e as células germinativas primordiais masculinas ou gonócitos também, a partir da segunda metade da gestação, quando se inicia a diferenciação sexual (MAATOUK E CAPEL, 2008).

Sabe-se que as espermatogônias são as células espermáticas mais resistentes ao ET, e por isso não há a interrupção completa da espermatogênese, sendo restabelecida gradativamente com a melhora da qualidade espermática e redução de apoptoses (HOUSTON *et al.*, 2018), aumentando para os níveis normais a produção de fetos (ROCKETT *et al.*, 2001). Porém, poucos estudos investigam a origem desta característica. Recentemente, um estudo demonstrou que o ET em espermatogônias aumentou a expressão de vários genes relacionados a autofagia, processo no qual a célula degrada as próprias organelas e componentes celulares para a obtenção de energia. Desta forma, a autofagia

aumenta a sobrevivência das células, sendo indicada como um dos mecanismos de resistência das espermatogônias ao ET (QIAO *et al.*, 2021). Além das espermatogônias, a autofagia ocorre em outros tipos celulares, como células de Leydig, de Sertoli e espermatozoides maduros. A autofagia também se mostrou necessária para o correto desenvolvimento embrionário (Moura *et al.*, 2021). Como na gestação as células germinativas estão em estágio anterior de desenvolvimento, é possível que a exposição ao ET ainda na vida fetal, estimule modificações na expressão genética para a citoproteção nas células-tronco germinativas, que dão origem as espermatogônias. Estas alterações também podem ocorrer em células somáticas testiculares, como células imaturas de Leydig, de Sertoli e epididimárias.

Um estudo realizado por Yang *et al.* (2021) utilizando células de Sertoli fetais de suínos, demonstrou que o cultivo *in vitro* em temperatura elevada promoveu diversas alterações imediatas e tardias na expressão gênica, em resposta ao ET (quadro 2). Houve aumento de Hsp90 logo após o ET e a reprogramação do transcriptoma aumentou a expressão da enzima desidrogenase láctica (DHL), que estimulou o aumento da produção de lactato. Assim, as células de Sertoli aumentam a produção de lactato a partir do piruvato pela catalisação de DHL, fornecendo suporte energético para o desenvolvimento das células germinativas. Adicionalmente, como os indivíduos reduzem o consumo de alimento sob o efeito do ET, é possível que a subnutrição tenha contribuído na programação fetal e de desenvolvimento. Estudos recentes de subnutrição materna em ratas gestantes, demonstrou que o aumento na proliferação de espermatogônias estava associado ao aumento da proteína de choque térmico 70 (Hsp70) e dos fatores de transcrição fator neurotrófico derivado de célula glial (GDNF) e ETV5. Estes fatores são produzidos pelas células de Sertoli e regulam a auto-renovação das espermatogônias pela proliferação e produção de proteínas anti-apoptóticas, respectivamente. Logo, o aumento desses fatores promoveu o desequilíbrio da atividade de proteínas pró e anti-apoptóticas, sendo exacerbado pelo aumento de Hsp90, que culminou no aumento de células germinativas (PEDRANA *et al.*, 2021). Dessa forma, nossa hipótese é que tenha ocorrido modificações epigenéticas que possibilitaram a ausência de redução na qualidade espermática dos machos que receberam o ET pré-natal.

Quadro 2: Protocolos experimentais de indução de estresse térmico.

Espécie/sexo	Tipo de Estresse	Temperatura e umidade relativa	Duração	Referência
Camundongos fêmeas após protocolo de superovulação	Câmara térmica	40 °C / 65%	1,5 e 2 h*	(AROYO <i>et al.</i> , 2007)
Camundongos fêmeas após acasalamento	Câmara térmica	35 °C / 60%	12 h* ou 12 h diárias por 3 dias	(OZAWA <i>et al.</i> , 2002; OZAWA <i>et al.</i> , 2003)
			12 h*	(MATSUZUKA <i>et al.</i> , 2005)
		40,5 °C	2 h diárias por 7 dias	(ULLAH <i>et al.</i> , 2019)
		42 °C	2 h diárias até o dia E4,5	(TIAN <i>et al.</i> , 2013)
Zigotos de camundongos após acasalamento	Cultivo <i>in vitro</i> em incubadora	39,5 °C	12 h*	(OZAWA <i>et al.</i> , 2002)
Zigotos de camundongos fertilizados <i>in vitro</i>		39 – 41 °C	8 a 80 h após fertilização	(CHOI <i>et al.</i> , 2015)
Espermatogônias de camundongos adultos		42 °C	90 min*	(QIAO <i>et al.</i> , 2021)
Céls. de Sertoli fetais de suíno		43 °C	0,5 – 6 h	(YANG <i>et al.</i> 2021)
Camundongos fêmeas gestantes	Câmara térmica	34 °C / 18%	12 h diárias entre os dias E8 e E18	(DESAULNIERS <i>et al.</i> , 2016)
		37 °C	8 h diárias entre dias E15,5 e E17,5	(OLIVIER <i>et al.</i> , 2020)
		40 °C	4 h diárias em diferentes momentos da gestação	(KUMAR <i>et al.</i> , 2006)

