



Efeitos imediatos, tardios e transgeracionais do estresse térmico em gametas

Immediate, late and transgenerational effects of heat stress on gametes

Paula Sabrina Arruda Coelho¹ e Fabíola Freitas Paula-Lopes¹

¹Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Departamento de Ciências Biológicas/Programa de Pós-Graduação em Biologia Química, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Campus Diadema, Diadema – SP, Brasil

Resumo

As perdas de produtividade e fertilidade animal associadas ao estresse térmico durante os meses mais quentes do ano é um dos maiores desafios do setor pecuário. Na indústria de leite as perdas econômicas causadas pelo estresse térmico foram estimadas em mais de 1,5 bilhões de dólares por ano. No que tange a reprodução, já foi demonstrado que o estresse térmico exerce múltiplos efeitos deletérios, causando disfunções endócrinas e alterando a sequência orquestrada de eventos importantes para a gametogênese e para o desenvolvimento embrionário inicial. Estudos recentes têm esclarecido o padrão temporal no qual os danos são estabelecidos e carreados dependendo da intensidade do estresse. Enquanto os efeitos imediatos do estresse térmico nos gametas já são bem caracterizados, existem evidências de que alguns danos podem ser carreados de forma tardia e possivelmente entre gerações. Além disso, dados emergentes indicam que o estresse térmico compromete a reprogramação da metilação do DNA que ocorre durante a gametogênese e a programação do desenvolvimento *in utero*. Dessa forma, esse artigo visa explorar os efeitos imediatos, tardios e transgeracionais do estresse térmico nos gametas.

Palavras-chave: Temperatura, Aquecimento Global, Oócitos, Espermatozoides.

Abstract

The drop on animal productivity and fertility associated with heat stress during the hot months of the year is one of the biggest challenges for the livestock sector. For the dairy industry the economic losses caused by heat stress have been estimated over 1.5 billion dollars per year. It has already been demonstrated that heat stress exerts multiple deleterious effects on reproductive function, causing endocrine dysfunctions as well as changes in the sequence of events required for gametogenesis and early embryonic development. Recent studies have shed a light in the temporal pattern in which heat-induced damage is established and carried forward depending on the intensity of stress. While the immediate effects of heat stress on gametes are well characterized, there is evidence that some damage can be carried over for longer periods and even across generations. Furthermore, emerging data indicate that heat stress compromises DNA methylation reprogramming that occurs during gametogenesis and developmental programming in utero. Thus, this paper aims to explore the immediate, late and transgenerational effects of heat stress on gametes.

Key words: Global Warming, Oocytes, Sperm, Temperature.

Introdução

As condições ambientais adversas têm sido amplamente discutidas entre os pesquisadores do setor pecuário, especialmente diante dos riscos impostos pelas mudanças climáticas. O aquecimento global intensifica a severidade do estresse térmico no conforto animal, na função produtiva e reprodutiva dos animais de produção pondo em risco a segurança alimentar. Estima-se que até 2050 o número de pessoas em risco de fome aumentará entre 8 e 80 milhões, dependendo do nível de aquecimento (IPCC, 2023). De acordo com os relatórios mais recentes do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas houve um aumento de temperatura ambiente de aproximadamente 1,5°C acima da temperatura registrada no período pré-industrial (IPCC, 2019; 2023) e caso as emissões de gases de efeito estufa não sejam reduzidas, 30% das áreas de cultivo e exploração pecuária se tornarão impróprias (IPCC, 2019; 2023). Além disso, as altas temperaturas ambientais não se limitam mais às regiões tropicais e subtropicais do globo, uma vez



que já foi relatado um aumento na frequência e na intensidade das ondas de calor em zonas tradicionalmente temperadas da Europa (Morignat et al., 2014; Junk et al., 2019). Esse cenário, de difícil adaptação, faz do estresse térmico um fator limitante, reduzindo a expressão do potencial genético das espécies de interesse econômico e zootécnico (Alcamo et al., 2007).

A maior parte da população mundial está distribuída na região tropical, em áreas aonde a temperatura ambiente muitas vezes ultrapassa a zona de conforto térmico para diversas espécies (Campbell, 1985). A temperatura corporal dos mamíferos é estreitamente regulada pelo equilíbrio entre a quantidade de calor corporal e a quantidade de calor dissipada para o ambiente. Nesse contexto, o estresse térmico é caracterizado pelo aumento na quantidade de calor corporal (hipertermia) (Hansen, 2009) que ocorre quando o calor produzido pelo metabolismo animal e o calor absorvido do ambiente excede a capacidade do animal em dissipar calor (Prosser e Heath 1991; Toledo et al., 2019; Frigeri et al., 2023). A exposição de um animal endotérmico a temperatura ambiental elevada ativa os mecanismos de termorregulação, tais como: aumento da frequência respiratória, redirecionamento do fluxo sanguíneo dos órgãos para a periferia, vasodilatação, aumento da sudorese, alterações metabólicas, redução do consumo da matéria seca e aumento do consumo de água (Smith et al., 1993; West, 2003). Caso o animal não consiga dissipar calor suficientemente para manter a homeotermia, haverá custo para a homeostasia com alterações nos parâmetros fisiológicos, levando a redução no desempenho produtivo e reprodutivo do animal (Ferreira et al., 2006; Armstrong et al., 1994), além de tornar o mesmo mais suscetível a doenças (Silanikove et al., 2015).

