



## Impacto do estresse térmico na maturação oocitária *in vitro* em bovinos: uma revisão

*Impact of heat stress on oocyte in vitro maturation in bovine: a review*

V.M. Paes<sup>1</sup>, L.A. Vieira, J.R. Figueiredo

Laboratório de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais (Lamofopa),  
Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>1</sup>Correspondência: [macedovictor\\_ef@yahoo.com.br](mailto:macedovictor_ef@yahoo.com.br)

### Resumo

O estresse térmico, que ocorre nos meses mais quentes do ano, é a principal causa da redução da fertilidade em mamíferos nesse período. Pode ser ocasionado por respostas indiretas com efeitos sistêmicos, bem como por respostas locais nas células ovarianas. Estudos têm demonstrado uma sensibilidade dos oócitos bovinos crescidos *in vivo* ao estresse térmico, culminando com efeitos negativos na maturação tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Os efeitos negativos mais observados são: aumento nas taxas de apoptose e de espécies reativas de oxigênio, alterações na produção hormonal e redução nas taxas de oócitos que alcançam o estágio de metáfase II *in vitro*. A presente revisão tem como propósito abordar os principais aspectos relacionados ao impacto do estresse térmico em oócitos bovinos.

**Palavras-chave:** apoptose, bovino, estresse oxidativo, estresse térmico, oócito.

### Abstract

*During the summer period, heat stress is the main cause of infertility in mammals. Heat stress can be caused by indirect responses with systemic effects, as well as local responses in ovarian cells. Studies have shown a sensitivity of oocytes grown in vivo to heat stress, culminating with negative effects on in vivo and in vitro maturation. The most common negative effects of heat stress are: increasing the apoptotic rate and reactive oxygen species production, altering the hormone production, and reducing the number of oocytes that reach metaphase II stage in vitro. This review addressed some important aspects related to the impact of heat stress in cattle oocytes.*

**Keywords:** apoptosis, bovine, heat stress, oocyte, oxidative stress.

### Introdução

O estresse térmico que ocorre nos meses mais quentes do ano é a principal causa da redução da fertilidade em mamíferos nesse período (Dobson e Smith, 2000), em especial, na espécie bovina (Gendelman e Roth, 2012). Tal fenômeno pode ser ocasionado por respostas indiretas com efeitos sistêmicos, alterando a taxa de perfusão vascular no ovário, bem como por respostas locais nas células ovarianas, com destaque para o comprometimento da maturação do oócito (Wise et al., 1988).

Estudos anteriores vêm demonstrando que os oócitos bovinos crescidos *in vivo* são sensíveis ao estresse térmico, que pode ocasionar efeitos negativos na maturação tanto *in vivo* (Gendelman e Roth, 2012) quanto *in vitro* (Nabenishi et al., 2011). Dentre esses efeitos negativos destacam-se: aumento nas taxas de apoptose e de espécies reativas de oxigênio (EROs; Nabenishi et al., 2011); alterações na produção de progesterona (Rispoli et al., 2013), bem como redução nas taxas de oócitos que alcançaram o estágio de metáfase II (MII) *in vitro* (Nabenishi et al., 2011; Maya-Soriano et al., 2012). Por outro lado, Payton et al. (2011) observaram um aumento na expressão das proteínas de choque térmico (HSP), quando complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram submetidos a elevadas temperaturas durante a maturação *in vitro* (MIV). HSP são proteínas extremamente importantes, que desempenham um papel chave na sobrevivência celular, modulando as vias da apoptose ante o estresse térmico (Castro et al., 2013).

Tendo em vista a gama de respostas oriundas do estresse térmico que reduzem as taxas de maturação oocitária, este trabalho irá abordar alguns aspectos importantes relacionados ao impacto do estresse térmico em oócitos de bovinos.

### Maturação oocitária

A maturação oocitária compreende uma sequência complexa de eventos nucleares, citoplasmáticos e moleculares. Esse evento ocorre devido a várias modificações estruturais e moleculares no citoplasma, que, por sua vez, culminam com o oócito em MII, apto a ser fecundado (Sirard, 2001).