Camundongos fêmeas gestantes	Câmara térmica	40 – 48 °C	40 min em duas fases (15 + 25 min) diariamente por 5 dias em diferentes momentos da gestação	(MAYVANEH <i>et al.</i> , 2020)
		41,2 °C / 55%	1 h* no dia E14	(LIN <i>et al.</i> , 2019)
	Banho-maria	41 – 43 °C	10 min* no dia E6,5	(HANDE E VEENA, 1993)
		42 °C	15 min no dia E8,5	(SHIOTA, 1988)
		43 °C	9 min no dia E8,5	
		42 °C	10 min duas vezes ao dia entre E12 e E15	(SHIOTA e KAYAMURA, 1989)
		43 °C	10 min diariamente entre E12 e E15	
43 °C	Até T° corporal atingir 43 °C (± 7 min) entre os dias E7 e E9	(WEBSTER e EDWARDS, 1984)		
Camundongos fêmeas lactantes	Câmara térmica	36 °C / 55%	2 h diárias até 13º dia pós-parto	(HAN <i>et al.</i> , 2019)
Ratas gestantes		30 °C no período claro e 34 °C no escuro / 20%	24 h diárias entre os dias E3 e E18	(JOHNSON <i>et al.</i> , 2015)
		41 e 42 °C	1 h* no dia E9	(PADMANABHAN <i>et al.</i> , 2005)
Porcas gestantes		28 a 38 °C / 65 – 88%	8 h diárias por 3 dias	(BERNHARD <i>et al.</i> , 2020)

* Única exposição.

Em relação às alterações na histologia e morfometria testicular decorrentes do ET durante a gestação, um estudo relatou que os fetos masculinos de porcas não apresentaram alterações no número de túbulos seminíferos, na área média de túbulos seminíferos ou no número de células de Sertoli por túbulo. Mas houve redução no número de pré-espermatogônias, sugerindo redução da fertilidade futura (BERNHARD *et al.*, 2020). Em nosso estudo, os animais foram avaliados já na idade adulta e, apesar de não terem sido evidenciadas diferenças na avaliação espermática, o ET materno reduziu o diâmetro dos túbulos seminíferos dos machos do grupo EGI, estressados exclusivamente na primeira metade da gestação. Curiosamente, os machos do grupo EGT não apresentaram redução no diâmetro dos túbulos seminíferos, porém tiveram redução na proporção volumétrica tubular. Estas informações sugerem que tenham ocorrido alterações a partir do dia E11, que possibilitaram o desenvolvimento normal dos túbulos seminíferos quanto ao diâmetro tubular, em detrimento de sua área de compartimento tubular nos testículos. Adicionalmente, o grupo EGF não apresentou diferença em nenhum dos parâmetros avaliados. Este momento da gestação, a partir do dia E11, coincide com o início da diferenciação gonadal, diferenciação das células de Sertoli e de Leydig e, por último, das células mioides peritubulares (MÄKELÄ *et al.*, 2018). Com isso, mais estudos são necessários para compreender a origem de possíveis alterações morfométricas em resposta ao ET nesta fase da organogênese.

Um estudo realizado por Pallarés *et al.* (2013) com ratas submetidas ao estresse por restrição física na última semana de gestação, demonstrou o aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos dos descendentes, associado a uma aceleração na maturação do epitélio seminífero na puberdade. Apesar desta aceleração na maturação, os níveis séricos de testosterona e LH foram reduzidos, enquanto dihidrotestosterona e Diol, que são andrógenos comumente produzidos no testículo imaturo, foram aumentados devido a superexpressão da enzima testicular 5-alfa redutase1. Os autores concluíram que esta aceleração para antecipar a maturidade reprodutiva poderia ser uma estratégia para contornar os efeitos negativos na fertilidade. Em outro estudo realizado com ratos recém-nascidos submetidos a 34 °C por 90 dias, foi demonstrado que o peso da cauda do epidídimo e das glândulas vesícula seminal e próstata foram aumentados, e a histologia não apresentava degeneração epitelial epididimária, como foi observada

nos ratos adultos (KUROWICKA *et al.*, 2015). Isto indica que a exposição ao estresse, incluindo o ET, na fase pré-natal ou logo após o nascimento, produz efeitos compensatórios a fim de minimizar os danos na espermatogênese.