No que tange a reprodução, o aumento da temperatura ambiente tem sido associado a redução de fertilidade em machos e fêmeas, especialmente nas raças *Bos taurus taurus*, que apresentam uma maior susceptibilidade a temperatura ambiente elevada (Hansen, 2009). Essa redução de fertilidade é evidenciada pela queda marcante nas taxas de gestação, sobretudo nos períodos mais quentes do ano (Bonini, 2019; Wolfenson e Roth, 2019). Nos animais de alta produção de leite, o calor ambiental, somado à demanda de calor metabólico gerado para produção de leite, promove perturbação na capacidade animal de manter a normotermia (Badinga et al. 1985; Hansen, 2007). A temperatura ambiente de 26 a 27°C sob alta umidade promove um aumento exponencial da temperatura corporal em vacas de alta produção de leite. Dessa forma, o aumento de 1 a 2°C na temperatura do ar pode induzir hipertermia severa nesses animais (Wolfenson e Roth, 2019) que podem sofrer os efeitos imediatos, tardios e multigeracionais do estresse térmico (Dahl et al., 2017; Wolfenson e Roth, 2019; Moura e Paula-Lopes, 2020).

Os efeitos imediatos e tardios do estresse térmico já foram constatados nos órgãos e células do trato reprodutor. Nas fêmeas, o estresse térmico compromete o fluxo sanguíneo para o útero (Roman-Ponce et al., 1978) e para a placenta (Reynolds et al., 2006; Dado-Senn et al., 2020), reduz a função do endométrio (Sakai et al., 2018, 2020; Bai et al., 2020) e do embrião inicial (Ealy et al., 1993; Paula-Lopes e Hansen, 2002b). Além disso, o eixo hipotálamo-hipófise-ovário é um dos alvos principais do estresse térmico, comprometendo o desenvolvimento folicular e oocitário (Moura e Paula-Lopes, 2020). Já em touros, o estresse térmico aumenta a temperatura escrotal e testicular, afetando a sequência orquestrada de eventos importantes para a espermatogênese (Garcia-Oliveros et al., 2022). Como consequência, o espermatozoide sofre limitações funcionais além de carregar alterações celulares e moleculares que interferem com os processos de fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (Alves et al., 2021; Silva et al., 2022). Dessa forma, esse artigo visa explorar os efeitos do estresse térmico no oócito e no espermatozoide cujo fenótipo pode ser detectado de forma imediata, tardia e entre gerações.

Efeitos do estresse térmico na fertilidade

Estudos pioneiros e emergentes, em diferentes regiões do globo, têm demonstrado os efeitos do estresse térmico sobre a fertilidade bovina (Dunlap e Vincent, 1971; Badinga et al., 1985; Al-Katanani et al., 1999; Pires et al., 2002; López-Gatius, 2003; Torres-Júnior et al., 2008; Wolfenson e Roth, 2019; Nanas et al., 2021; Lee et al., 2023). A exposição de vacas em lactação à temperatura elevada aumenta a temperatura corporal interna, resultando em estresse térmico e diminuição dos índices de gestação.

Um estudo retrospectivo conduzido no nordeste da Espanha, demonstrou que nos meses do verão as taxas de gestação após a primeira inseminação artificial caíram entre os anos de 1991 e 2000. Esta redução na taxa de gestação foi inversamente proporcional a produção de leite por vaca que aumentou de 7.800 kg em 1991 para 10.200 kg em 2000. Já nos meses do inverno, as taxas de gestação permaneceram constantes entre os anos de 1991 e 2000 (López-Gatius, 2003). Quando vacas em lactação foram expostas a um aumento de temperatura ambiente de 23,9°C para 32,2°C durante o verão tipicamente quente e úmido da Flórida, as taxas de concepção diminuíram de 52 para 32% (Badinga et al., 1985). De maneira similar,