No início da maturação oocitária, o oócito está com os cromossomos descondensados e envolto por uma membrana nuclear íntegra, caracterizando a vesícula germinativa (VG). Quando os oócitos são cultivados *in vitro*, estes são capazes de retomar a meiose de forma espontânea (Pincus e Enzmann, 1935). O rompimento da VG é o primeiro sinal de retomada da meiose (Anas et al., 2000). Posteriormente à retomada da meiose, o oócito alcança a fase de metáfase I, agora com a formação de uma placa metafásica no citoplasma. Por fim, ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Essa fase é caracterizada como o oócito em MII (maturação nuclear) (Edwards et al., 2005).

A maturação citoplasmática é considerada um conjunto de eventos em que o oócito torna-se capaz de ser fecundado e assegurar um desenvolvimento embrionário inicial normal. Esse processo se dá por uma redistribuição das organelas, que ocorre no citoplasma do oócito e se inicia no estágio de VG, culminando com o oócito em MII (Mao et al., 2014). A maturação molecular, por sua vez, compreende a fase de transcrição, armazenamento e processamento de RNAm (Crocomo et al., 2013). O controle celular observado durante a progressão meiótica do oócito do estágio de VG para MII é realizado por meio de diversas sinalizações celulares, que envolvem a interação de vários genes. Dessa forma, o desenvolvimento do oócito depende dos transcritos maternos que foram armazenados no seu citoplasma (Paynton et al., 1988), ou ainda da passagem desses transcritos das células somáticas circundantes para o oócito por meio das junções “gap” (Assou et al., 2013). Alterações temporais nos transcritos presentes no oócito no decorrer da progressão meiótica podem ser devido à presença de micro RNAs (Tesfaye et al., 2009). Os micro-RNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que regulam a expressão gênica pós-transcricional (Hutvagner et al., 2002). Gilchrist et al. (2016) observaram ausência de alguns micro-RNAs em oócitos em estágio VG, porém presentes em oócitos em MII, indicando transcrição durante a maturação oocitária em bovinos.

### Esteroidogênese

A esteroidogênese ovariana ocorre por meio da interação de duas células que compõem o folículo ovariano (células da teca e da granulosa), as quais tem a capacidade de biossíntese de esteroides (Hickey et al., 2005).

A produção de progesterona (P4) é feita mediante a conversão de pregnenolona em P4 por meio da enzima 3 $\beta$ -hidroxidesidrogenase (3 $\beta$ HSD) nas células da teca. A P4 sintetizada pode atuar como substrato na produção de androstenediona, que, por sua vez, pode ser convertida em testosterona. Este hormônio tem a capacidade de adentrar nas células da granulosa, onde a enzima aromatase, sob influência do hormônio folículo estimulante (FSH), converte a testosterona em estradiol (E2; Lima-Verde et al., 2011).

Durante a MIV, é observada uma redução dos níveis de E2 concomitante ao aumento de P4. Tal fato pode ser explicado por uma redução e um aumento na expressão de RNAm para as enzimas aromatase e 3 $\beta$ HSD, respectivamente (Lima-Verde et al., 2011). Por outro lado, quando os CCOs estão sob estresse térmico durante a MIV, ocorre tanto uma queda na síntese de E2 quanto um aumento substancial dos níveis de P4 (Rispoli et al., 2013; Paes et al., 2016). A redução de E2 pode ser explicada por uma baixa expressão de RNAm para caveolina, que tem um papel chave na transdução de sinal de muitos fatores (Ceresa e Schimidt, 2000), como, por exemplo, o FSH (McKenize e Cohen, 2009). Já o aumento de P4 pode ser devido a um aumento na expressão de RNAm para as enzimas CYP11A1 e 3 $\beta$ HSD, que são envolvidas na conversão de colesterol para pregnenolona e pregnenolona para progesterona, respectivamente (Rispoli et al., 2013).

### Estresse oxidativo

As EROs são importantes segundo mensageiros, podendo atuar na regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox. Entretanto, em concentrações elevadas, causam danos celulares, que podem culminar com o processo de apoptose (Circue e Aw, 2010). Esse acontecimento é produto de um desequilíbrio do potencial redox intracelular, levando a célula ao estado de estresse oxidativo. A disparidade do potencial redox é oriunda de um aumento das EROs e/ou da redução dos níveis de antioxidantes (Deleuze e Goudet, 2010). A mitocôndria é a maior geradora desse produto intracelular, desviando aproximadamente 1 a 2% de todo o seu oxigênio consumido para a formação de EROs (Circu e Aw, 2010).

