



## Resposta oocitária ao estresse térmico: efeitos moleculares e na cinética do desenvolvimento embrionário

*Oocytes responses to heat stress: molecular effects and on the kinetics of embryonic development*

Marcelo Tigre Moura, Caroline Alencar Imaeda de Carvalho, Fabíola Freitas de Paula-Lopes\*

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP,  
Campus Diadema, Diadema – SP, Brasil

### Resumo

A exposição de bovinos a temperaturas elevadas pode causar hipertermia e alterações fisiológicas denominadas de estresse térmico. Este fenômeno tem sido caracterizado em várias espécies, sendo exacerbado em vacas leiteiras de alta produção. Apesar de estas alterações serem observadas em diversos órgãos e tipos celulares, oócitos e embriões pré-implantacionais são mais susceptíveis ao estresse térmico, resultando em reduções na fertilidade das vacas lactantes durante os meses mais quentes do ano. Os oócitos bovinos expostos ao estresse térmico apresentam alterações celulares e moleculares que reduzem a competência oocitária sendo carreados ao embrião pré-implantacional. A maturação *in vitro* de oócitos bovinos em condições de temperatura elevada (choque térmico) recapitula as principais alterações observadas *in vivo*, permitindo investigar em mais detalhes a susceptibilidade e os mecanismos de sobrevivência. O entendimento dos processos mediados pelo estresse térmico na fisiologia do oócito permitirá o desenvolvimento de estratégias para mitigar os efeitos negativos mantendo a competência oocitária.

**Palavras-chave:** *Bos taurus taurus*, embriogênese, hipertermia, oogênese, reprodução.

### Abstract

*The exposure of cattle to high environmental temperatures may lead to hyperthermia and physiological changes known as heat stress. This phenomenon has been characterized in several species, albeit is a more profound problem in high-yielding dairy cows. Although these alterations are observed in several organs and cell types, oocytes and preimplantation embryos are more susceptible to heat stress, resulting in reductions in the fertility of lactating cows during the hottest months of the year. Bovine oocytes exposed to heat stress undergo cellular and molecular changes reducing oocyte competence which is carried out to the preimplantation embryo. In vitro maturation of bovine oocytes under conditions of high temperature (heat shock) recapitulates the main changes observed in vivo, allowing us to investigate the susceptibilities and survival mechanisms. Understanding the processes mediated by heat stress in oocyte physiology will allow the development of strategies to mitigate the negative effects while maintaining oocyte competence.*

**Key words:** *Bos taurus*, embryogenesis, hyperthermia, oogenesis, reproduction.

### Introdução

Os bovinos fazem parte de um grupo de animais chamados de endotérmicos, ou seja, capazes de gerar o próprio calor devido a alta taxa metabólica e baixa condutividade térmica (Kleiber, 1961). Além disso, bovinos são homeotérmicos por manter a temperatura corporal consideravelmente constante em torno de 38 a 39 °C (Hafner et al., 1993; Robbins, 1999). A exposição animal às condições adversas de temperatura causa inúmeras alterações fisiológicas a fim de manter a temperatura corporal constante. Nesse contexto de termoregulação ocorre aumento da frequência respiratória, desvio do fluxo sanguíneo para periferia corporal, redução da ingestão de alimentos e aumento no consumo de água (Johnson et al., 1962; Rowell et al., 1966; Roman-Ponce et al., 1978; Srikandakumar e Johnson, 2004). No entanto, dependendo da severidade das condições ambientais e da capacidade termoregulatória do animal pode haver aumento da temperatura corporal (hipertermia) resultando em estresse térmico.

Em nível celular o estresse térmico causa desnaturação global de proteínas (Vigh et al., 2014) e acúmulo de proteínas desdobradas levando a ativação da resposta a proteínas desdobradas (UPR) no

\*Correspondência: paula.lopes29@unifesp.br

Recebido: 29 de novembro de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



retículo endoplasmático (Alemu *et al.*, 2018), ativação da resposta ao choque térmico (HSR) (Morimoto *et al.*, 1990; Welch *et al.*, 1991; Agarwal e Ganesh, 2020), inibição global na síntese de proteínas (Curci *et al.*, 1987; Shalgi *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2019), aumento na síntese de chaperonas moleculares como as proteínas do choque térmico (HSPs) (Edwards e Hansen, 1996; Pennarossa *et al.*, 2012), danos nas membranas celulares (Zeron *et al.*, 2001), entre outros. Dessa forma, a regulação da temperatura corporal é uma das funções essenciais do organismo.

Em bovinos, o estresse térmico é um dos fatores que mais contribui para a queda na fertilidade, comprometendo cerca de 60% da criação mundial (Wolfenson *et al.*, 2000). Essa redução de fertilidade já foi demonstrada em vacas de aptidão leiteira e de corte (Badinga *et al.*, 1985; Al-Katanani *et al.*, 1999; Schüller *et al.*, 2014; Hagiya *et al.*, 2017; Fodor *et al.*, 2018; Wolfenson e Roth, 2019; Djelailia *et al.*, 2020). Por exemplo, o aumento da temperatura ambiente de 23,9°C para 32,2°C reduziu as taxas de concepção de 52 para 32% no verão (Badinga *et al.*, 1985). Um estudo retrospectivo realizado em Israel durante o período de 2000 a 2017 demonstrou que a taxa de concepção de vacas em lactação caiu de 42,6% quando os animais foram inseminados durante os meses frios de inverno para 27,7% quando inseminados nos meses de verão (Wolfenson e Roth, 2019). Da mesma forma, a análise de dados meteorológicos dos últimos 20 anos indicou que o declínio da taxa de concepção é diretamente proporcional ao aumento da temperatura ambiente e da umidade relativa do ar (Djelailia *et al.*, 2020).

As vacas leiteiras representam um grupo altamente susceptível ao estresse térmico, devido ao alto calor metabólico associado a produção de leite. A magnitude dos efeitos deletérios do estresse térmico na fertilidade é maior para vacas de alta produção do que vacas de baixa produção (Al-Katanani *et al.*, 2002). Nas últimas décadas, o aumento na produção de leite reduziu as taxas de gestação para vacas inseminadas durante os meses do verão enquanto permaneceu relativamente constante nos meses do inverno (López-Gatius, 2003).

A disponibilidade de ambientes sombreados é importante para o controle do estresse térmico animal, pois reduz a frequência respiratória e a temperatura retal (Gebremedhin *et al.*, 2007), embora não anule o efeito negativo do estresse térmico sobre as taxas de concepção (Flamenbaum e Ezra, 2003). Além disso, o manejo ambiental com ventiladores e aspersores de água é uma das medidas de mitigação mais importantes para vacas lactantes bem como vacas no termo final da gestação sob condições de estresse térmico. No entanto, estas medidas promovem apenas uma melhora parcial na eficiência reprodutiva do rebanho, precisando ser associada a outras estratégias (Laporta *et al.*, 2020; Roth, 2020).

O resfriamento ambiental (*cooling*) durante o período seco de vacas expostas ao estresse térmico aumentou a produção leiteira em 5,0 a 7,5 kg por dia (Dahl *et al.*, 2017; Fabris *et al.*, 2017). Já foi demonstrado que o resfriamento frequente, em ciclos de 20 e 40 minutos, reduz a frequência respiratória e a temperatura retal em aproximadamente 0,5 °C/h (Hillman *et al.*, 2001). Houve também redução da temperatura de 0,6, 0,7 e 1,0 °C, quando os ciclos foram de 15, 30 e 45 minutos, respectivamente (Flamenbaum *et al.*, 1986). Portanto, investigar novas alternativas a fim de evitar/mitigar os prejuízos reprodutivos provocados em decorrência de temperatura e umidade elevadas em vacas leiteiras tem sido prioridade para o setor de laticínios em regiões tropicais.

Os danos causados pelo estresse térmico sobre os aspectos reprodutivos e produtivos levam a uma perda anual de aproximadamente US\$ 371 milhões (Laporta *et al.*, 2020). Ademais, as filhas e netas dessas vacas também apresentam declínio nas lactações, sendo indiretamente afetadas pelo estresse térmico (Laporta *et al.*, 2020). De maneira geral estima-se que a prejuízo financeiro para a indústria de laticínios chega a US\$ 897 milhões por ano nos Estados Unidos da América (EUA) (St-Pierre *et al.*, 2003). A previsão é que esse cenário se torne ainda mais crítico em decorrência das mudanças climáticas, uma vez que a temperatura ambiental aumentou aproximadamente 1,5 °C no último século (IPCC, 2019) e a tendência é que aumente entre 0,3 e 4,8 °C até o próximo século (IPCC 2014; 2014a; 2018). Dessa forma, pressupõe-se que as perdas econômicas cheguem a US\$ 2,2 bilhões até 2080 (Mauger *et al.* 2015).