Assim como na avaliação espermática, os resultados da avaliação quantitativa dos embriões produzidos *in vivo* do acasalamento entre fêmeas controle e machos (F1) dos diferentes grupos experimentais, não demonstraram diferença em quaisquer variáveis. Com isso, o ET durante a gestação não foi capaz de comprometer a capacidade de fertilização dos espermatozoides da progênie masculina. Entretanto, não podemos descartar possíveis efeitos epigenéticos do ET, através da alteração no perfil de pequenos RNA não codificantes (pRNAnc) dos espermatozoides. Evidências recentes sugerem que o estresse no geral, pode alterar o perfil de pRNAnc espermático comprometendo assim o desenvolvimento embrionário e/ou a saúde dos descendentes (SHARMA *et al.*, 2016; NÄTT *et al.*, 2019). Sendo assim, mais estudos transgeracionais são necessários para avaliar a taxa de implantação, a embriogênese e possíveis alterações nos fetos, através de análise de expressão gênica, medições de acompanhamento de peso e comprimento, análise hormonal e bioquímica sérica, para o mapeamento completo e detalhado das possíveis alterações negativas e/ou adaptativas de susceptibilidade ou resistência ao ET.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÕES

Conclui-se que o ET durante a gestação não afeta a proporção sexual da progênie, reduz o peso ao nascimento e o diâmetro tubular ou a proporção volumétrica de compartimento tubular, porém não compromete a fertilidade da progênie masculina. O ET gestacional afeta principalmente a progênie dos grupos submetidos ao ET durante a primeira metade da gestação de camundongos.

6.2 PERSPECTIVAS

Os problemas gerados pelas mudanças climáticas englobam diversos fatores, dentre eles, a adaptação dos mamíferos. Considerando as projeções de elevação da temperatura, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos transgeracionais para compreensão do efeito do ET nas sucessivas gerações. Nesse sentido, análises biomoleculares e endócrinas, como expressão gênica e análise hormonal, seriam fundamentais para a identificação de possíveis mecanismos fisiológicos de adaptação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albouy C, Delattre V, Donati G, Frölicher TL, Albouy-Boyer S, Rufino M, Pellissier L, Mouillot D, Leprieur F. Global vulnerability of marine mammals to global warming. *Scientific Reports*. 2020; 10(548): 1-12.

Aroyo A, Yavin S, Arav A, Roth Z. Maternal hyperthermia disrupts developmental competence of follicle-enclosed oocytes: In vivo and ex vivo studies in mice. *Theriogenology*. 2007; 67(5): 1013-21.

Baena M, Costa AC, Vieira GR, Rocha RFB, Ribeiro ARB, Guaratinilbelli AM, Meirelles SLC. Heat tolerance responses in a *Bos taurus* cattle herd raised in a Brazilian climate. *Journal of Thermal Biology*. 2019; 81: 162-9.

Bakker J. Sexual differentiation of the neuroendocrine mechanisms regulating mate recognition in mammals. *Journal of Neuroendocrinology*. 2003; 15(6): 615-21.

Baruselli PS, Ferreira RM, Vieira LM, Souza AH, Bó GA, Rodrigues CA. Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology*. 2020; 155: 1-11.

Batista RITP, Viana SW, Pinto ISB, Maffili VV, Viana JHM. Somatic development and embryo yield in crossbred F1 mice generated by different mating strategies. *Brazilian Journal Biology*. 2010; 70(1):145-9.

Bellvé AR. Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods in Enzymology*. 1993; 225: 84-113.

Bernhard CJ, Sharp KG, Safranski TJ, Lamberson WR, Lucy MC. Reproduction and reproductive tract morphology of male and female pigs whose mothers were heat stressed during the second month of gestation. *Journal of Animal Science*. 2020; 98(11) 2020.

Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med.* 1973; 25: 383-391.

Boyd KL, Muehlenbachs A. Female Reproductive System. *In: Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. Comparative Anatomy and Histology: a Mouse, Rat and Human Atlas.* 2 ed. Seattle: Elsevier Inc. 2018. cap. 17, p. 303 - 334.