Entre os antioxidantes, a glutatona exerce uma importante função na defesa aos danos provenientes das EROs (Hammond et al., 2001). A glutatona é sintetizada no citosol e posteriormente distribuída tanto em nível intracelular, atuando nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático e no núcleo, quanto no espaço extracelular, para poder ser utilizada por outras células e tecidos (Ballatori et al., 2009).

Durante a MIV de complexos *cumulus*-oócitos bovinos, não é detectado um aumento na produção de EROS, quando comparado antes e depois da MIV. Contudo, quando os CCOs estão sob estresse térmico, é observado um aumento significativo de EROS, bem como uma redução dos níveis de glutatona, principalmente no oócito, levando à apoptose das células do *cumulus* (Nabenishi et al., 2011; 2012). Sabe-se que o oócito e as células do *cumulus* estão em constantes trocas de diversas substâncias por meio das junções comunicantes (Lima et al., 2016). Nesse sentido, pode-se inferir que as células do *cumulus* podem ter um papel termoprotetor para o

oócito, pois o aumento da temperatura leva a uma resposta de ambas as células (oócito e células do *cumulus*), porém com a apoptose apenas das células do *cumulus* (Nabenishi et al., 2011, 2012). Esse fato leva a um comprometimento nutricional do oócito e, por consequência (Thompson et al., 2007), a um impacto negativo na retomada da meiose do oócito (Van Soom et al., 2007). É importante ressaltar que as EROs é uma das principais vias que levam à abertura de poros na membrana mitocondrial e, por consequência, à liberação de fatores pró-apoptóticos, culminando com o processo de apoptose celular (Beere, 2004).

### Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular ativo (Franco e Cidlowski, 2009), que pode ser iniciado por duas vias distintas: extrínseca e intrínseca. A via intrínseca tem como característica a liberação de fatores pró-apoptóticos, tais como o citocromo *c*, fator indutor de apoptose (AIF) e smac/diablo, em função de um aumento da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria. O citocromo *c* livre no citosol se liga a uma proteína adaptadora conhecida como fator ativador de protease apoptótica I (Apaf-I), que, por sua vez, recruta e ativa a caspase iniciadora (pro-caspase-9), formando um complexo proteico denominado apoptossoma. O apoptossoma cliva a caspase efetora (pro-caspase-3), possibilitando que ela exerça sua função proteolítica. Já a via extrínseca é desencadeada pela relação de alguns ligantes a receptores de morte na superfície celular. Dentre eles, pode-se destacar o receptor do fator de necrose tumoral I (TNFR1) e o receptor FAS (FasR), que contém um domínio citoplasmático, tendo este um papel chave na transmissão de sinal, induzindo o recrutamento e a ativação da pro-caspase-8. A ativação da caspase-8 aciona a clivagem da proteína Bid em sua forma ativa tBid, que recruta e ativa Bak e Bax, desencadeando a liberação de fatores apoptóticos pela mitocôndria. O domínio DD também atua na ativação de outras proteínas sinalizadoras, tais como a JNK e ASK I, que ativam Bax (Beere, 2004). Por outro lado, existem outras proteínas conhecidas como antiapoptose (BCL-2, BCL-XL e MCL1), que antagonizam esses efeitos (Zong et al., 2001), por meio de um bloqueio da ação de Bax Bak, mantendo a integridade da membrana mitocondrial (Perciavalle et al., 2012; Fig. 1).