A infertilidade sazonal causada pelo estresse térmico deve-se as ações diretas e indiretas da temperatura elevada nas células e órgãos do sistema reprodutor. O eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Badinga *et al.*, 1993; Wolfenson *et al.*, 1995; Lew *et al.*, 2006), os oócitos (Rocha *et al.*, 1998; Al-Katanani *et al.*, 2002) e os embriões nos estádios pré-implantacionais (Dunlap e Vincent, 1971; Ealy *et al.*, 1993) são especialmente susceptíveis a hipertermia. Por exemplo, em condições de estresse térmico o folículo pré-ovulatório produz baixas concentrações de androstenediona, estradiol e inibina (Wolfenson *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 2000). A redução nos níveis de estradiol compromete a expressão do estro em vacas estressadas, reduzindo a eficiência dos programas de inseminação artificial durante o verão. As alterações na esteroidogênese folicular também reduz o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante



(LH) (Wise *et al.*, 1988; Gilad *et al.*, 1993; Nanas *et al.*, 2020), comprometendo os eventos envolvidos na ovulação, maturação oocitária e luteinização. O estresse térmico também reduz a dominância do folículo pré-ovulatório (Torres-Junior *et al.*, 2008), aumenta os níveis circulantes de FSH (Roth *et al.*, 2000) e o número de folículos de tamanho médio (6–9 mm de diâmetro) (Torres-Junior *et al.*, 2008; Roth *et al.*, 2000). Todos esses danos associados a grande susceptibilidade dos oócitos (Al-Katanani *et al.*, 2002; Risolia e Paula-Lopes, 2013; Rodrigues *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017) e embriões (Paula-Lopes e Hansen, 2002a, 2002b; Paula-Lopes *et al.*, 2003) aos efeitos diretos da temperatura comprometem a competência oocitária e desenvolvimento embrionário inicial. Em contraste, os efeitos do estresse térmico nos níveis de progesterona são variáveis (Howell *et al.*, 1994; Trout *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 2000), mas existem evidências de que o estresse térmico crônico reduz função do corpo lúteo e a produção de progesterona (Howell *et al.*, 1994).

Apesar do entendimento sobre as consequências do estresse térmico na reprodução animal ter avançado nos últimos anos, o estabelecimento de medidas de mitigação que contornem os efeitos deletérios do estresse térmico permitiu apenas uma melhora parcial, podendo muitas vezes envolver alto custo para propriedade (Hansen, 2019; Baruselli *et al.*, 2020). O mapeamento dos tipos e da extensão dos danos causados pelo estresse térmico em oócitos pode levar ao desenvolvimento de alternativas mais promissoras de mitigação, considerando a particular susceptibilidade deste gameta (**Figura 1**). As mudanças climáticas agravam os desafios impostos pelo estresse térmico, aumentando a severidade climática, a extensão das regiões de clima quente e a frequência de ondas de calor, exacerbando ainda mais a pressão por alternativas de combate no contexto da pecuária (Moura e Paula-Lopes, 2020). Portanto, esta revisão visa abordar o efeito do estresse térmico sobre aspectos funcionais, celulares e moleculares de oócitos de bovinos que devem ser considerados para o desenvolvimento de novas estratégias de mitigação.

### Respostas funcionais e celulares do oócito ao estresse térmico

Estudos *in vivo* demonstraram o impacto do estresse térmico sobre o potencial funcional do oócito. Já foi relatado que o estresse térmico no verão reduz as taxas de fertilização em bovinos (Sartori *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2011), provavelmente devido a redução da competência oocitária (Rocha *et al.*, 1998; Al-Katanani *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2004; Torres-Junior *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2017). Embora o efeito do estresse térmico sobre a taxa de clivagem seja variável, a redução no desenvolvimento embrionário é consistente entre diferentes estudos. Um estudo pioneiro demonstrou que quando novilhas foram submetidas ao estresse térmico durante o período de maturação oocitária houve declínio do número de embriões viáveis (Putney *et al.*, 1989). A análise retrospectiva de registros referentes a coleta de oócitos durante os diferentes meses do ano seguida da produção *in vitro* de embriões bovinos de fazendas brasileiras demonstrou redução na produção de blastocisto quando os oócitos foram coletados nos meses mais quentes (Watanabe *et al.*, 2017). De maneira similar, a produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos coletados de vacas e novilhas expostas ao estresse térmico também comprometeu o desenvolvimento à blastocisto, sendo maior em vacas do que novilhas (Ferreira *et al.*, 2011).

Quando vacas das raças Holandesa (*Bos taurus taurus*) e Nelore (*Bos taurus indicus*) foram submetidas ao estresse térmico em câmara climática por 28 dias houve efeito imediato do estresse térmico reduzindo quantidade e qualidade de oócitos recuperados em ambas as raças. No entanto, a redução na taxa de blastocisto ocorreu apenas quando os oócitos foram coletados de vacas Holandesas estressadas (Risolia e Paula-Lopes, 2013). Quando vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*) foram submetidas ao mesmo modelo de estresse térmico em câmara climática não houve efeito imediato do estresse térmico na função reprodutiva. No entanto, o estresse térmico causou efeitos retardados após o final do tratamento. Por exemplo, estresse térmico interferiu no crescimento folicular, no padrão hormonal e na competência oocitária, reduzindo o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Torres-Junior *et al.*, 2008). Existem evidências de que danos imediatos e tardios do estresse térmico na competência oocitária podem ser revertidos pela remoção dos folículos danificados por aspiração folicular (Roth *et al.*, 2001). Estes animais apresentaram maior quantidade de oócitos viáveis e de taxa de desenvolvimento embrionário (Roth *et al.*, 2001).

A estrutura celular oocitária também sofre influência do estresse térmico. As membranas celulares dos oócitos bovinos coletados durante o verão possuem menos ácidos graxos poli-insaturados e mais ácidos graxos saturados (Zeron *et al.*, 2001) quando comparados com os oócitos coletados durante o inverno. Baixos níveis de ácido graxos poli-insaturados já foram relacionados com atresia folicular e



infertilidade em murinos (Stoffel *et al.*, 2020). Além disso, a quantidade de DNA mitocondrial foi reduzida em oócitos coletados no verão (Ferreira *et al.*, 2016) em relação ao inverno. Essa ocorrência pode estar atrelada com a capacidade de desenvolvimento, uma vez que a mitocôndria é a organela responsável pela produção de energia, e até mesmo foi observado que a quantidade de mitocôndria aumenta no decorrer do crescimento oocitário (Dumollard *et al.*, 2007).

Outro aspecto funcional importante afetado pelo estresse térmico no oócito é a cinética do desenvolvimento embrionário inicial. A exposição de oócitos ao choque térmico de 41°C durante a maturação *in vitro* (MIV) reduziu a porcentagem de embriões que atingiu o estágio de 2 células às 29, 32 e 35 horas após a inseminação (hai). Da mesma forma, o estresse térmico reduziu o desenvolvimento ao estágio de 4-8 células às 41 hai e > 8 células às 48 hai bem como a porcentagem de embriões clivados às 29, 32, 35, 38, 41 e 48 hai (Latorraca *et al.*, 2019). De maneira similar, quando oócitos foram coletados de vacas Holandesas em lactação na estação quente e ativados partenogeneticamente houve atraso na cinética do desenvolvimento embrionário. Por exemplo, enquanto na estação fria o pico da primeira e segunda clivagem ocorreu com 22-27 e 46-52 h, na estação quente a primeira e segunda clivagem demorou 40 e 52-70 h após ativação, respectivamente (Gendelman *et al.*, 2010). Nesse mesmo estudo a média de oócitos aspirados foi menor durante as estações mais quentes, além de haver diminuição na quantidade de transcritos relacionados ao metabolismo energético e crescimento folicular em embriões tardios, tanto de estações quentes quanto frias, e de transcritos relacionados a sobrevivência embrionária e estabelecimento da pluripotência em embriões precoces de estações quentes (Gendelman *et al.*, 2010).