Byers SL, Payson SJ, Taft RA. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology.* 2006; 65(9): 1716-26.

Cammack KM, Antoniou E, Hearne L, Lamberson WR. Testicular gene expression in male mice divergent for fertility after heat stress. *Theriogenology.* 2009; 71(4): 651-61.

Cheong JN, Cuffe JSM, Jefferies AJ, Anevskaja K, Moritz KM, Wlodek ME. Sex-Specific Metabolic Outcomes in Offspring of Female Rats Born Small or Exposed to Stress During Pregnancy. *Endocrinology.* 2016; 157(11): 4104-20.

Choi I, Dasari A, Kim N, Campbell KHS. Effects of prolonged exposure of mouse embryos to elevated temperatures on embryonic developmental competence. *Reproductive BioMedicine Online.* 2015; 31(2): 171-9.

Costa GMJ, Lacerda SMSN, Figueiredo AFA, Leal MC, Rezende-Neto JV, França LR. Higher environmental temperatures promote acceleration of spermatogenesis in vivo in mice (*Mus musculus*). *Journal of Thermal Biology.* 2018; 77: 14-23.

Currer JM *et al.* Characteristics of Popular Strains of JAX[®] Mice, Including Reproductive Performance. *In: The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice.* 6 ed. Bar Harbor: JAX, 2009, cap. 4, p. 77-148. Disponível em: <<http://resources.jax.org/misc/jax-handbook-genetically-standardized-mice>>. Acesso em: 15 de setembro de 2021.

Dado-Senn B, Laporta J, Dahl GE. Carry over effects of late-gestational heat stress on dairy cattle progeny. *Theriogenology.* 2020; 154: 17-23.

Desaulniers AT, Lamberson WR, Safranski TJ. Prenatal heat stress reduces male anogenital distance at birth and adult testis size, which are rescued by concurrent maternal *Artemisia absinthium* consumption. *Journal of Thermal Biology*. 2016; 57: 84-91.

Dorsch M, Wittur I, Garrels W. Efficiency of timed pregnancies in C57BL/6 and BALB/c mice by mating one male with up to four females. *Laboratory Animals Limited*. 2020; 54(5): 1-8.

Ealy AD, Hansen PJ. Induced thermotolerance during early development of murine and bovine embryos. *Journal of Cellular Physiology*. 1994; 160(3): 463-8.

Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res*. 2018; 29: 207-14.

Fischer AW, Cannon B, Nedergaard J. Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: An experimental study. *Mol Metab*. 2018; 7: 161–70.

Gaughan JB, Mader TL, Holt SM, Sullivan ML, Hahn GL. Assessing the heat tolerance of 17 beef cattle genotypes. *International Journal of Biometeorology*. 2010; 54(6): 617-27.

Gibb Z, Griffin RA, Aitken RJ, De Luliis GN. Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility. *Animal Reproduction Science*. 2020; 220: 106456.

Gordon CJ. Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. *Journal of Thermal Biology*. 2012; 37: 654–85.

Grazer VM, Martin OY. Investigating climate change and reproduction: Experimental tools from evolutionary biology. *Biology*. 2012; 1: 411-38.

Han J, Shao J, Chen Q, Sun H, Guan L, Li Y, Liu J, Liu H. Transcriptional changes in the hypothalamus, pituitary and mammary gland underlying decreased lactation performance in mice under heat stress. *The FASEB Journal*. 2019; 33(11): 12588-601.

Hande MP, Veena K. Teratogenic effect of hyperthermia during early organogenesis period in mice. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1993; 13(3): 145-50.

Hansen PJ. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009; 364(1534): 3341-50.

Hansen PJ. Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted reproduction. *Anim. Reprod*. 2019; 16(3): 497-507.

Hoffmann I. Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*. 41(SUPPL. 1): 32-46.

Houston BJ, Nixon B, Martin JH, De Iuliis GN, Trigg NA, Bromfield EG, McEwan KE, Aitken RJ. Heat exposure induces oxidative stress and DNA damage in the male germ line. *Biol. Reprod*. 2018; 98(4): 593-06.

Huber E, Notaro US, Recce S, Rodríguez FM, Ortega HH, Salvetti NR, Rey F. Fetal programming in dairy cows: Effect of heat stress on progeny fertility and associations with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions. *Animal Reproduction Science*. 2020; 216:106348.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). *Climate Change 2014: Synthesis Report*. IPCC, Geneva, Suíça, 151 p.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). *Global warming of 1.5 °C: Special Report 2018*. IPCC, Geneva, Suíça, 32 p.