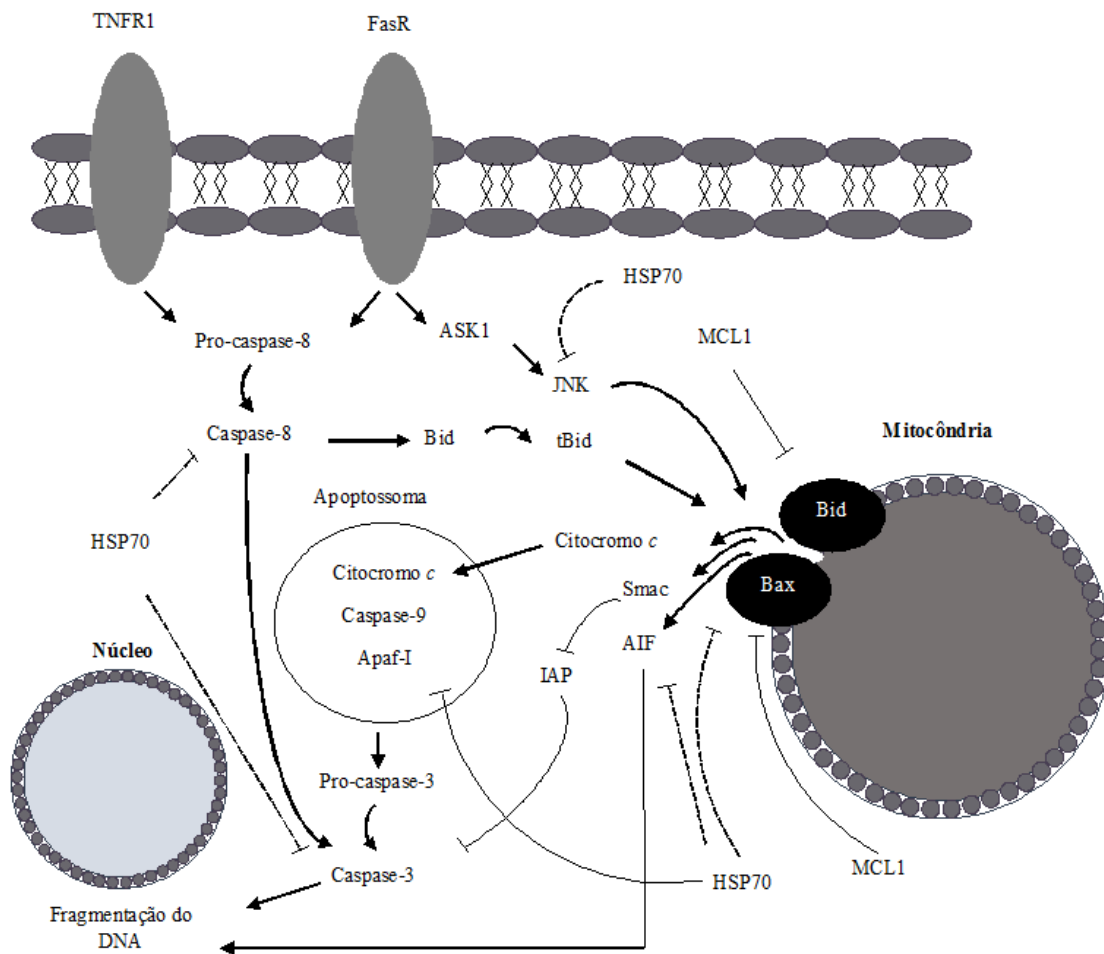


Figura 1. Representação esquemática das vias da apoptose extrínseca e intrínseca, e a atuação da HSP70 frente a este processo.

Nabenishi et al. (2011) observaram que o emprego de uma temperatura supra-fisiológica (40°C) durante a MIV de CCOs bovinos leva a uma redução tanto das taxas de maturação oocitária (38.5°C: 72.7% e 40°C: 34.3%) quanto de blastocisto (38.5°C: 31.4% e 40°C: 18.15%) quando comparado ao controle (38.5°C). Por outro lado, neste mesmo trabalho, a temperatura de 40°C levou a um aumento da apoptose, com destaque nas células do *cumulus* que circundam o oócito. Esses achados indicam uma relação inversa entre a competência oocitária e a apoptose. Corroborando tal afirmação, Roth e Hansen (2004) utilizaram um inibidor de caspase (z-DEVD-fmk) em CCOs bovinos submetidos à condição de estresse térmico durante a MIV e observaram um restabelecimento das taxas de clivagem e de blastocisto, que foram semelhantes ao controle.

### Proteínas de choque térmico

As HSPs são proteínas chaperonas moleculares, assim denominadas por poderem ligar-se de forma reversível a outras proteínas, as quais atuam de forma conjunta na formação, no dobramento e no transporte trans-membrana (Castro et al., 2013).

As HSPs são ativadas da seguinte maneira: logo após um estresse térmico, ocorre uma resposta ao choque térmico (HSR), em que um fator transcricional, conhecido como fator de choque térmico I (HSF1), que se encontra na sua forma inativa, passa rapidamente por uma trimerização, permitindo que ele se ligue a uma região promotora dos genes que codificam as HSPs. Tal região é descrita como elemento de choque térmico (HSE). Dessa forma, ocorre um aumento da expressão dos genes para HSP (Castro et al., 2013).