A confiabilidade do modelo de choque térmico (*in vitro*) em mimetizar o efeito de estresse térmico foi demonstrada por Gendelman e Roth (2012). Nesse estudo comparativo, tanto o desenvolvimento embrionário, quanto a produção de transcritos foram afetados pela temperatura elevada de maneira muito similar, demonstrando as semelhanças entre os modelos *in vivo* e *in vitro* (Gendelman e Roth, 2012). Já foi demonstrado que a exposição de oócitos ao choque térmico reduz as taxas de clivagem (Payton *et al.*, 2004; Roth e Hansen, 2004a; Camargo *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2019; Latorraca *et al.*, 2020), assim como de mórulas (Edwards *et al.*, 2009) e blastocistos (Payton *et al.*, 2004; Roth e Hansen, 2004a, 2004b; Rodrigues *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2019).

O efeito direto da temperatura elevada em oócitos na fase de vesícula germinativa (VG) e durante a MIV foi determinado por experimentos *in vitro* (Payton *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017), recapitulando diversos dos danos causados pelo estresse térmico *in vivo*. Oócitos em VG submetidos ao choque térmico de 41°C por 6 h apresentaram menor taxa de embriões nos estádios de 8 a 16 células (Payton *et al.*, 2004), enquanto que durante 12-14 h houve redução da taxa de blastocistos (Payton *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2017). Alguns estudos demonstraram o efeito do choque térmico sobre a cinética da maturação nuclear. Sabe-se que há atraso na progressão meiótica, aumento na porcentagem de oócitos em metáfase I e subsequente redução na porcentagem de oócitos no estágio de metáfase II (Payton *et al.*, 2004; Roth e Hansen, 2005; Rodrigues *et al.*, 2016).

Foi observado prejuízo na expansão do cumulus após o tratamento com choque térmico (Ahmed *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2019), bem como na comunicação cumulus-oócito (Campen *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2019). A incubação de complexos cumulus-oócitos a 41-42 °C durante a MIV utilizando marcadores fluorescentes para as junções comunicantes permitiu observar o declínio causado pela temperatura elevada (Campen *et al.*, 2018). Sabe-se que este canal de transporte é essencial para o suprimento energético oocitário (Biggers *et al.*, 1967; Eppig *et al.*, 2005; Sugiura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012; Corbett *et al.*, 2014). Além disso, as células do cumulus parecem ter um papel protetor em oócitos expostos a condições de estresse. Por exemplo, quando oócitos desnudos foram expostos ao choque térmico houve diminuição da síntese proteica oocitária. No entanto, esse efeito deletério não foi observado em complexos cumulus-oócitos (Edwards e Hansen, 1996).

O choque térmico tem permitido descrever em detalhes as alterações celulares e moleculares causadas por temperaturas elevadas, que são os possíveis responsáveis pela redução da competência do desenvolvimento do oócito. Dessa forma, Shen *et al.* (2010) realizaram experimentos de transferência nuclear para avaliar a diferença entre citoplasma e núcleo em relação a sensibilidade térmica. O grupo que teve o ooplasma exposto ao choque térmico antes da transferência nuclear teve taxa de blastocisto reduzida, evidenciando a maior susceptibilidade do citoplasma à temperatura elevada (Shen *et al.*, 2010).

Dentre as alterações citoplasmáticas causadas pelo choque térmico, a desorganização do citoesqueleto é uma das mais conhecidas (Ju e Tseng, 2004; Tseng *et al.*, 2004; Ju *et al.*, 2005; Roth e Hansen, 2005; Rodrigues *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2021). Em oócitos bovinos, a desorganização dos microtúbulos foi proporcional ao tempo de exposição ao choque térmico (Tseng *et al.*



al., 2004). Também foi descrito que o cultivo de complexos cumulus-oócitos a 41,5°C levou a alteração na distribuição de F-actina e  $\alpha$ -tubulina (Yin *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2021). Sabe-se que como consequência, a desorganização dos microtúbulos pode resultar em distribuição anormal de compartimentos celulares, como mitocôndrias (Sun *et al.*, 2001) e fuso meiótico (Tseng *et al.*, 2004; Roth e Hansen, 2005).

Oócitos expostos ao choque térmico tiveram redução da migração dos grânulos corticais (Wang *et al.*, 2009; Gharibzadeh *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2017) e aumento da taxa de grânulos corticais do tipo III (Payton *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 2005), que pode ser relacionada com uma aceleração da maturação citoplasmática. Foi observado também alteração no padrão de localização do retículo endoplasmático em relação a oócitos em condições termoneutras (Latorraca *et al.*, 2019), além da presença de marcadores do estresse do retículo em células da granulosa após estresse térmico *in vitro* (Alemu *et al.*, 2018).

Outras alterações citoplasmáticas provocadas pela temperatura elevada estão associadas ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Ispada *et al.*, 2018; Yaacobi-Artzi *et al.*, 2020), prejuízo na migração e na atividade mitocondrial (Wang *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017), indução da autofagia (Latorraca *et al.*, 2020) e indução da apoptose (Roth e Hansen, 2005; Rodrigues *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017). Estudos mostraram que oócitos submetidos ao choque térmico tiveram redução da fertilização, geraram blastocistos com número de células reduzido e maior marcação positiva para TUNEL (Roth e Hansen, 2005; Rodrigues *et al.*, 2016). Todos esses achados auxiliam na compreensão dos mecanismos essenciais para a competência de desenvolvimento do oócito, levando a possibilidades de minimizar os efeitos do estresse térmico na fertilidade de vacas (Moura e Paula-Lopes, 2020).

### Respostas transcricionais e epigenéticas do oócito ao estresse térmico

A comparação da abundância de transcritos gênicos em oócitos submetidos ao estresse ou choque térmico em relação aos expostos as condições termoneutras permite compreender melhor o impacto deste desafio ambiental e estimar a magnitude do efeito negativo sobre o desenvolvimento embrionário. Uma análise transcriptômica avaliou o efeito da raça (Holandesa versus Nelore) sobre a resposta dos oócitos ao choque térmico durante a MIV (Ticianelli *et al.*, 2017). De um total de 23.000 transcritos gênicos investigados, 127 genes foram afetados por raça, 9 genes afetados por temperatura e 6 genes afetados pela interação raça x temperatura. Entre os 15 afetados diretamente ou indiretamente pela temperatura, foram encontrados genes associados ao metabolismo de lipídeos/produção de energia (*ACOX1*) e controle do estresse oxidativo (*MT1E*) (Ticianelli *et al.*, 2017). Outro estudo de transcriptoma encontrou 52 transcritos gênicos diferencialmente expressos entre oócitos submetidos ao choque térmico (41 °C por 12 h/38.5 °C por 12 h durante a MIV) e condições termoneutras (38.5 °C por 24 h), com grande representação de genes associados à atividade mitocondrial (Payton *et al.*, 2018). Estudos utilizando genes candidatos confirmaram que oócitos expostos a temperaturas elevadas aumentam a expressão de genes relacionados à resposta ao estresse térmico (Kawarsky e King, 2001; Stamperna *et al.*, 2021), atividade mitocondrial (Ferreira *et al.*, 2016; Payton *et al.*, 2018), estresse oxidativo e apoptose (Ticianelli *et al.*, 2017; Stamperna *et al.*, 2021). Essa resposta transcricional restrita dos oócitos expostos ao choque térmico durante a MIV sugere duas possíveis explicações: devido à inatividade transcricional dos oócitos provenientes de folículos antrais (possível modulação pós-transcricional da abundância de transcritos) ou uma resposta específica sem grande impacto na abundância de RNAs. Além disso, estes resultados demonstram que oócitos utilizam mecanismos celulares de sobrevivência em resposta ao estresse térmico (Moura e Paula-Lopes, 2020).

A análise do transcriptoma de células da granulosa 12h após um choque térmico de 2h a 40,5 °C revelou uma grande modulação da expressão gênica (Li *et al.*, 2016). Cerca de 1.200 genes foram diferencialmente expressos após o choque térmico, representando genes associados à morte celular programada, metabolismo proteico, estereodogênese, processamento de RNAs, organização celular, entre outros processos. Uma análise transcriptômica da resposta aguda em células da granulosa de bovinos identificou 321 e 294 genes diferencialmente expressos após choque térmico de 2h a 40 e 41°C, respectivamente (Khan *et al.*, 2020). Os genes modulados pelo choque térmico nas células da granulosa fazem parte de diversas vias celulares, incluindo resposta ao estresse térmico, estereodogênese, apoptose e estresse oxidativo (Khan *et al.*, 2020). Portanto, as células de bovinos apresentam respostas transcricionais coordenadas ao desafio apresentado por temperaturas elevadas, com magnitude de modulação dependente do tipo de estresse, do tipo celular e ao nível de atividade transcricional.