Johnson JS, Stewart KR, Safranski TJ, Ross JW, Baumgard LH. In utero heat stress alters postnatal phenotypes in swine. *Theriogenology*. 2020; 154: 110-9.

Johnson JS, Abuajamieh M, Fernandez MVS, Seibert JT, Stoakes SK, Keating AF, Ross JW, Selsby JT, Rhoads RP, Baumgard LH. The impact of in utero heat stress and nutrient restriction on progeny body composition. *Journal of Thermal Biology*. 2015; 53: 143-50.

Junqueira L, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Editora Santos; 1983. 123 p.

Junqueira L, Carneiro J. Histologia básica. 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 524 p.

King Y, Lin C, Lin J, Lee W. Whole-body hyperthermia-induced thermotolerance is associated with the induction of Heat Shock Protein 70 in mice. *The Journal of Experimental Biology*. 2002; 205: 273-8.

Knoblauch SE, True L, Tretiakova M, Hukkanen RR. Male Reproductive System. In: Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. *Comparative Anatomy and Histology: a Mouse, Rat and Human Atlas*. 2 ed. Seattle: Elsevier Inc. 2018. cap. 18, p. 335–362.

Kolbe T, Landsberger A, Manz S, Na E, Urban I, Michel G. Productivity of superovulated C57BL/6J oocyte donors at different ages. *Lab Animal*. 2015; 44(9): 346-9.

Kumar P, Rathore B, Saxena AK, Purohit DC, Mathur N, Paul BN. Role of TNF- α in prenatal alterations in dams of mice under thermal stress. *Laboratory Animals*. 2006; 40(2): 172-9.

Kurowicka B, Dietrich GJ, Kotwica G. Effect of neonatal or adult heat acclimation on testicular and epididymal morphometry and sperm production in rats. *Reprod Biol*. 2015; 15(1):1-8.

Lara NLM, Costa GMJ, Avelar GF, Lacerda SMSN. Testis Physiology—Overview and Histology. In: SKINNER, Michael K. *Encyclopedia of Reproduction*. 2 ed. Elsevier, p. 105-116, 2018.

Li Z, Tian J, Cui G, Wang M, Yu D. Effects of local testicular heat treatment on Leydig cell hyperplasia and testosterone biosynthesis in rat testes. *Reproduction, Fertility and Development*. 2015; 28(9): 1424-32.

Lin C, Chen S, Chang C, Lin K. Hypothalamic impairment underlying heat intolerance in pregnant mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2019; 492: 110439.

Lugar DW, Proctor JA, Safranski TJ, Lucy MC, Stewart KR. In utero heat stress causes reduced testicular area at puberty, reduced total sperm production, and increased sperm abnormalities in boars. *Anim Reprod Sci*. 2018; 192:126-35.

Maatouk DM, Capel B. Sexual Development of the Soma in the Mouse. *Current Topics in Developmental Biology*. 2008; 83: 151-83.

Mäkelä J, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. *Endocrine reviews*. 2018; 40(4): 857-905.

Matsuzuka T, Ozawa M, Nakamura A, Ushitani A, Hirabayashi M, Kanai Y. Effects of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. *Journal of Reproduction and Development*. 2005; 51(2): 281-7.

Mayvaneh F, Enterazi A, Sadeghifar F, Baaghideh M, Guo Y, Atabati A, Zhao O, Zhang Y. Exposure to suboptimal ambient temperature during specific gestational periods and adverse outcomes in mice. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020; 27(36): 45487-98.

Mccarthy M. How to Study the Origins of Sex Differences in Brain and behavior. *In: Sex Differences in the Brain: Balancing Sex in Preclinical Research*. (Becker J, Tollkuhn J, eds). Washington, DC: Society for Neuroscience, 2018, p. 29-35.

Mcmanus CM, Faria DA, Lucci CM, Louvandini H, Pereira SA, Paiva SR. Heat stress effects on sheep: Are hair sheep more heat resistant? *Theriogenology*. 2020; 155: 157-67.

Meek LR, Dittel PL, Sheehan MC, Chan JY, Kjolhaug SR. Effects of stress during pregnancy on maternal behavior in mice. *Physiology and Behavior*. 2001; 72(4): 473-9.

Molnár PK, Derocher AE, Thiemann GW, Lewis MA. Predicting survival, reproduction and abundance of polar bears under climate change. *Biological Conservation*. 2010; 143: 1612-22.