HSPs podem ser classificadas de acordo com suas sequências de aminoácidos e o seu peso molecular em KD, sendo distribuídas em seis famílias: pequenas HSP, HSP 40, HSP 60, HSP 70, HSP 90 e HSP 100 (Fuller et al., 1994).

A HSP 70 exerce um importante papel modulando as vias da apoptose. Essa proteína regula a apoptose tanto na via intrínseca como na extrínseca. Na via intrínseca, ela atua na prevenção da perda de potencial da membrana mitocondrial externa. Resumidamente a HSP 70 impede a translocação da proteína Bax para a membrana mitocondrial, evitando que ela crie poros na membrana (Castro et al., 2013); na via extrínseca, a HSP 70 atua inibindo a ativação de moléculas apoptóticas, tais como JNK, caspase-8, Bax, AIF, Apaf-I e a caspase-3 (Castro et al., 2013; Wang et al., 2014; Vasaikar et al., 2015; Fig. 1).

Já tem sido descrito na literatura que CCOs tanto de bubalino (Yadav et al., 2013) quanto de bovino (Payton et al., 2011), quando submetidos a elevadas temperaturas durante a MIV, respondem a esse estresse incrementando a expressão de RNAm para HSP 70. As proteínas de choque térmico, além de atuarem modulando as vias da apoptose, podem também ser utilizadas como marcador de estresse celular e, por consequência, influenciar na competência oocitária (Camargo et al., 2007).

### Efeito do estresse térmico sobre oócitos durante a MIV

Atualmente já vem sendo demonstrado um efeito negativo do estresse térmico em CCOs bovinos durante a MIV, com a redução nas taxas de oócitos em MII (Nabenishi et al., 2011). Roth e Hansen (2005) observaram que o estresse térmico pode acelerar a quebra da vesícula germinativa, entretanto logo parece haver um efeito compensatório com o bloqueio desses oócitos em metáfase I, anáfase I e telófase I, consequentemente reduzindo as taxas de MII. Como já descrito anteriormente, para a obtenção de um oócito competente, é necessária a sincronização dos eventos nucleares e citoplasmáticos (Sirard, 2001). Contudo Maya-Soriano et al. (2012) observaram que essa aceleração da progressão meiótica pode causar uma perda dos grânulos corticais, levando a uma MII anormal.

Outras células importantes para a maturação dos oócitos são as células do *cumulus*, as quais têm um papel essencial na esteroidogênese (Lima-Verde et al., 2011). Rispoli et al. (2013) observaram que, quando aplicado um choque térmico de 41°C durante as 12h iniciais da MIV, as células do *cumulus* aumentavam a expressão de duas importantes enzimas na cascata da esteroidogênese, a CYP11A1 (converte colesterol em pregnenolona) e a 3 $\beta$ HSD. Como consequência dessas alterações, ocorre um aumento da secreção de P4. O aumento desse hormônio pode ser uma das causas na aceleração da quebra da vesícula germinativa relatada nos oócitos que passaram pelo estresse térmico durante a MIV. Já foi relatado anteriormente em suínos que o aumento de P4 acelera o rompimento da vesícula germinativa (Yamashita et al., 2003).

Uma alteração importante nos oócitos bovinos submetidos ao estresse térmico durante a MIV ocorre pela produção de EROs. Estudos anteriores (Nabenishi et al., 2011) verificaram que, em CCOs bovinos, o estresse térmico causa um desbalanço na capacidade oxidativa, com o aumento das EROs e a diminuição da glutatona. Tal efeito culminou com o processo de apoptose nas células do *cumulus*. A célula, ao passar por um estresse causado por alta temperatura, ativa um fator transcricional HSF-I, levando a um aumento da expressão de RNAm para as HSP (Massone Christians 2011). Como já relatado anteriormente, as HSPs podem atuar modulando a apoptose tanto na via intrínseca (Gotoh et al., 2004) quanto na extrínseca (Vasaikar et al., 2015). Interessante que, em CCOs bovinos, somente as células do *cumulus* aumentaram a expressão de RNAm para a HSP 70, sugerindo que os danos causados durante a MIV de oócitos dessa espécie podem ser mediados pelas

células do *cumulus* (Payton et al., 2011). Nabenishi et al. (2011) observaram que somente as células do *cumulus* de CCOs bovino estressados termicamente durante a MIV entravam em processo de apoptose. Sabe-se que as células do *cumulus* são importantes no fornecimento de substâncias, entre elas substratos energéticos como a glicose (Thompson et al., 2007). Logo, um comprometimento dessas células pode ter um grande impacto no desenvolvimento oocitário (Van Soom et al., 2007; Fig. 2).