no Brasil, a taxa de gestação de vacas Holandesas confinadas em *free stall* caiu de 71,2% no inverno para 45,7% no verão (Pires et al., 2002). Já na região da Grécia Central, quando vacas Holandesas foram inseminadas durante os meses de inverno ($ITU \leq 65$, $n = 3721$) e verão ($ITU \geq 76$, $n = 2388$) a probabilidade de perda embrionária precoce foi de 13 a 19% maior durante o verão em relação ao inverno. Além disso, a probabilidade de vacas gestantes foi de 10 a 15% maior durante os meses mais frios do ano (Nanas et al., 2021). Em Israel, que tem clima quente e seco, um estudo retrospectivo entre os anos 2000 e 2017 demonstrou que quando vacas de alta produção de leite foram expostas ao estresse térmico, a taxa de concepção caiu de 42,6% nos meses frios de inverno para 27,7%, no verão (Wolfenson e Roth, 2018).

Dados recentes indicam que o estresse térmico no terço inicial ou final da gestação pode comprometer a função reprodutiva da prole. Sabe-se que o estresse térmico durante a gestação afeta o desenvolvimento intrauterino do feto. O desenvolvimento pré-natal é um processo precisamente regulado devido plasticidade na diferenciação celular e na organogênese. Embora essa plasticidade tenha um papel importante para o desenvolvimento fetal, também torna o embrião altamente susceptível aos fatores ambientais (Khulan e Drake, 2012). Por exemplo, em vacas leiteiras, o estresse térmico no terço final da gestação resultou em efeitos multigeracionais/transgeracionais, reduzindo o peso ao nascer e a produção de leite da prole, além de causar problemas metabólicos e na imunidade desses animais, como recentemente revisado (Ouellet et al., 2020; Laporta, 2021). Em contraste, os efeitos multigeracionais/transgeracionais do estresse térmico na função reprodutiva ainda são escassos. Evidências do efeito do estresse térmico associado à estação da concepção e durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário no desempenho reprodutivo da prole foram demonstrados em estudos retrospectivos. Nesses estudos, o intervalo entre o parto e o primeiro serviço e entre o parto e a concepção foi maior na prole dos animais que conceberam nos meses do verão *versus* inverno (Pinedo e De Vries, 2017; Akbarinejad et al., 2017). O estresse térmico atrasou a primeira inseminação pós-parto, reduziu a taxa de concepção ao primeiro serviço e aumentou a taxa de descarte na prole de vacas submetidas ao estresse térmico no terço final da gestação (Akbarinejad et al., 2017). No entanto, o estresse térmico durante a concepção não afetou a idade à primeira inseminação (IA), a idade ao primeiro parto e o número de serviços por prenhez confirmada no dia 50 após a IA (Monteiro et al., 2016). Um estudo prospectivo demonstrou que vacas em lactação submetidas ao estresse térmico sazonal durante o primeiro trimestre da gestação sofreram redução na reserva ovariana das filhas, mas não houve efeito na fertilidade da prole ao primeiro serviço (Succu et al., 2020).

A redução nas taxas de gestação desencadeada pelo estresse térmico deve-se aos danos multifatoriais da temperatura elevada na fisiologia e nas células do sistema reprodutor. No entanto, os gametas estão entre os tipos celulares mais susceptíveis ao estresse térmico (Paula-Lopes et al., 2013; Moura e Paula-Lopes, 2020; Morrell, 2020), podendo sofrer alterações funcionais, celulares e moleculares que se estabelecem a curto, médio e longo prazo dependendo da severidade do estresse, da tolerância térmica da espécie, entre outros fatores.

Impactos do estresse térmico no gameta feminino

A linhagem germinativa feminina é formada dentro de folículos ovarianos, circundada por células do cumulus, células da granulosa e teca. A comunicação bilateral entre o gameta e as células foliculares é essencial para que os eventos de crescimento e maturação folicular e oocitária ocorram de forma orquestrada (Robert, 2021). No entanto, condições ambientais adversas podem comprometer as junções comunicantes e os processos citoplasmáticos transzonais do complexo cumulus-oócito (Yin et al., 2019). De acordo com a intensidade do estresse, o oócito e as células foliculares desencadeiam respostas adaptativas e/ou deletérias que surgem a curto, médio e/ou longo prazo (Báez et al., 2019; Latorraca et al., 2020; Moura et al., 2021; Cardone et al., 2022). Essas respostas comprometem a capacidade do oócito de ser fecundado, clivar e se desenvolver durante os períodos pré- e pós-implantacionais, além de poderem ser carregadas entre gerações (Moura e Paula-Lopes 2020; Macciotta et al., 2023).