Morell J. Heat stress and bull fertility. *Theriogenology*. 2020; 153: 62-7.

Moura MT, Latorraca LB, Paula-Lopes FF. Contextualizing Autophagy during Gametogenesis and Preimplantation Embryonic Development. *International Journal of Molecular Science*. 2021; 22(12): 6313.

Nakata H, Wakayama T, Sonomura T, Honma S, Hatta T, Iseki S. Three-dimensional structure of seminiferous tubules in the adult mouse. *Journal of Anatomy*. 2015; 227: 686-94.

Nardone A, Ronchi B, Lacetera N, Ranieri MS, Bernabucci U. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livestock Science*. 2010; 130: 57–69.

Nätt D, Kugelberg U, Casas E, Nedstrand E, Zalavary S, Henriksson P, Nijm C, Jäderquist J, Sandborg J, Flinke E, Ramesh R, Örkenby L, Appelkvist F, Lingg T, Guzzi N, Bellodi C, Löf M, Vavouri T, Öst A. Human sperm displays rapid responses to diet. *PLoS Biol*. 2019; 17(12): e3000559.

Oliveira CFA, Lara NLM, Cardoso BRL, França LR, Avelar GF. Comparative testis structure and function in three representative mice strains. *Cell Tissue Research*. 2020; 382(2): 391-404.

Olivier K, Reinders LA, Clarke MW, Crew RC, Pereira G, Maloney SK, Wyrwoll CS. Maternal, Placental, and Fetal Responses to Intermittent Heat Exposure During Late Gestation in Mice. *Reproductive Science*. 2020; 28(2): 416-25.

Ozawa M, Hirabayashi M, Kanai, Y. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. *Reproduction*. 2002; 124(5): 683–9.

Ozawa M, Yamasaki Y, Hirabayashi M, Kanai Y. Viability of maternally heat-stressed mouse zygotes in vivo and in vitro. *Animal Science Journal*. 2003; 74:181-5.

Padhi A, Ghaly M, Ma L. Testis-enriched heat shock protein A2 (HSPA2): Adaptive advantages of the birds with internal testes over the mammals with testicular descent. *Scientific Reports*. 2016; 6: 1-7.

Padmanabhan R, Al-Menhali NM, Ahmed I, Kataya HH, Ayoub MA. Histological, histochemical and electron microscopic changes of the placenta induced by maternal exposure to hyperthermia in the rat. *International Journal of Hyperthermia*. 2005; 21(1): 29-44.

Pallarés ME, Adrover E, Baier CJ, Bourguignon NS, Monteleone MC, Brocco MA, González-Calvar SI, Antonelli MC. Prenatal maternal restraint stress exposure alters the reproductive hormone profile and testis development of the rat male offspring. *Stress*. 2013; 16(4):429-40.

Pankhurst N, Munday P. Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Marine and Freshwater Research*. 2011; 62(9): 1015-26.

Paul C, Murray AA, Spears N, Saunders PTK. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*. 2008; 136(1): 73-84.

Pedrana G, Larrañaga C, Diaz A, Viotti H, Lombide P, Cavestany D, Vickers MH, Martin GB, Sloboda DM. Maternal undernutrition during pregnancy and lactation increases transcription factors, ETV5 and GDNF, and alters regulation of apoptosis and heat shock proteins in the testis of adult offspring in the rat. *Reproduction, Fertility and Development*. 2021; 33(7): 484-96.

Pérez-Crespo M, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Scrotal Heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development*. 2008; 75: 40-7.

Qiao N, Chen H, Du P, Kang Z, Pang C, Liu B, Zeng Q, Pan J, Zhang H, Mehmood K, Tang Z, Li Y. Acetyl-L-Carnitine Induces Autophagy to Promote Mouse

Spermatogonia Cell Recovery after Heat Stress Damage. *BioMed Research International*. 2021; 2021: 8871328.

Rahman MB, Schellander L, Luceño NL, Soom AV. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. *Theriogenology*. 2018; 118: 102-12.

Rand M. Selection of Biomedical Animal Models. *In: Conn PM. Sourcebook of Models for Biomedical Research*. New Jersey: Humana Press, 2008, cap 2, p. 09-14.

Rizzoto G, Boe-Hansen, Klein C, Thundathil JC, Kastelic JP. Acute mild heat stress alters gene expression in testes and reduces sperm quality in mice. *Theriogenology*. 2020; 158:375-81.

Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ. Effects of Hyperthermia on Spermatogenesis, Apoptosis, Gene Expression, and Fertility in Adult Male Mice¹. *Biology of Reproduction*. 2001; 65(1): 229-39.

Ross JW, Hale BJ, Gabler NK, Rhoads RP, Keating AF, Baumgard L H. Physiological consequences of heat stress in pigs. *Animal Production Science*. 2015; 55(11-12): 1381-90.

Roth, Z. Reproductive physiology and endocrinology responses of cows exposed to environmental heat stress - Experiences from the past and lessons for the present. *Theriogenology*. 2020; 155:150-6.

Roy IL, Tordjman S, Migliore-Samour D, Degrelle H, Roubertoux PL. Genetic architecture of testis and seminal vesicle weights in mice. *Genetics*. 2001; 158(1): 333-40.

Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J. Androl*. 1997; 18(3): 294-301.

Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays*. 1993; 15(8): 531-8.

Schulze M, Jakop U, Jung M, Cabezón F. Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. *Theriogenology*. 2019; 127: 15-20.

Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, Belleannee C, Kucukural A, Serra RW, Sun F, Song L, Carone BR, Ricci EP, Li XZ, Fauquier L, Moore MJ, Sullivan R, Mello CC, Garber M, Rando OJ. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*. 2016; 351(6271): 391-6.

Shima Y, Morohashi K. Leydig progenitor cells in fetal testis. *Mol Cell Endocrinol*. 2017; 445: 55-64.

Shiota K. Induction of neural tube defects and skeletal malformations in mice following brief hyperthermia in utero. *Biol Neonate*. 1988; 53(2): 86-97.

Shiota K, Kayamura T. Effects of prenatal heat stress on postnatal growth, behavior and learning capacity in mice. *Biol Neonate*. 1989; 56(1): 6-14.

Škop V, Guo J, Liu N, Xiao C, Hall KD, Gavrilova O, Reitman ML. Mouse Thermoregulation: Introducing the Concept of the Thermoneutral Point. *Cell Rep*. 2020; 31: 107501.

Spangenberg EMF, Wallenbeck A, Eklöf A-C, Carlstedt-Duke J, Tjäder. Housing breeding mice in three different IVC systems: Maternal performance and pup development. *Laboratory Animals*. 2014; 48(3): 193-206.

Tao S, Rivas RMO, Marins TN, Chen Y, Gao J, Bernard JK. Impact of heat stress on lactational performance of dairy cows. *Theriogenology*. 2020; 150: 437-44.

The Jackson Laboratory. Body Weight Information for C57BL/6J. Disponível em: <<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664>>. Acesso em: 30 de agosto de 2021.

Tian J, Zhong Y, Liu L, Guo K, Cao Y, Shi Y, Zhang C, Jia Z, Liu F, Gao J. The effective mechanism of heat stress on mouse embryo implantation. *Advanced Materials Research*. 2013; 749: 309-17.

Ullah S, Zhang M, Yu H, Mustafa S, Shafiq M, Wei Q, Wang W, Jan M, Mao D. Heat exposure affected the reproductive performance of pregnant mice: Enhancement of autophagy and alteration of subcellular structure in the corpus luteum. *Reproductive Biology*. 2019; 19(3): 261-9.

Vandenbergh, J. The House Mouse in Biomedical Research. In: CONN, P. Michael. *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. New Jersey: Humana Press. 2008, cap. 21, p. 187-9.

Wan X, He X, Liu Q, Duan P, Li H. Frequent and mild scrotal heat stress impairs embryo development, implantation and offspring sex ratio in mice. *Reproductive BioMedicine Online*. 2020a; 40(5): 617-26.

Wan X, He X, Liu Q, Wang XT, Ding X, Li H. Frequent and mild scrotal heat stress in mice epigenetically alters glucose metabolism in the male offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020b; 319:E291-E304.

Wang S, Cheng C, Tang P, Chen C, Chen H, Lee Y, Huang S. Acute heat stress induces differential gene expressions in the testes of a broiler-type strain of Taiwan country chickens. *Plos One*. 2015; 10(5): 1-14.

Webster WS, Edwards MJ. Hyperthermia and the Induction of Neural Tube Defects in Mice. *Teratology*. 1984; 29(3): 417-25.

Wechalekar H, Setchell BP, Peirce EJ, Ricci M, Leigh C, Breed WG. Whole-body heat exposure induces membrane changes in spermatozoa from the cauda epididymidis of laboratory mice. *Asian Journal of Andrology*. 2010; 12: 591-8.