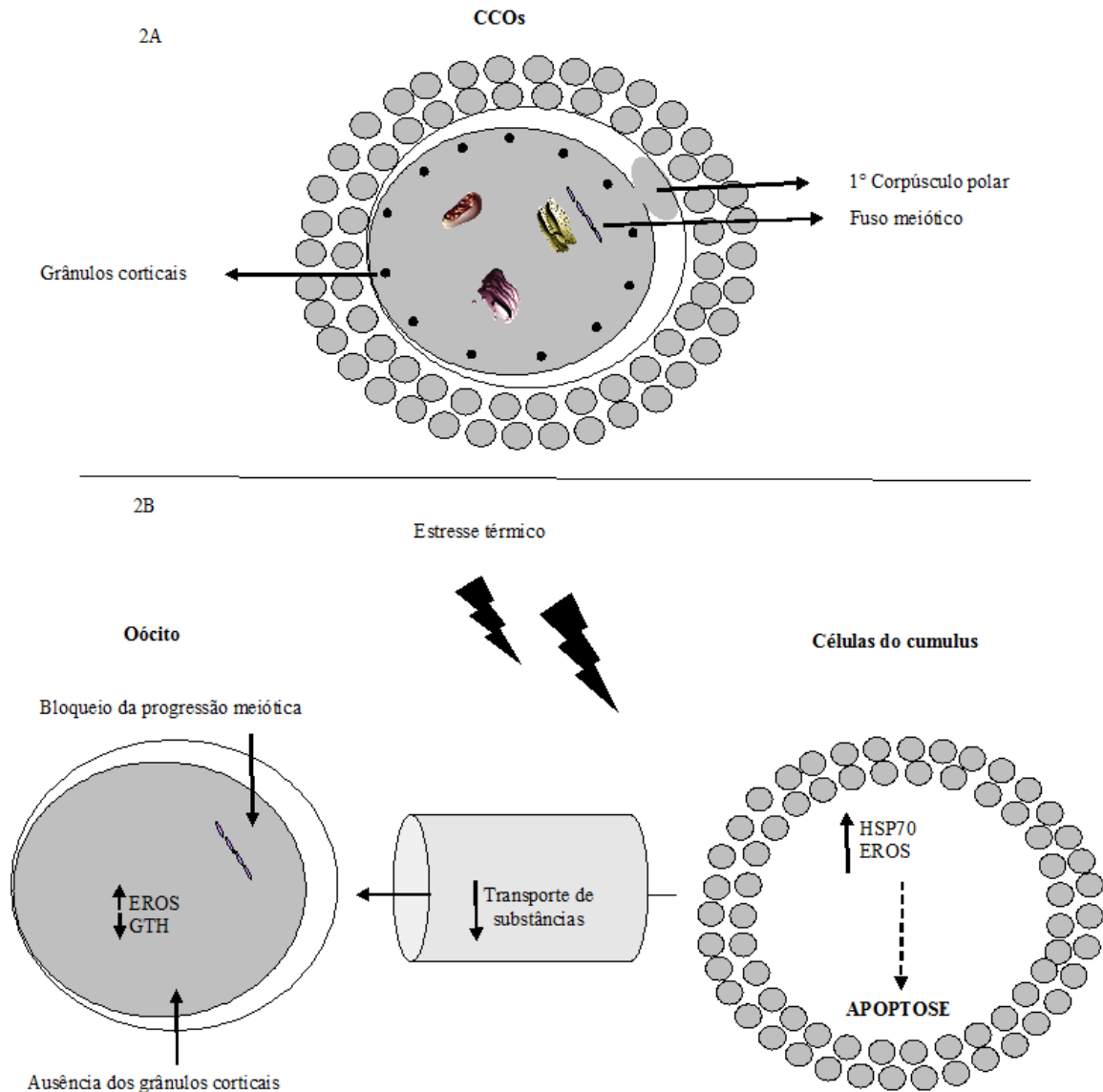


Figura 2. Ilustra CCO bovinos sem (2A) e com estresse térmico (2B). Na figura 2A, oócito do CCO alcançou o estágio de metáfase II, com extrusão do 1º corpúsculo polar e a perfeita distribuição dos grânulos corticais. Na figura 2B, pode-se observar que a exposição dos CCOs a elevada temperatura durante a MIV, ocasiona uma elevação da expressão de RNAm para HSP70, bem como, dos níveis de EROS nas células do cumulus, culminando com o processo de apoptose. Desta forma, reduz o transporte de importantes substâncias das células do cumulus para o oócito, impactando na progressão meiótica e grânulos corticais.

### Considerações finais

O estresse térmico é um grande obstáculo na eficiência reprodutiva dos rebanhos. Em nível celular, o estresse térmico leva a danos nas células do *cumulus* com o aumento das EROS e da expressão de RNAm para genes relacionados com a resposta ao choque térmico e apoptose, culminando com a morte dessas células. Esse processo prejudica a passagem de substâncias para o oócito, comprometendo o processo da maturação oocitária e provocando perda da competência oocitária.



## Referências

- Anas M-KI, Shoji A, Shimada M, Tereda T.** Effects of wortmannin on the kinect of GVBD and the activities of the maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology*, v.53, p.1797-1806, 2000.
- Assou S, Al-Edani T, Haouzi D, Philippe N, Lecellier CH, Piquemal D, Commes T, Ait-Ahmed O, Dechaud H, Hamamah S.** Micro-RNAs: news candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex. *Hum Reprod*, v.28, p.3038-3049, 2013.
- Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL.** Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*, v.390, p.191-214, 2009.
- Beere HM.** 'The stress of dyng': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci*, v.117, p.2641-2651, 2004.
- Camargo LSA, Viana JHM, Ramos AA, Serapião RV, Sa WF, Ferreira AM, Guimarães MFM, Vale Filho, VR.** *Theriogenology*, v.68, p.626-632, 2007.
- Castro SV, Lobo CH, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Proteínas de choque térmico Hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Vet Bras*, v.7, p.261-271, 2013.
- Ceresa BP, Schmid SL.** Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, v.12, p.204-210, 2000.
- Circu ML, Aw TY.** Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, v.48, p.749-762, 2010.
- Crocorno LF, Marques Filho WC, Sudano MJ, Paschoal DM, Landim-Alvarenga FC, Bicudo SD.** Effect of roscovitine and cycloheximide on ultrastructure of sheep oocytes. *Small Rumin Res*, v.109, p.156-162, 2013.
- Deleuze S, Goudet G.** Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.476-482, 2010.