Estudos *in vivo*

No folículo ovariano de mamíferos, um número finito de oócitos são mantidos em bloqueio meiótico na fase de prófase da primeira divisão meiótica, caracterizando o período de crescimento. Este período de crescimento do oócito é relativamente longo, variando entre as espécies (Miyano e Manabe, 2007; Hirao, 2012). Em bovinos, o oócito no estágio de vesícula germinativa (VG) permanece no folículo antral por 42 dias (Lussier et al., 1987), podendo sofrer oscilações de temperatura corporal acima de 40-41°C (Ealy et al., 1993), comprometendo a função oocitária antes da maturação. Quando oócitos imaturos



foram colhidos de vacas Holandesas expostas ao estresse térmico sazonal, houve redução na competência oocitária indicada pela queda no desenvolvimento embrionário após a fecundação *in vitro* ou ativação partenogênica (Rocha et al., 1998; Al-Katanani et al., 2002; Gendelman, 2010, 2012; Watanabe et al., 2017; Yaacobi-Artzi et al., 2022). O estresse térmico *in vivo* retardou a clivagem embrionária, aumentou a proporção de embriões com clivagem lenta além de reduzir a expressão dos genes GDF9, POU5F1, e GAPDH nesses embriões (Gendelman 2010). Nessa linha, um estudo recente indicou que oócitos em VG coletados de vacas lactantes durante o período mais quente do ano tiveram a morfocinética alterada quando comparado aos embriões gerados a partir de oócitos coletados nos meses do inverno (Yaacobi-Artzi et al., 2022).

O estudo realizado por Badinga (1985) na Universidade da Flórida foi pioneiro em demonstrar os efeitos tardios do estresse térmico na função reprodutiva de bovinos. A exposição de vacas leiteiras ao estresse térmico durante o verão reduziu os índices de concepção desde o verão até o início do outono (Badinga et al., 1985), indicando que o estresse térmico pode danificar o estoque de folículos e oócitos que iniciaram seu crescimento ainda no período quente. A fim de testar essa hipótese, Roth e colaboradores (2001) realizaram um estudo em que vacas Holandesas expostas ao estresse térmico sazonal do verão foram submetidas a aspiração folicular (OPU) no dia 4 do ciclo (Grupo controle) ou OPU repetidas nos dias 4, 7, 11 e 15 (Grupo tratado) por 4 ciclos estrais consecutivos durante os meses frios do outono. Os oócitos foram coletados no dia 4 de cada ciclo e submetidos a produção *in vitro* de embriões. As taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário aumentaram nos ciclos 3 e 4 do grupo tratado em relação ao controle (Roth et al., 2001). A remoção dos folículos danificados no verão acelerou a recuperação do pool de oócitos, levando ao surgimento precoce de folículos saudáveis e oócitos de alta qualidade. Assim, a competência oocitária só foi recuperada 2 a 3 ciclos estrais após o final do verão (Roth et al., 2001),

O estresse térmico durante a fase de crescimento do oócito pode também comprometer os eventos de reprogramação epigenética que ocorrem durante a gametogênese (Moura et al., 2022). A plasticidade do indivíduo de se ajustar as condições ambientais desafiadoras envolve a variação na condição epigenética das suas células. Quando este fenômeno ocorre durante a gametogênese ou embriogênese (plasticidade de desenvolvimento), que são períodos críticos para reprogramação epigenética, surgem riscos em potencial para a saúde futura (Bollati e Baccarelli, 2010). Evidências recentes sugerem que certas modificações epigenéticas podem ser transmitidas dos pais à progênie através dos gametas, e que modificações epigenéticas não são sempre completamente removidas entre as gerações.

O primeiro evento de desmetilação do DNA em nível genômico ocorre nas células germinativas primordiais (CGPs), quando os perfis epigenéticos preexistentes das células somáticas são apagados e os padrões gameta-específicos e sexo-específicos são estabelecidos no final da gametogênese (Smallwood e Kelsey, 2012). A fim de testar a hipótese de que o estresse térmico afeta a reprogramação da metilação de DNA que ocorre durante a fase de crescimento do oócito, um novo modelo *in vivo* usando câmara climática controlada foi estabelecido em camundongos. Para tanto, ninhadas da linhagem Suíça (geração F0), juntamente com as matrizes em lactação, foram aleatoriamente alocadas nas condições controle (21°C por 24h) ou estresse térmico (35°C por 12 horas do período de luz e 21°C por 12 h durante o período escuro) entre os dias 10 e 21 do desenvolvimento pós-natal (DPN). Nesse estudo o alvo do estresse térmico foi a primeira onda de metilação de DNA *de novo* que ocorre durante a gametogênese de camundongos nos dias 10 ao dia 21 do DPN. Após os tratamentos, as fêmeas das ninhadas foram mantidas na condição controle até a puberdade quando foi realizada a coleta dos oócitos. Os danos funcionais e celulares causados pelo estresse térmico no oócito foram moderados. No entanto, houve uma remodelação marcante no perfil global de metilação de DNA (tecnologia de sequenciamento de bissulfato de genoma completo - WGBS) caracterizada por hipometilação de citosinas e de regiões diferencialmente metiladas (Moura et al., 2022). Essas mudanças no perfil de metilação do oócito foram associadas a um fenótipo diferenciado na expressão de genes das vias de crescimento e competência de desenvolvimento do oócito.