Embriões produzidos a partir de oócitos expostos as temperaturas elevadas representam uma alternativa importante para avaliar o impacto do estresse sobre a competência oocitária (Gendelman e Roth, 2012; Payton *et al.*, 2018; Camargo *et al.*, 2019), considerando os aspectos celulares e moleculares persistentes nos embriões após o estresse (**Figura 1**). Por exemplo, a diferença entre embriões provenientes de oócitos submetidos ao choque térmico e condições termoneutras apareceu apenas no estágio de blastocisto, onde os oriundos do estresse apresentaram menor quantidade de RNA total (Payton *et al.*, 2011). As alterações celulares nos níveis de glutatona, espécies reativas de oxigênio, ATP identificados em oócitos submetidos ao choque térmico permaneceram por poucas horas ou até as primeiras clivagens (Payton *et al.*, 2018), enquanto que diferenças na atividade gênica e perfil epigenético persistiram até pelo menos a fase de blastocisto (Payton *et al.*, 2011; Gendelman e Roth, 2012; Roth, 2018; Camargo *et al.*, 2019). Em relação aos possíveis mecanismos que causariam estas variações no transcriptoma, observou-se aumento da expressão do microRNA *bta-miR-19b* e redução da *DROSHA* (enzima que participa do processamento dos microRNAs) em embriões de oito células obtidos a partir de oócitos expostos ao choque térmico (Souza *et al.*, 2021).

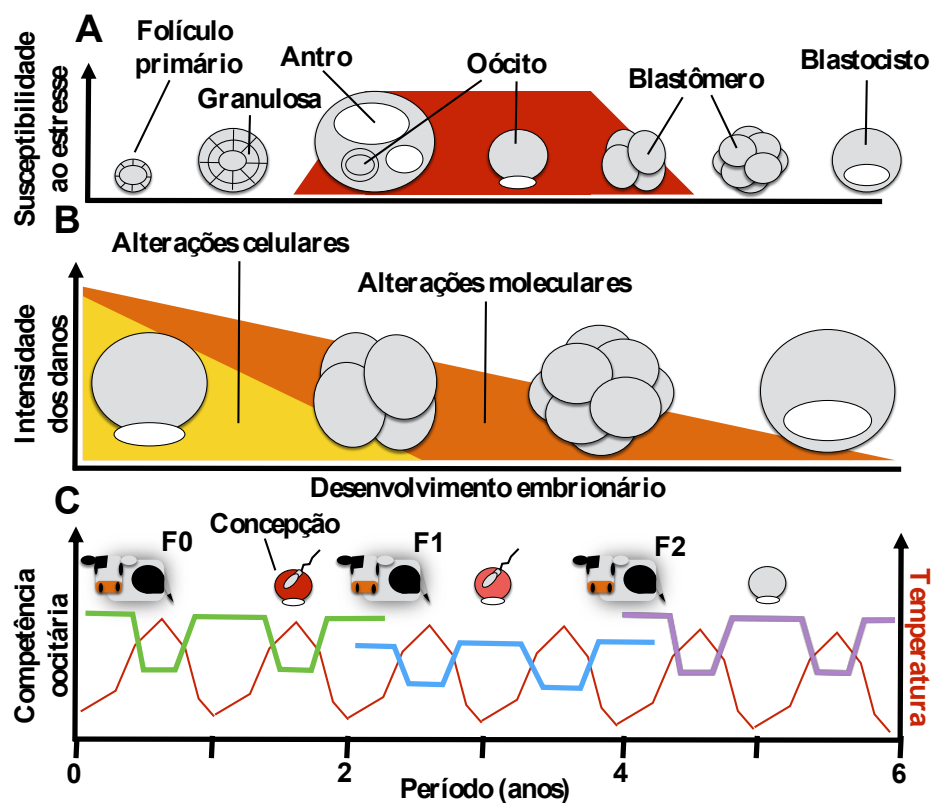


Figura 1: Impacto do estresse térmico sobre a competência oocitária em bovinos. A) Folículos antrais, oócitos e embriões nas primeiras clivagens representam o período do desenvolvimento bovino mais susceptível às temperaturas elevadas (área vermelha). B) O impacto das temperaturas elevadas sobre a competência oocitária pode ser avaliado nos oócitos e nos embriões resultantes, embora os efeitos moleculares persistam por mais tempo do que os efeitos celulares. C) Modelo hipotético do impacto das temperaturas elevadas sobre a competência oocitária, considerando evidências recentes a partir de dados retrospectivos de populações de vacas holandesas (dados reprodutivos e produtivos). Os níveis de competência oocitária (linhas verde, azul e roxa) diminuem devido às temperaturas elevadas (escala em vermelho) no período mais quente do ano, retornando aos níveis fisiológicos meses depois. Quando uma fêmea (F0) concebe durante o estresse térmico no verão (estresse no oócito ou embrião pré-implantacional), a progênie F1 terá menor competência oocitária (linha verde versus azul), independente do estresse térmico. Caso a fêmea da segunda geração (F2) seja concebida durante o período termoneutro, possivelmente esta terá competência oocitária semelhante à avó F0 (linha verde versus roxa).

Os mecanismos epigenéticos (metilação de DNA e modificações covalentes de histonas) regulam a atividade gênica de forma independente da sequência primária do DNA e podem ser herdadas durante o



processo de divisão celular. Portanto, a investigação de mecanismos epigenéticos seria uma alternativa para inferir a viabilidade e competência de oócitos expostos a temperaturas elevadas. Existem evidências de que oócitos bovinos maturados em condições de choque térmico (41 °C durante as primeiras 12 h da MIV) formaram embriões com maior acúmulo de tri-metilação na lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) e deposição da proteína *HP1* nos estádios de 4 e 8 células, sugerindo compactação anormal da cromatina (Camargo *et al.*, 2019). Estes resultados se tornam ainda mais importantes ao considerar que neste modelo não houve efeito do choque térmico sobre a taxa de clivagem e número total de células nos blastocistos (Camargo *et al.*, 2019). A exposição de oócitos de camundongos recém-fecundados (zigotos) ao choque térmico de 40 °C por 1h afetou a metilação de DNA nas regiões de controle dos genes *Igf2r* e *H19* no estágio de blastocisto, reforçando a idéia de que monitorar aspectos epigenéticos contribui para avaliar o potencial de oócitos expostos a temperaturas elevadas. Avaliações globais das alterações epigenéticas causadas por temperaturas elevadas deverão contribuir para melhor predizer a competência oocitária nestas condições, apontando genes, sequências regulatórias e processos celulares afetados.

### Efeitos multigeracionais do estresse térmico

A análise dos dados produtivos de 75.000 vacas holandesas nos EUA indicou que o estresse térmico durante a concepção diminuiu a produção de leite em 80 a 400 kg por lactação (Brown *et al.*, 2015). Esta redução também foi associada à queda da qualidade do leite (menor teor de proteína e gordura) que persistiu nas três lactações avaliadas. Os efeitos do estresse sobre a produção de leite foram menores nas lactações seguintes, possivelmente devido ao processo seletivo nas fazendas e descarte de vacas menos produtivas (Rhoads, 2020). Outro estudo retrospectivo nos EUA mostrou redução na produção de leite em filhas e netas de vacas expostas ao estresse térmico no terço final da gestação (Laporta, 2021), indicando que o estresse térmico *in utero* causa efeitos negativos na progênie. Portanto, o estresse térmico afeta a capacidade produtiva de vacas leiteiras de forma multigeracional (Brown *et al.*, 2015, 2016; Dahl *et al.*, 2017)

Os efeitos do estresse térmico em bovinos podem ser divididos em não permanentes (reversíveis) e permanentes (Dahl *et al.*, 2017). Os efeitos reversíveis impactam principalmente a glândula mamária, pois reduz a involução no período seco e limita o crescimento no final da próxima gestação. Os efeitos permanentes do estresse térmico afetam diversos órgãos e tecidos. Os animais expostos ao estresse térmico *in utero* apresentam menor peso ao nascer (~12% inferior), provem de gestações mais curtas (Dahl *et al.*, 2017; Ouellet *et al.*, 2020) e apresentam alterações imunológicas e metabólicas (Dahl *et al.*, 2019). O peso da progênie de vacas expostas ao estresse térmico no momento do desmame foi cerca de 10% inferior as progênies de vacas controles, mesmo quando sob condições de manejo para a mitigação do calor (Ouellet *et al.*, 2020).