- Dobson H, Smith RF.** What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci*, v.61, p.743-752, 2000.
- Edwards JL, Saxton AM, Lawrence JL, Payton RR, Dunlap JR.** Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens *in vitro* maturation in bovine oocytes. *J Dairy Sci*, v.88, p.4326-4333, 2005.
- Franco R, Cidlowski JA.** Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ*, v.16, p.1303-1314, 2009.
- Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO, Guillet JG, Soussi T, Polla BS.** Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer*, v.30, p.1884-1891, 1994.
- Gendelman M, Roth Z.** Seasonal effect on germinal vesicle -stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryo associated with reduced developmental competence. *Biol Reprod*, v.86, p.1-9, 2012.
- Gilchrist GC, Tscherner A, Nalpathamkalam T, Merico D, LaMarre J.** MicroRNA expression during bovine oocyte maturation and fertilization. *Int J Mol Sci*, v.17, p.ii, E396, 2016.
- Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M.** Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ*, v.11, p.390-402, 2004.
- Hammond CL, Lee TK, Ballatori N.** Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol*, v.34, p.946-954, 2001.
- Hickey TE, Marroco DL, Amato F, Ritter LJ, Norman RJ, Gilchrist RB, Armstrong DT.** Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor-9 on porcine granulosa cells. *Biol Reprod*, v.73, p.825-832, 2005.
- Hutvagner G, Zamore PD.** RNAi: Nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*, v.12, p.225-232, 2002.
- Lima LF, Bruno JB, Silva AMS, Duarte ABG, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. *Reprod Climat*, 2016. doi:10.1016/j.recli.2015.12.005.
- Lima-Verde IB, Rossetto R, Figueiredo JR.** Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.472-482, 2011.
- Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F.** Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod Biomed Online*, v.28, p.284-299, 2014.
- Masson FL, Christians E.** HSFs and regulation of Hsp70.1 (Hspa1b) in oocytes and preimplantation embryos: new insights brought by transgenic and knockout mouse models. *Cell Stress Chaperones*, v.16, p.275-285, 2011.
- McKenize KA, Cohen BD.** Investigation of human follicle stimulating hormone residency in membrane microdomains. *FASEB J*, v.23, p.880-887, 2009.
- Maya-Soriano MJ, Taberner E, López-Béjar M.** Retinol improves *in vitro* oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. *Zygote*, v.21, p.377-384, 2012.
- Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y.** The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote*, v.20, p.249-259, 2011.