Usando o mesmo modelo de estresse térmico Moura et al., (2023) avaliou o efeito transgeracional do estresse térmico moderado durante o crescimento do gameta feminino. Para tanto, as fêmeas da geração F0 que haviam sido expostas as condições controle (21°C por 24h) ou estresse (35°C por 12h/21°C por 12h), foram cruzadas com machos controle para gerar a progênie (Geração F1). As fêmeas F1 (e subsequentes progênie F2 e F3) foram acasaladas com machos controle sob condições de temperatura padrão para gerar gerações F2, F3 e F4, respectivamente (F0 foi a única geração exposta a HS). A produção *in vivo* de embriões foi realizada para gerações F0, F1, F2 e F4. No entanto, não houve efeito deletério do estresse térmico na produção de embriões *in vivo* ao longo das gerações (Moura et al., 2023).

Os efeitos do estresse térmico *in vivo* podem ser mediados pelos danos no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas que resultam em inúmeras disfunções hormonais e foliculares, comprometendo



indiretamente a competência oocitária. Já foi demonstrado que o estresse térmico compromete a esteroidogênese folicular reduzindo os níveis de androstenediona nas células da teca, reduzindo atividade da enzima aromatase nas células da granulosa e a concentração de estradiol no folículo dominante (Wolfenson et al., 1997; Bridges et al., 2005). Essas alterações da esteroidogênese folicular estão associadas a diminuição na intensidade (Gangwar et al., 1965) e duração (Abilay et al., 1975; Wolfenson et al., 1988) do cio durante os meses mais quentes do ano, causando irregularidades no ciclo estral (Sammad et al., 2020). Os efeitos do estresse térmico na esteroidogênese, juntamente com o aumento nos níveis de FSH (Wolfenson et al., 1995) e redução de inibina (Roth et al., 2000) interferem com a dinâmica folicular. Já foi demonstrado que o estresse térmico causa a emergência precoce do folículo dominante (Wolfenson et al., 1995) podendo levar ao envelhecimento do oócito, reduz a dominância folicular e aumenta o número de folículos pequenos (Roth et al., 2000). O recrutamento desses folículos para o pool de crescimento parece ser devido a uma diminuição nas concentrações circulantes de inibina e aumento da secreção de FSH. Além disso, os níveis reduzidos de estradiol podem comprometer o pico pré-ovulatório de LH. De fato, existem evidências de que o estresse térmico reduz os níveis de LH (Gilad et al., 1993; Armengol-Gelonch et al., 2017) que podem comprometer os eventos envolvidos na maturação oocitária (Putney et al., 1989; Rodrigues et al., 2019; Lee et al., 2023), ovulação (Ozawa et al., 2005) e luteinização (Wolfenson e Roth, 2019). Apesar dos efeitos do estresse térmico nas concentrações de progesterona variarem de acordo com a duração do estresse (Howell et al., 1994; Trout et al., 1998; Roth et al., 2000), há evidências de que a secreção lútea de progesterona foi suprimida pelo estresse térmico mais prolongado (Howell et al., 1994; NANAS et al., 2021). Os efeitos diretos do estresse térmico no crescimento e maturação oocitária foram elucidados em inúmeros experimentos *in vitro* que serão abordados a seguir.