As evidências crescentes de que os danos causados pelo estresse térmico no complexo cumulus-oócito podem ser de longo prazo, implicam que estes danos podem ser carregados para as próximas gerações (**Figura 1**). Já foi demonstrado que vacas holandesas expostas ao estresse térmico no período da concepção produziram filhas com menor eficiência reprodutiva refletida pelo aumento da idade ao primeiro serviço e da idade à concepção bem como maior propensão ao descarte (Monteiro *et al.*, 2016; Akbarinejad *et al.*, 2017; Recce *et al.*, 2021). Os problemas de fertilidade observados nas vacas expostas ao estresse térmico *in utero* podem permanecer até a quarta lactação (Akbarinejad *et al.*, 2017). As vacas submetidas ao estresse *in utero* apresentaram menores concentrações séricas do hormônio anti-mulleriano no período da primeira lactação (Akbarinejad *et al.*, 2017), embora os valores sejam semelhantes as vacas geradas em condições termoneutras nas lactações subsequentes. Em outro estudo retrospectivo nos EUA, as vacas expostas ao estresse térmico *in utero* apresentaram desempenho reprodutivo semelhante às filhas de vacas submetidas ao resfriamento durante o período de estresse, embora as expostas ao estresse permaneçam menos tempo no rebanho (Laporta, 2021). Além disso, vacas expostas ao estresse durante a gestação produziram filhas (F1) com desempenho reprodutivo semelhantes às vacas contemporâneas sob condições termoneutras (Laporta, 2021). Em um estudo retrospectivo com dados produtivos de aproximadamente 250.000 vacas holandesas, sugeriu que houve uma redução significativa da fertilidade na geração F1 pelo fato de que havia menor disponibilidade de dados produtivos das filhas das vacas desafiadas pelo estresse (Rhoads, 2020). A ênfase desses resultados negativos pelo estresse térmico durante o período *in utero* (próximo da concepção) reforça o fato de que o oócito e o embrião pré-implantacional representam o período mais susceptível do desenvolvimento bovino (Ealy *et al.*, 1993; Rhoads, 2020).



Apesar dos trabalhos retrospectivos sofrerem com possíveis fatores que causem viés como variações ambientais e efeito genético dos touros (Rhoads, 2020), os resultados mostram que o impacto do estresse térmico *in utero* pode perdurar por até duas gerações (Ouellet *et al.*, 2020). O delineamento de experimentos em bovinos (Abbott *et al.*, 2018; Latorraca *et al.*, 2020) ou modelos animais (Moura *et al.*, 2021) permitirá identificar especificamente a magnitude do impacto do estresse sobre a competência oocitária, bem como identificar os processos celulares e moleculares associados à esta herança que afeta negativamente a pecuária.

### Considerações Finais

O estresse térmico é um desafio antigo para a pecuária de corte e leiteira. Apesar da nítida percepção do impacto deste desafio ambiental sobre a atividade, investigações descritas nas últimas três décadas identificaram as principais alterações celulares nos oócitos expostos ao estresse térmico. A utilização mais recente de ferramentas moleculares e estudos multigeracionais tem ampliado o panorama do impacto do estresse térmico sobre bovinos, principalmente em vacas leiteiras. Estes avanços geram grande expectativa para aumentar a compreensão dos efeitos deletérios do estresse térmico sobre a competência oocitária e possivelmente, auxiliar na identificação de estratégias promissoras de manejo reprodutivo ou alternativas farmacológicas que preservem a viabilidade e competência dos oócitos sob estresse.

### Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do auxílio 2017/20125-3, parte do Programa FAPESP de Pesquisa sobre Mudanças Climáticas Globais, e do auxílio 2021/03960-1. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

### Referências

- Abbott CR, Saxton AM, Rispoli LA, Payton RR, Pohler KG, Schrick FN, Edwards JL.** An in Vivo Model to Assess the Thermoregulatory Response of Lactating Holsteins to an Acute Heat Stress Event Occurring after a Pharmacologically-Induced LH Surge. *J. Therm. Biol.*, v.78, p.247–56, 2018.
- Agarwal S, Ganesh S.** Perinuclear Mitochondrial Clustering, Increased ROS Levels, and HIF1 Are Required for the Activation of HSF1 by Heat Stress. *J. Cell Sci.*, v.133(13)(858), p.jcs245589, 2020.
- Ahmed JA, Nashiruddullah N, Dutta D, Biswas RK, Borah P.** Cumulus cell expansion and ultrastructural changes in in vitro matured bovine oocytes under heat stress *Iran J Vet Med.*, v.18,3, p.203-207, 2017.
- Akbarinejad V, Gharagozlou F, Vojgani M.** Temporal Effect of Maternal Heat Stress during Gestation on the Fertility and Anti-Müllerian Hormone Concentration of Offspring in Bovine. *Theriogenology*, v.99, p.69–78, 2017.
- Al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ.** Factors Affecting Seasonal Variation in 90-Day Nonreturn Rate to First Service in Lactating Holstein Cows in a Hot Climate. *J. Dairy Sci.*, v.82(12), p.2611–16, 1999.
- Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ.** Effect of Season and Exposure to Heat Stress on Oocyte Competence in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.*, v.85(2), p.390–96, 2002.
- Alemu TW, Pandey HO, Salilew Wondim D, Gebremedhn S, Neuhof C, Tholen E, Holker M, Schellander K, Tesfaye D.** Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress Defense Mechanisms of Bovine Granulosa Cells Exposed to Heat Stress. *Theriogenology*, v.110(2018), p.130–41, 2018.
- Badinga L, Collier RJ, Thatcher WW, Wilcox CJ.** Effects of Climatic and Management Factors on Conception Rate of Dairy Cattle in Subtropical Environment. *J. Dairy Sci.*, v.68(1), p.78–85, 1985.
- Badinga L, Thatcher WW, Diaz T, Drost M, Wolfenson D.** Effect of Environmental Heat Stress on Follicular Development and Steroidogenesis in Lactating Holstein Cows. *Theriogenology*, v.39(4), p.797–810, 1993.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Vieira LM, Souza AH, Bó GA, Rodrigues CA.** Use of Embryo Transfer to Alleviate Infertility Caused by Heat Stress. *Theriogenology*, v.155, p.1–11, 2020.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP.** The Pattern of Energy Metabolism in the Mouse Oocyte