- Nabenishi H, Takagi S, Kamata H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y.** The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. *Mol Reprod Dev*, v.79, p. 31–40, 2012.
- Paes VM, Vieira LA, Correia HHV, Sa NAR, Moura AAA, Sales AD, Rodrigues APR, Magalães-Padilha DM, Santos FW, Apgar GA, Campello CC, Camargo LSA, Figueiredo JR.** Effect of heat stress on the survival and development of *in vitro* cultured bovine preantral follicles and on *in vitro* maturation of cumulus-oocyte complex. *Theriogenology*, 2016. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.027.
- Paynton BV, Rempel R, Bachvarova R.** Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryo development in the mouse. *Dev Biol*, v.129, p.304-314, 1988.
- Payton RR, Rispoli LA, Saxton AM, Edwards JL.** Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. *J Reprod Dev*, v.57, p.481-491, 2011.
- Perciavalle RM, Stewart DP, Koss B, Lynch J, Milasta S, Bathina M, Temirov J, Cleland MM, Pelletier S, Schuetz JD, Youle RJ, Green DR, Opferman JT.** Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat Cell Biol*, v.14, p.575-583, 2012.
- Pincus G, Enzmann EV.** The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med*, v.62, p.665-675, 1935.
- Rispoli LA, Payton RR, Gondro C, Saxton AM, Nagle KA, Jenkins BW, Schrick FN, Edwards JL.** Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. *Reproduction*, v.146, p.193-207, 2013.
- Roth Z, Hansen PJ.** Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, v.129, p.235-144, 2005.
- Roth Z, Hansen PJ.** Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod*, v.71, p.1898-1906, 2004.
- Sirard MA.** Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v.55, p.1241-1254, 2001.
- Tesfaye D, Worku D, Rings F, Phatsara C, Tholen E, Schellander K, Hoelker M.** Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. *Mol Reprod Dev*, v.76, p.665-677, 2009.
- Thompson JG, Lane M, Gilchrist RB.** Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.64, p.179-190, 2007.
- Van Soom A, Vandaele L, Goossens K, De Kriuf A, Peelman L.** Gamete origin in relation to early embryo development. *Theriogenology*, v.68, p.131-137, 2007.
- Vasaikar SV, Ghosh S, Narain P, Basu A, Gomes J.** HSP70 mediates survival in apoptotic cells-Boolean network prediction and experimental validation. *Front Cell Neurosci*, v.9,319, 2015.
- Wang X, Chen M, Zhou J, Zhang X.** HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (review). *Int J Oncol*, v.45, p.18-30, 2014.
- Wise ME, Armstrong DV, Huber JT, Hunter R, Wiersma F.** Hormonal alterations in the lactating dairy cow. *J Dairy Sci*, v.71, p.2480-2484, 1988.
- Yadav A, Singh KP, Singh MK, Saini N, Palta P, Manik RS, Singla SK, Upadhyay RC, Chauhan MS.** Effect of physiologically relevant heat shock on development, apoptosis and expression of some genes in buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced *in vitro*. *Reprod Domest Anim*, v.48, p.858-865, 2013.
- Yamashita Y, Shimada M, Okazaki T, Maeda T, Terada T.** Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. *Biol Reprod*, v.68, p.1193-1198, 2003.
- Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, Macgregor GR, Thompson CB.** BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*, v.15, p.1481-1486, 2001.
-