Estudos *in vitro*

Os efeitos deletérios do estresse térmico no oócito e nos folículos antrais já foram bem caracterizados tanto *in vivo* como *in vitro*. No entanto, os efeitos a longo prazo do estresse térmico no *pool* de oócitos e folículos pré-antrais requer maiores investigações pois ainda são pouco conhecidos (Paes et al., 2016; Aguiar et al., 2020; Cardone et al., 2022). O modelo de cultivo folicular *in vitro* tem sido utilizado como ferramenta a fim de investigar a influência da temperatura elevada em folículos pré-antrais. No estudo realizado por Paes et al. (2016), diferentes estruturas foliculares (fragmentos ovarianos e folículos pré-antrais) foram cultivadas a 41°C por 12 horas seguido de 38,5°C por 7 dias. Nesse experimento, o choque térmico causou a ativação precoce dos folículos primordiais, reduziu a viabilidade de oócitos coletados de folículos primordiais e primários, e aumentou os níveis de ROS nesses folículos. Já exposição de folículos secundários ao choque térmico não afetou a porcentagem de folículos morfolologicamente normais, o diâmetro folicular e a formação do antro ao final de 7 dias de cultivo. De maneira similar, quando o tecido cortical ovariano foi submetido à hipertermia aguda (41°C/2h) houve redução no número e no diâmetro dos folículos primordiais, no número e na proliferação das células da granulosa, aumento no número de folículos degenerados e na apoptose em células da granulosa (Cardone et al., 2022). No entanto, quando um modelo de choque térmico crônico e intermitente (folículos cultivados a 38,5°C por 16 horas seguido de 41 °C por 8 horas diariamente) foi utilizado durante os 7 dias de cultivo folicular, Aguiar et al. (2020) demonstrou que o choque térmico reduziu o diâmetro e a viabilidade de folículos secundários, além de aumentar a expressão de BAX e HSPA1A. Dessa forma, o estresse térmico pode exercer efeitos a longo prazo no *pool* de folículos pré-antrais afetando negativamente a reserva ovariana bovina.

O modelo de maturação *in vitro* (MIV) tem sido amplamente empregado para avaliação dos efeitos diretos e imediatos da temperatura elevada no gameta feminino pois permite a modulação da severidade do estresse. Sabe-se que a intensidade do estresse é uma função entre temperatura e o tempo de exposição. Em um estudo recente Báez et al. (2019) modulou o tempo de exposição dos oócitos submetidos ao choque térmico de 41°C durante a MIV (6, 12, 18 e 22 horas). Nesse estudo, as disfunções induzidas pela temperatura elevada foram dependentes do tempo de exposição. Enquanto a porcentagem de oócitos em metáfase II já foi reduzida após 6 h de choque térmico, as taxas de fertilização, clivagem e desenvolvimento a blastocisto só foram afetadas após 12 h de choque térmico (Figura 1). De maneira similar, a intensidade do estresse foi modulada com base na temperatura. Quando oócitos bovinos foram expostos a temperatura severa e não fisiológica de choque térmico (43°C) durante as primeiras 12h de MIV, houve boqueio no desenvolvimento embrionário (Roth e Hansen, 2004b). Já a exposição de oócitos a temperatura moderada e fisiológica de choque térmico (40-41°C) durante as primeiras 12-14 h de MIV reduziu o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (Roth e Hansen, 2004a; Rodrigues et al., 2016, 2019; Lima et al., 2016; Ticianelli et al., 2016). Dependendo da intensidade do estresse, a temperatura elevada pode causar danos

reversíveis ou irreversíveis em diferentes estruturas e organelas celulares (Ju et al., 2005; Roth e Hansen, 2005), desencadeando respostas celulares adaptativas como a autofagia ou ativando vias de morte como a apoptose (Rodrigues et al., 2016; Latorraca et al., 2020; Moura et al., 2021). Entre as respostas adaptativas, podemos destacar também o fenômeno de termotolerância induzida. Por exemplo, oócitos coletados nos meses mais quentes do ano foram mais resistentes ao choque térmico severo do que aqueles coletados nos meses mais frios (Maya-Soriano et al., 2013), sugerindo que a exposição do oócito ao estresse moderado estimulou a produção de moléculas termoprotetores deixando o oócito mais resistente ao estresse severo.

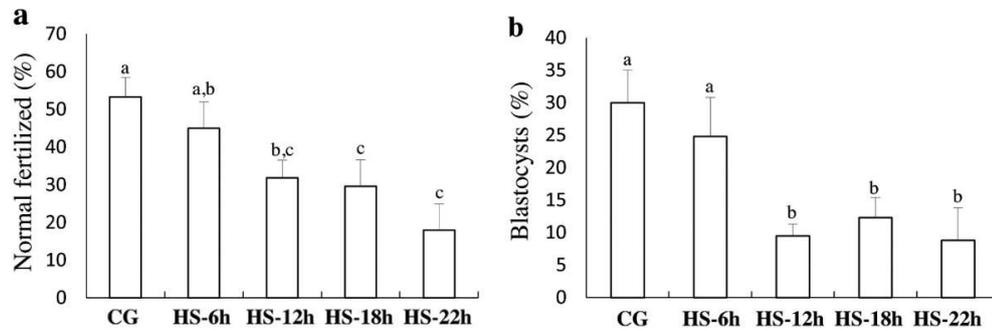


Figura 1. Efeito do choque térmico a 41°C por 6, 12, 18 e 22 horas durante a maturação *in vitro* na porcentagem de oócitos (a) fertilizados e (b) desenvolvidos a blastocisto. Os resultados são médias \pm sem. Letras diferentes em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). (Adaptado de Báez et al., 2019).