- and Zygote. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v.58(2), p.560–67, 1967.
- Brown BM, Stallings JW, Clay JS, Rhoads ML.** Periconceptual Heat Stress of Holstein Dams Is Associated with Differences in Daughter Milk Production and Composition during Multiple Lactations. PLoS One, v.10(10), p.1–10, 2015.
- Brown BM, Stallings JW, Clay JS, Rhoads ML.** Periconceptual Heat Stress of Holstein Dams Is Associated with Differences in Daughter Milk Production during Their First Lactation. PLoS One, v.11(2), p.1–8, 2016.
- Camargo LSA, Aguirre-Lavin T, Adenot P, Araujo TD, Mendes VRA, Louro ID, Beaujean N, Souza ED.** Heat Shock during in Vitro Maturation Induces Chromatin Modifications in the Bovine Embryo. Reproduction, v.158(4) 2019.
- Camargo LSA, Costa FQ, Munk M, Wohlres-Viana S, Serapião RV, Carvalho BC, Campos PH, Vieira AC, Nogueira LAG, Viana JHM.** Contrasting Effects of Heat Shock during in Vitro Maturation on Development of in Vitro-Fertilized and Parthenogenetic Bovine Embryos. Reprod. Domest. Anim., v.54(10), p.1357–65, 2019.
- Campen K, Abbott C, Rispoli L, Payton R, Saxton A, Edwards JL.** Heat Stress Impairs Gap Junction Communication and Cumulus Function of Bovine Oocytes. J. Reprod. Dev., v.64(5), p.385–92, 2018.
- Corbett HE, Dubé CD, Slow S, Lever M, Trasler JM, Baltz JM.** Uptake of Betaine into Mouse Cumulus-Oocyte Complexes via the SLC7a6 Isoform of Y+1 Transporter. Biol. Reprod., v.90(4), p.1–9, 2014.
- Curci A, Bevilacqua A, Mangia F.** Lack of Heat-Shock Response in Preovulatory Mouse Oocytes. Dev. Biol., v.123(1), p.154–60, 1987.
- Dahl GE, Skibieli A, Laporta J.** In Utero Heat Stress Programs Reduced Performance and Health in Calves. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract., v.35(2), p.343–53, 2019.
- Dahl GE, Tao S, Laporta J.** Triennial Lactation Symposium/Bolfa: Late Gestation Heat Stress of Dairy Cattle Programs Dam and Daughter Milk Production. J. Anim. Sci., v.95(12), p.5701–10, 2017.
- Djelailia H, Bouraoui R, Jemmali B, Najjar T.** Effects of Heat Stress on Reproductive Efficiency in Holstein Dairy Cattle in the North African Arid Region. Reprod. Domest. Anim., v.55(9), p.1250–57, 2020.
- Dumollard R, Duchon M, Carroll J.** The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo. Curr. Top. Dev. Biol., v.77(06), p.21–49, 2007.
- Dunlap C, Vincent C.** Influence of Postbreeding Thermal Stress on Conception Rate in Beef Cattle. J. Anim. Sci., v.32(6), p.1216–18, 1971.
- Ealy AD, Drost M, Hansen PJ.** Developmental Changes in Embryonic Resistance to Adverse Effects of Maternal Heat Stress in Cows. J. Dairy Sci., v.76(10), p.2899–2905, 1993.
- Edwards JL, Hansen PJ.** Elevated Temperature Increases Heat Shock Protein 70 Synthesis in Bovine Two-Cell Embryos and Compromises Function of Maturing Oocytes. Biol. Reprod., v.55(2), p.340–46, 1996.
- Edwards JL, Saxton A, Lawrence J, Payton RR, Dunlap J.** Exposure to a Physiologically Relevant Elevated Temperature Hastens in Vitro Maturation in Bovine Oocytes. J. Dairy Sci., v.88(12), p.4326–33, 2005.
- Edwards JL, Bogart AN, Rispoli LA, Saxton AM, Schrick FN.** Developmental Competence of Bovine Embryos from Heat-Stressed Ova. J. Dairy Sci., v.92(2), p.563–70, 2009.
- Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K, Pendola JK.** Mouse Oocytes Regulate Metabolic Cooperativity between Granulosa Cells and Oocytes: Amino Acid Transport. Biol. Reprod., v.73(2), p.351–57, 2005.
- Fabris T, Laporta J, Corra F, Torres Y, Kirk D, McLean D, Chapman J, Dahl G.** Effect of Nutritional Immunomodulation and Heat Stress during the Dry Period on Subsequent Performance of Cows. J. Dairy Sci., v.100(8), p.6733–42, 2017.
- Ferreira R, Chiaratti M, Macabelli C, Rodrigues C, Ferraz M, Watanabe Y, Smith L, Meirelles F, Baruselli P.** The Infertility of Repeat-Breeder Cows during Summer Is Associated with Decreased Mitochondrial Dna and Increased Expression of Mitochondrial and Apoptotic Genes in Oocytes. Biol. Reprod., v.94(3), p.1–10, 2016.
- Ferreira RM, Ayres H, Chiaratti MR, Ferraz ML, Araújo AB, Rodrigues CA, Watanabe YF, Vireque AA, Joaquim DC, Smith LC, Meirelles F V., Baruselli PS.** The Low Fertility of Repeat-Breeder Cows during Summer Heat Stress Is Related to a Low Oocyte Competence to Develop into Blastocysts. J. Dairy Sci., v.94(5), p.2383–92, 2011.



- Flamenbaum I, Wolfenson D, Mamen M, Berman A.** Cooling Dairy Cattle by a Combination of Sprinkling and Forced Ventilation and Its Implementation in the Shelter System. *J. Dairy Sci.*, v.69(12), p.3140–47, 1986.
- Flamenbaum I, Ezra E.** A large scale survey evaluating the effect of cooling Holstein cows on productive and reproductive performance under subtropical conditions. *J. Dairy Sci.*, v.86(1), p.19, 2003.
- Fodor I, Baumgartner W, Abonyi-Tóth Z, Lang Z, Ózsvári L.** Associations between Management Practices and Major Reproductive Parameters of Holstein-Friesian Replacement Heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.188(June), p.114–22, 2018.
- Gao S, Ma L, Zhou Z, Zhou ZK, Baumgard LH, Jiang D, Bionaz M, Bu D.** Heat Stress Negatively Affects the Transcriptome Related to Overall Metabolism and Milk Protein Synthesis in Mammary Tissue of Midlactating Dairy Cows. *Physiol. Genomics*, v.51(8)(5), p.400–409, 2019.
- Gebremedhin KG, Hillman PE, Lee CN, Collier RJ.** Sweating Rate of Dairy Cows under Shade and Sunny Environments. 2007 ASABE Annu. Int. Meet. Tech. Pap., v.9 BOOK(074083), p.1–19, 2007.
- Gendelman M, Aroyo A, Yavin S, Roth Z.** Seasonal Effects on Gene Expression, Cleavage Timing, and Developmental Competence of Bovine Preimplantation Embryos. *Reproduction*, v.140(1), p.73–82, 2010.
- Gendelman M, Roth Z.** In Vivo vs. in Vitro Models for Studying the Effects of Elevated Temperature on the GV-Stage Oocyte, Subsequent Developmental Competence and Gene Expression. *Anim. Reprod. Sci.*, v.134(3–4), p.125–34, 2012.
- Gharibzadeh Z, Riasi A, Ostadhoseini S, Hosseini SM, Hajian M, Nasr-Esfahani MH.** Effects of Heat Shock during the Early Stage of Oocyte Maturation on the Meiotic Progression, Subsequent Embryonic Development and Gene Expression in Ovine. *Zygote*, v.96, p.573–82, 2014.
- Gilad E, Meidan R, Berman A, Graber Y, Wolfenson D.** Effect of Heat Stress on Tonic and GnRH-Induced Gonadotrophin Secretion in Relation to Concentration of Oestradiol in Plasma of Cyclic Cows. *J. Reprod. Fertil.*, v.99(2), p.315–21, 1993.
- Hafner A, Dahme E, Obermaier G, Schmidt P, Dirksen G.** Spinal Dysmyelination in New-Born Brown Swiss x Braunvieh Calves. *J. Vet. Med. Ser. B*, v.40(1–10), p.413–22, 1993.
- Hagiya K, Hayasaka K, Yamazaki T, Shirai T, Osawa T, Terawaki Y, Nagamine Y, Masuda Y, Suzuki M.** Effects of Heat Stress on Production, Somatic Cell Score and Conception Rate in Holsteins. *Anim. Sci. J.*, v.88(1), p.3–10, 2017.
- Hansen PJ.** Reproductive Physiology of the Heat-Stressed Dairy Cow: Implications for Fertility and Assisted Reproduction. *Anim. Reprod.*, v.16(3), p.497–507, 2019.
- Hillman PE, Gebremedhin KG, Parkhurst A, Fuquay J, Willard S.** Evaporative and Convective Cooling of Cows in a Hot and Humid Environment. (701), p.343–50, 2001.
- Howell JL, Fuquay JW, Smith AE.** Corpus Luteum Growth and Function in Lactating Holstein Cows During Spring and Summer. *J. Dairy Sci.*, v.77(3), p.735–39, 1994.
- Ispada J, Rodrigues TA, Risolia PHB, Lima RS, Gonçalves DR, Rettori D, Nichi M, Feitosa WB, Paula-Lopes FF.** Astaxanthin Counteracts the Effects of Heat Shock on the Maturation of Bovine Oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.30(9), p.1169–79, 2018.
- Johnson HD, Rasgadale AC, Berry I, Shanklin MD.** Environmental Physiology a Shelter Engineering. LXVI Temperature-Humidity Effects Including Influence of Acclimation in Feed and Water Consumption of Holstein Cattle. 1962.
- Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X.** Heat Shock Reduces Developmental Competence and Alters Spindle Configuration of Bovine Oocytes. *Theriogenology*, v.64(8), p.1677–89, 2005.
- Ju JC, Tseng JK.** Nuclear and Cytoskeletal Alterations of In Vitro Matured Porcine Oocytes under Hyperthermia. *Mol. Reprod. Dev.*, v.68(1), p.125–33, 2004.
- Kawarsky SJ, King WA.** Expression and Localisation of Heat Shock Protein 70 in Cultured Bovine Oocytes and Embryos. *Zygote*, v.9(1), p.39–50, 2001.
- Khan A, Khan MZ, Umer S, Khan IM, Xu H, Zhu H, Wang Y.** Cellular and Molecular Adaptation of Bovine Granulosa Cells and Oocytes under Heat Stress. *Animals*, v.10(1), p.1–14, 2020.
- Kleiber M.** The Fire of Life: An Introduction to Animal Energetics. Wiley: New York, NY, USA, p.105–171, 1961.
- Laporta J, Ferreira FC, Dahl GE, Ouellet V.** Late-Gestation Heat Stress Impairs Daughter and Granddaughter Lifetime Performance. *Lancet*, 2020.
- Laporta J.** ADSA Foundation Scholar Award: Early-Life Exposure to Hyperthermia: Productive and Physiological Outcomes, Costs, and Opportunities. *J. Dairy Sci.*, 2021.