Wildt S, Brooks A, Russel R. Rodent Genetics, Models and Genotyping Methods. In: CONN, P. Michael. *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. New Jersey: Humana Press, 2008, cap. 20, p. 179-184.

Yaeram J, Setchell B P, Maddocks S. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*. 2006; 18(6): 647-53.

Yang C, Chen L, Yang Y, Mou Q, Du Z. Acute heat stress reduces viability but increases lactate secretion of porcine immature Sertoli cells through transcriptome reprogramming. *Theriogenology*. 2021; 173: 183-92.

Yin F, Chen Z, Li Z, Tang J. Influence of acute heat stress on the development of GABAergic neurons in HPA-axes of mouse embryos. *Journal of Thermal Biology*. 2011; 36(8): 486-91.

Zaprjanova S, Rashev P, Zasheva D, Martinova Y, Mollova M. Electrophoretic and immunocytochemical analysis of Hsp72 and Hsp73 expression in heat-stressed mouse testis and epididymis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2013; 168(1): 54-9.

Zhang J, Cui J, Ling X, Li X, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ. Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method. *J Assist Reprod Genet*. 2009; 26: 621–8.

Zhu B, Setchell B. Effects of paternal heat stress on the in vivo development of preimplantation embryos in the mouse. *Reprod. Nutr. Dev*. 2004; 44: 617-29.

8. APÊNDICES E ANEXOS

8.1 APÊNDICES

8.1.1 APÊNDICE 1 – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO ORAL DE RESUMO EM EVENTO



International Embryo Technology Society

1800 South Oak Street, Suite 100

Champaign, IL 61820 USA

Phone: (217) 398-4697, FAX: (217) 398-4119

E-mail: iets@assoqh.org, Web Site: <http://www.iets.org>

2020 Board of Governors

Paucile Chavatto-Palmer, DVM, PhD, HDR

President

UMR BREED
Biology of Reproduction, Environment,
Epigenetics and Development
Domaine De Vilvert, BH 230
78350 Jouy en Josas
France

Cesare Galli, DVM

Vice President

AVANTRA
Via Pozzobonco 7F
Cremona, 26100
Italy

Pierre Comizzoli, DVM, PhD

Treasurer

Smithsonian Institution
3001 Connecticut Ave. NW
National Zoological Park
Washington, DC 20008-2537

Hanns Grothmann, DVM, PhD

Governor

Mastermind GmbH
Es-Station Nuchel 1
27612 Loxstedt
Germany

Charles F. Rosenkranz, Jr., MS, PhD

Governor

Clemson University
Dept. of Animal and Veterinary Sciences
130 Poole Agricultural Center
Clemson, SC 29634-0511

Marc-Antoine Sirard, DVM, PhD

Governor

Université Laval
2425, rue de l'Agriculture
Québec, QC, G1V 0A6
Canada

Lotte Bjoerg Stebbach, DVM, PhD

Governor

Embryo Trans Biotech
Søndermarksvej 2
Hørsholm, 03390
Denmark

Xinchun (Cindy) Tian, MS, PhD

Governor

University of Connecticut
1390 Storm Rd. #U4163
Storrs Mansfield, CT 06269-4163

To Whom It May Concern:

This is to certify that Tays Freitas Bento was registered for the 2021 IETS Virtual meeting of the International Embryo Technology Society that was held on January 18-21, 2021. The program consisted of 151 pre-recorded abstract presentations, both poster and oral. The posters are expansions of contributed abstracts based on original, unpublished data. The platform presentations consist of nine invited papers, six expanded presentations of meritorious abstracts, and two panel discussion sessions. Both the abstracts and the invited papers have been subjected to rigorous peer review and are published in the January 2021 issue of *Reproduction, Fertility and Development*.

Tays Freitas Bento presented the following abstract in oral/poster presentation.

#5 Heat stress during pregnancy compromises development and reproductive parameters of female progeny in C57BL/6J mice

Sincerely,
Debi Seymour

Executive Secretary

8.2 ANEXOS

8.2.1 ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Diamantina, 14 de março de 2018

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

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

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

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

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

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

Campus JK
Comissão de Ética no Uso de Animais UFVJM
Prédio da Retitoria-PRPPG-Rodovia MG-1367 - Km 583, nº 5000m/Alto da Jacuba -
Diamantina/MG - CEP 39100-000 Telefone: +55 (38) 3532-1200

CEUA Comissão de Ética
no Uso de Animais