Entre as estruturas celulares afetadas pelo choque térmico, podemos destacar o citoesqueleto (Rodrigues et al., 2016; Lima et al., 2016), a zona pelúcida (Báez et al., 2019), os grânulos corticais (Edwards et al., 2005; Maya-Soriano et al., 2013; Ahmed et al., 2017), o retículo endoplasmático (Moura e Paula-Lopes 2020), as mitocôndrias (Rodrigues et al., 2016; Ahmed et al., 2017; Payton et al., 2018), o núcleo (Rodrigues et al., 2016), entre outras. Esse tópico foi recentemente revisado por Moura e Paula-Lopes (2020), desta forma vamos discutir apenas as alterações mais clássicas. Vários estudos já demonstraram que o choque térmico de 41°C compromete a dinâmica da progressão meiótica, reduzindo as taxas de oócitos em metáfase II (Roth e Hansen, 2005; Lima et al., 2016; Báez et al., 2019), devido ao bloqueio em metáfase I ou telófase I. Esse erro na progressão meiótica deve-se, em parte, a desorganização do citoesqueleto causada pelo choque térmico. A exposição de oócitos a temperatura elevada causou a desorganização dos microtúbulos tornando o fuso meiótico disforme nas metáfases I e II e os cromossomos desalinhados (Tseng et al., 2004; Roth e Hansen, 2005; Rodrigues et al., 2016). Além disso o choque térmico desorganizou os filamentos de actina, reduzindo o anel de actina cortical em oócitos maturados a 41 (Roth e Hansen, 2005; Rodrigues et al., 2016) e 41,5°C (Tseng et al., 2004).

Os filamentos de actina são responsáveis pela translocação dos grânulos corticais para a região cortical do oócito durante a maturação (Wessel et al., 2002). Quando oócitos em VG (Payton et al., 2004) e durante a MIV (Edwards et al., 2005) foram submetidos ao choque térmico de 41°C o padrão fisiológico de distribuição dos grânulos corticais foi comprometido. De maneira similar, a desorganização dos microtúbulos afeta o transporte de organelas citoplasmáticas, como por exemplo a distribuição das mitocôndrias no oócito (Sun et al., 2001). As mitocôndrias são alvos dos efeitos deletérios induzidos pela temperatura elevada. A exposição de oócitos bovinos no estágio de VG (Lima, 2012) e durante a MIV (Ispada et al., 2018) ao choque térmico reduziu a atividade mitocondrial oocitária. As alterações na atividade mitocondrial do oócito podem estar associadas ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ispada et al., 2018) e ativação da cascata de apoptose. Já foi demonstrado que a exposição de oócitos ao choque térmico durante a MIV aumentou a proporção de oócitos com alta atividade de caspases do grupo II (caspases 2, 3 e 7) (Roth e Hansen, 2004a) e positivos para TUNEL (Rodrigues et al., 2016; Lima et al., 2016).

Impactos do estresse térmico no gameta masculino

Em mamíferos, os machos possuem características morfológicas e fisiológicas próprias para a termorregulação escrotal, a fim de garantir que os eventos da espermatogênese ocorram de forma adequada



mantendo a viabilidade espermática. Contudo, tais características podem ser perturbadas por condições adversas de temperatura (Morrell, 2020). As variações sazonais na qualidade do sêmen de bovinos é um tópico que há muito chama atenção dos pesquisadores e pecuaristas. Essas variações seminais entre os meses de verão e inverno devem-se aos danos da temperatura elevada na espermatogênese associados às limitações na termorregulação escrotal e mecanismos de dissipação de calor (Alves et al., 2020; Garcia-Oliveros et al., 2022) podendo culminar com a degeneração testicular. Embora as alterações morfofuncionais espermáticas desencadeadas pelo estresse térmico já sejam bem descritas, as alterações moleculares permanecem sob intensa investigação.

Estudos *in vivo*

O efeito deletério do estresse térmico na fertilidade masculina tem sido amplamente investigado em mamíferos. Estudos conduzidos com modelos de estresse térmico sazonal (Sekoni e Gustafsson, 1987; Malama et al., 2017; Llamas Luceño et al., 2020), de câmara climática (Meyeroheffer et al., 1985; Ferreira, 2022) ou de insulação escrotal (Brito et al., 2003; Garcia, 2004; Pezzini et al., 2006; Rahman et al., 2011; Alves et al., 2020; Garcia-Oliveros et al., 2022) demonstraram que o aumento da temperatura escrotal e testicular compromete a espermatogênese bem como as características funcionais, celulares e moleculares do gameta masculino.