- Latorraca LL, Feitosa WB, Paula-Lopes F.** Respostas Oocitárias Ao Estresse Térmico. Diss. - Univ. Estadual Paul. “Júlio Mesquita Filho”, Inst. Biociências Botucatu,, p.138, 2019.
- Latorraca LB, Feitosa WB, Mariano C, Moura MT, Fontes PK, Nogueira MFG, Paula-Lopes FF.** Autophagy Is a Pro-Survival Adaptive Response to Heat Shock in Bovine Cumulus-Oocyte Complexes. *Sci. Rep.*, v.10(1), p.1–13, 2020.
- Lawrence JL, Payton RR, Godkin JD, Saxton AM, Schrick FN, Edwards JL.** Retinol Improves Development of Bovine Oocytes Compromised by Heat Stress during Maturation. *J. Dairy Sci.*, v.87(8), p.2449–54, 2004.
- Lew BJ, Meidan R, Wolfenson D.** Concentrações Hormonais e Desenvolvimento Folicular de Vacas Leiteiras Em Hipertermia Sazonal e Aguda. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, v.58(5), p.816–22, 2006.
- Li L, Wu J, Luo M, Sun Y, Wang G.** The Effect of Heat Stress on Gene Expression, Synthesis of Steroids, and Apoptosis in Bovine Granulosa Cells. *Cell Stress Chaperones*, v.21(3), p.467–75, 2016.
- Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpção MEOA, Visintin JA, Orlandi C, Paula-Lopes FF.** Role of Insulin-like Growth Factor 1 on Cross-Bred Bos Indicus Cattle Germinal Vesicle Oocytes Exposed to Heat Shock. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.29(7), p.1405–14, 2017.
- López-Gatius F.** Is Fertility Declining in Dairy Cattle? A Retrospective Study in Northeastern Spain. *Theriogenology*, v.60(1), p.89–99, 2003.
- Mauger G, Bauman Y, Nennich T, Salathé E.** Impacts of Climate Change on Milk Production in the United States, *The Professional Geographer*, p.121-131, 2015.
- Monteiro APA, Tao S, Thompson IMT, Dahl GE.** In Utero Heat Stress Decreases Calf Survival and Performance through the First Lactation. *J. Dairy Sci.*, v.99(10), p.8443–50, 2016.
- Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C.** The stress response, function of the proteins, and perspectives. *Stress Proteins in Biology and Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p.1–36, 1990.
- Moura MT, Paula-Lopes FF.** Thermoprotective Molecules to Improve Oocyte Competence under Elevated Temperature. *Theriogenology*, v.156, p.262–71, 2020.
- Moura MT, Carvalho CAI, Barros FR.O, Mossa F, Bebbere D, Paula-Lopes FF.** Effect of heat stress during mice germ-cell DNA methylation programming on oocyte developmental competence: A preliminary study. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.33, p.153-153, 2021.
- Nanas I, Chouzouris TM, Dadouli K, Dovolou E, Stamperna K, Barbagianni M, Valasi I, Tsiaras A, Amiridis GS.** 55 Reproduction in Domestic Animals A Study on Stress Response and Fertility Parameters in Phenotypically Thermotolerant and Thermosensitive Dairy Cows during Summer Heat Stress. 2020.
- Ouellet V, Laporta J, Dahl GE.** Late Gestation Heat Stress in Dairy Cows: Effects on Dam and Daughter. *Theriogenology*, v.150, p.471–79, 2020.
- Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Majewski AC, McDowell LR, Hansen PJ.** Manipulation of Antioxidant Status Fails to Improve Fertility of Lactating Cows or Survival of Heat-Shocked Embryos. *J. Dairy Sci.*, v.86(7), p.2343–51, 2003.
- Paula-Lopes FF, Hansen PJ.** Apoptosis Is an Adaptive Response in Bovine Preimplantation Embryos That Facilitates Survival after Heat Shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.295(1), p.37–42, 2002a.
- Paula-Lopes FF, Hansen PJ.** Heat Shock-Induced Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos Is a Developmentally Regulated Phenomenon. *Biol. Reprod.*, v.66(4), p.1169–77, 2002b.
- Payton RR, Rispoli LA, Nagle K, Gondro C, Saxton A, Voy B, Edwards J.** Mitochondrial-Related Consequences of Heat Stress Exposure during Bovine Oocyte Maturation Persist in Early Embryo Development. 2018.
- 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(4), p.481–91, 2011.
- Payton RR, Romar R, Coy P, Saxton AM, Lawrence JL, Edwards JL.** Susceptibility of Bovine Germinal Vesicle-Stage Oocytes from Antral Follicles to Direct Effects of Heat Stress in Vitro. *Biol. Reprod.*, v.71(4), p.1303–8, 2004.
- Pennarossa G, Maffei S, Rahman MM, Berruti G, Brevini TAL, Gandolfi F.** Characterization of the Constitutive Pig Ovary Heat Shock Chaperone Machinery and Its Response to Acute Thermal Stress or to Seasonal Variations. *Biol. Reprod.*, v.87(5), p.1–9, 2012.
- Putney DJ, Drost M, Thatcher WW.** Influence of Summer Heat Stress on Pregnancy Rates of Lactating Dairy Cattle Following Embryo Transfer or Artificial Insemination. *Theriogenology*, v.31(4), p.765–78,



1989.

**Rece S, Huber E, Notaro US, Rodríguez FM, Ortega HH, Rey F, Signorini ML, Salvetti NR.** Association between Heat Stress during Intrauterine Development and the Calving-to-Conception and Calving-to-First-Service Intervals in Holstein Cows. *Theriogenology*, v.162, p.95–104, 2021.

**Rhoads ML.** Effects of Periconceptual Heat Stress on Primiparous and Multiparous Daughters of Holstein Dairy Cows. *Theriogenology*, v.150, p.458–63, 2020.

**Risolia P, Paula-Lopes F.** O Efeito Do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I Em Oócitos Coletados de Vacas Bos Indicus e Bos Taurus Expostas Ao Estresse Térmico in Vivo. Diss. - Univ. Estadual Paul. “Júlio Mesquita Filho”, Inst. Biociências Botucatu, p.131, 2013.

**Robbins J.** Pharmacology of Bovine and Human Thyrotropin: An Historical Perspective. *Thyroid*, v.9(5), p.451–53, 1999.

**Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W.** High Environmental Temperature and Humidity Decrease Oocyte Quality in Bos Taurus but Not in Bos Indicus Cows. *Theriogenology*, v.49(3), p.657–65, 1998.

**Rodrigues Thais A, Ispada J, Risolia PHB, Rodrigues MT, Lima RS, Assumpção MEOA, Visintin JA, Paula-Lopes FF.** Thermoprotective Effect of Insulin-like Growth Factor 1 on in Vitro Matured Bovine Oocyte Exposed to Heat Shock. *Theriogenology*, v.86(8), p.2028–39, 2016.

**Rodrigues Thais A, Tuna KM, Alli AA, Tribulo P, Hansen PJ, Koh J, Paula-Lopes FF.** Follicular Fluid Exosomes Act on the Bovine Oocyte to Improve Oocyte Competence to Support Development and Survival to Heat Shock. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.31(5), p.888–97, 2019.

**Roman-Ponce H, Thatcher WW, Caton D, Barron DH, Wilcox CJ.** Thermal Stress Effects on Uterine Blood Flow in Dairy Cows. v.46(1) 1978.

**Roth Z, Hansen PJ.** Involvement of Apoptosis in Disruption of Developmental Competence of Bovine Oocytes by Heat Shock during Maturation. *Biol. Reprod.*, v.71(6), p.1898–1906, 2004a.

**Roth Z, Hansen PJ.** Sphingosine 1-Phosphate Protects Bovine Oocytes from Heat Shock during Maturation. *Biol. Reprod.*, v.71(6), p.2072–78, 2004b.

**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(2), p.235–44, 2005.

**Roth Z, Meiden R, Braw-Tal R, Wolfenson D.** Immediate and Delayed Effects of Heat Stress on Follicular Development and Its Association with Plasma FSH and Inhibin Concentration in Cows. *J. Reprod. Fertil.*, v.120(1), p.83–90, 2000.

**Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D.** Improvement of Quality of Oocytes Collected in the Autumn by Enhanced Removal of Impaired Follicles from Previously Heat-Stressed Cows. *Reproduction*, v.122(5), p.737–44, 2001.

**Roth Z.** Stress-Induced Alterations in Oocyte Transcripts Are Further Expressed in the Developing Blastocyst. *Mol. Reprod. Dev.*, v.85(11), p.821–35, 2018.

**Roth Z.** Cooling Is the Predominant Strategy to Alleviate the Effects of Heat Stress on Dairy Cows. *Reprod. Domest. Anim.*, p.0–3, 2020.

**Rowell LB, Marx HJ, Bruce RA, Conn RD, Kusumi F.** Reductions in Cardiac Output, Central Blood Volume, and Stroke Volume with Thermal Stress in Normal Men during Exercise. *J. Clin. Invest.*, v.45(11), p.1801–16, 1966.

**Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC.** Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *J. Dairy Sci.*, v.85(11), p.2803–12, 2002.

**Schüller LK, Burfeind O, Heuwieser W.** Impact of Heat Stress on Conception Rate of Dairy Cows in the Moderate Climate Considering Different Temperature-Humidity Index Thresholds, Periods Relative to Breeding, and Heat Load Indices. *Theriogenology*, v.81(8), p.1050–57, 2014.

**Shalgi R, Hurt JA, Krykbaeva I, Taipale M, Lindquist S, Burge CB.** Widespread Regulation of Translation by Elongation Pausing in Heat Shock. *Mol. Cell*, v.49(3), p.439–52, 2013.

**Shen PC, Lee JW, Cheng WTK, Su HY, Lee SN, Liu BT, Wang CH, Chen LR, Ju JC.** Differential Thermal Sensitivity between the Recipient Ooplasm and the Donor Nucleus in Holstein and Taiwan Native Yellow Cattle. *Theriogenology*, v.74(9), p.1587–95, 2010.

**Souza VGP, Souza GT, Lemos DR Guimarães JMO, Quintão CCR, Munk M, Saraiva NZ, Camargo LSA.** Heat Shock during in Vitro Maturation of Bovine Oocytes Disturbs Bta-MiR-19b and DROSHA Transcripts Abundance after in Vitro Fertilization. *Reprod. Domest. Anim.*, v.56(8), p.1128–36, 2021.



- Srikandakumar A, Johnson EH.** Effect of Heat Stress on Milk Production, Rectal Temperature, Respiratory Rate and Blood Chemistry in Holstein, Jersey and Australian Milking Zebu Cows. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.36(7), p.685–92, 2004.
- St-Pierre NR, Cobanov B, Schnitkey G.** Economic Losses from Heat Stress by US Livestock Industries1. *J. Dairy Sci.*, v.86(1), p.E52–77, 2003.
- Stamperna K, Dovolou E, Giannoulis T, Kalemkeridou M, Nanas I, Dadouli K, Moutou K, Mamuris Z, Amiridis GS.** Developmental Competence of Heat Stressed Oocytes from Holstein and Limousine Cows Matured in Vitro. *Reprod. Domest. Anim.*, (July), p.1–13, 2021.
- Stoffel W, Schmidt-Soltau I, Binczek E, Thomas A, Thevis M, Wegner I.** Dietary  $\Omega$ 3-and  $\Omega$ 6-Polyunsaturated Fatty Acids Reconstitute Fertility of Juvenile and Adult Fads2-Deficient Mice. *Mol. Metab.*, v.36(April), p.1–12, 2020.
- Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ.** Oocyte Control of Metabolic Cooperativity between Oocytes and Companion Granulosa Cells: Energy Metabolism. *Dev. Biol.*, v.279(1), p.20–30, 2005.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Schatten H.** Translocation of Active Mitochondria during Pig Oocyte Maturation, Fertilization and Early Embryo Development in Vitro. *Reproduction*, v.122(1), p.155–63, 2001.
- Ticianelli JS, Emanuelli IP, Satrapa RA, Castilho ACS, Loureiro B, Sudano MJ, Fontes PK, Pinto RFP, Razza EM, Surjus RS, Sartori R, Assumpção MEOA, Visintin JA, Barros CM, Paula-Lopes FF.** Gene Expression Profile in Heat-Shocked Holstein and Nelore Oocytes and Cumulus Cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.29(9), p.1787–1802, 2017.
- Torres-Júnior JRS, Pires MFA, de Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA, Ramos AA, Folhadella IM, Polisseni J, de Freitas C, Clemente CAA, de Sá Filho MF, Paula-Lopes FF, Baruselli PS.** Effect of Maternal Heat-Stress on Follicular Growth and Oocyte Competence in *Bos Indicus* Cattle. *Theriogenology*, v.69(2), p.155–66, 2008.
- Trout JP, McDowell LR, Hansen PJ.** Characteristics of the Estrous Cycle and Antioxidant Status of Lactating Holstein Cows Exposed to Heat Stress. *J. Dairy Sci.*, v.81(5), p.1244–50, 1998.
- Tseng JK, Chen CH, Chou PC, Yeh SP, Ju JC.** Influences of Follicular Size on Parthenogenetic Activation and in Vitro Heat Shock on the Cytoskeleton in Cattle Oocytes. *Reprod. Domest. Anim.*, v.39(3), p.146–53, 2004.
- Vigh L, Török Z, Crul T, Maresca B, Schütz GJ, Viana F, Dindia L, Piotto S, Brameshuber M, Balogh G, Péter M, Porta A, Trapani A, Gombos I, Glatz A, Gungor B, Peksel B, Vigh L, Csoboz B, Horváth I, Vijayan MM, Hooper PL, Harwood JL.** Plasma Membranes as Heat Stress Sensors: From Lipid-Controlled Molecular Switches to Therapeutic Applications. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, v.1838(6), p.1594–1618, 2014.
- Wang JZ, Sui HS, Miao DQ, Liu N, Zhou P, Ge L, Tan JH.** Effects of Heat Stress during in Vitro Maturation on Cytoplasmic versus Nuclear Components of Mouse Oocytes. *Reproduction*, v.137(2), p.181–89, 2009.
- Wang Q, Chi MM, Schedl T, Moley KH.** An Intercellular Pathway for Glucose Transport into Mouse Oocytes. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, v.302(12), p.1511–19, 2012.
- Watanabe YF, de Souza AH, Mingoti RD, Ferreira RM, Santana Batista EO, Dayan A, Watanabe O, Meirelles FV, Nogueira MFG, Ferraz JBS, Baruselli PS.** Number of Oocytes Retrieved per Donor during OPU and Its Relationship with in Vitro Embryo Production and Field Fertility Following Embryo Transfer. *Anim. Reprod.*, v.14(3), p.635–44, 2017.
- Welch WJ, Kang HS, Beckmann RP, Mizzen LA.** Response of mammalian cells to metabolic stress: changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v.167, p.31–55, 1991.
- Wise ME, Armstrong D V., Huber JT, Hunter R, Wiersma F.** Hormonal Alterations in the Lactating Dairy Cow in Response to Thermal Stress. *J. Dairy Sci.*, v.71(9), p.2480–85, 1988.
- Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y, Meidan R.** Seasonal and Acute Heat Stress Effects on Steroid Production by Dominant Follicles in Cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.47(1–2), p.9–19, 1997.
- Wolfenson D, Roth Z.** Impact of Heat Stress on Cow Reproduction and Fertility. *Anim. Front.*, v.9(1), p.32–38, 2019.
- Wolfenson D, Roth Z, Meidan R.** Impaired Reproduction in Heat-Stressed Cattle: Basic and Applied Aspects. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60–61, p.535–47, 2000.
- Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, Braw-Tal R, Berman A.** Effect of Heat Stress on Follicular Development during the Estrous Cycle in Lactating Dairy Cattle. *Biol.*



Reprod., v.52(5), p.1106–13, 1995.

**Yaacobi-Artzi S, Shimoni C, Kalo D, Hansen PJ, Roth Z.** Melatonin Slightly Alleviates the Effect of Heat Shock on Bovine Oocytes and Resulting Blastocysts. *Theriogenology*, v.158, p.477–89, 2020.

**Yang L, Zhao Z, Cui M, Zhang L, Li Q.** Melatonin Restores the Developmental Competence of Heat Stressed Porcine Oocytes, and Alters the Expression of Genes Related to Oocyte Maturation. *Animals*, v.11(4) 2021.

**Yin C, Liu J, He B, Jia L, Gong Y, Guo H, Zhao R.** Heat Stress Induces Distinct Responses in Porcine Cumulus Cells and Oocytes Associated with Disrupted Gap Junction and Trans-Zonal Projection Colocalization. *J. Cell. Physiol.*, v.234(4), p.4787–98, 2019.

**Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A.** Seasonal Changes in Bovine Fertility: Relation to Developmental Competence of Oocytes, Membrane Properties and Fatty Acid Composition of Follicles. *Reproduction*, v.121(3), p.447–54, 2001.

---