A exposição de touros Holandeses ao estresse térmico sazonal em zona subtropical seca comprometeu os parâmetros espermáticos avaliados pela análise computarizada de espermatozoides (CASA: motilidade total e progressiva, retilinearidade e a amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide), reduziu a porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas e com alto potencial de membrana mitocondrial (Malama et al., 2017). No entanto, quando o estresse térmico sazonal ocorreu em clima temperado, com um índice de temperatura e umidade (ITU) entre 77,9-80,5, não houve efeito deletério do estresse térmico nas características morfofuncionais espermáticas. No entanto, as taxas de blastocistos após a fecundação *in vitro* foram reduzidas e a eclosão dos blastocistos retardada (Llamas Luceño et al., 2020).

O efeito da temperatura testicular elevada tem sido frequentemente investigado com o modelo de insulação escrotal usando bolsas térmicas. Nesses experimentos, a insulação escrotal por 48 h em animais taurinos reduziu o número de espermatozoides por ejaculado (Pezzini et al., 2006), a motilidade e viabilidade espermática (Rahman et al., 2011). Houve também aumento na porcentagem de espermatozoides anormais (Austin et al., 1961; Vogler et al., 1991; Barth e Bowman, 1994; Rahman et al., 2011) e com deficiência de protaminação da cromatina (Rahman et al., 2011), além de mudanças no formato da cabeça do espermatozoide como indicado por análise de Fourier (FHA) (Rahman et al., 2011). Nesses estudos, Rahman et al. (2011) constataram que as células da linhagem espermatogênica são mais suscetíveis ao estresse térmico no estágio de espermiogênese, e posteriormente relacionou as causas das vulnerabilidades celulares aos períodos de substituições de histonas por protaminas, alterando a cromatina espermática.

Quando espermatozoides coletados de touros pré-insulação escrotal ou após 5 horas de insulação escrotal foram utilizados para fecundação *in vitro* a frequência de clivagem dos oócitos foi similar entre os períodos de pré-insulação e nos dias 7 e 14 pós-insulação escrotal. No entanto, no dia 21 pós-insulação a taxa de clivagem dos oócitos foi menor quando comparado aos outros períodos. Já as taxas de blastocistos, diminuíram nos dias 14 e 21 pós-insulação escrotal, quando comparado ao período de pré-insulação escrotal. Ainda neste estudo, os autores demonstraram que houve um aumento de espermatozoides morfológicamente anormais 14 dias pós-insulação escrotal, sendo que os defeitos de cabeça e cromatina aumentaram significativamente quando comparados ao período pré-insulação (Fernandes et al., 2008). Além de reduzir a capacidade fecundante do espermatozoide, a insulação escrotal também aumentou a porcentagem de blastômeros positivos para apoptose (Walters et al., 2005) e comprometeu a dinâmica da metilação do DNA no pró-núcleo paterno após a fecundação, ou seja, a metilação do DNA diminuiu gradualmente ao longo do tempo, mas não significativamente, quando comparado com o controle (Rahman et al., 2014).

Já em touros zebuínos, a insulação escrotal por 96 horas comprometeu as características morfofuncionais dos espermatozoides, como indicado pela redução na motilidade espermática, aumento na porcentagem de espermatozoides com defeitos maiores e menores, aumento na peroxidação lipídica, redução na porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial, bem como redução na porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas (Garcia-Oliveros et al., 2022). Além disso, a insulação escrotal reduziu a expressão de 18 micro RNAs no



espermatozoide. A análise funcional dos genes-alvo indicou o envolvimento das vias de ativação da transcrição, proliferação e diferenciação celular (Alves et al., 2021).

Experimentos em murinos usando modelos de câmara climática ou imersão corporal e testicular também ilustraram os efeitos da temperatura elevada na espermatogênese de animais adultos. Por exemplo, o aumento da temperatura escrotal em camundongos danificou a espermatogênese e o gameta masculino (Yaeram et al., 2006; Pérez-Crespo, 2008; Shadmehr et al., 2018). A exposição de camundongos adultos ao estresse térmico agudo e crônico comprometeu o DNA das células da linhagem germinativa, em especial dos espermátocitos e espermátides arredondadas (Houston et al., 2018). A redução no número de células espermátogênicas foi observada após o estresse térmico agudo por imersão corporal (43°C/15 minutos). Existem também evidências de que os danos no DNA espermáticos, como por exemplo a distorção da proporção X-Y nos espermatozoides, podem ser passíveis de transmissão à progênie (Perez-Crespo et al., 2008).

Apesar da vasta quantidade de estudos *in vivo* demonstrando os efeitos do estresse térmico em machos púberes, pouco se sabe sobre os efeitos desse desafio em animais pré-púberes. Estudos recentes demonstraram que o estresse térmico em camundongos machos pré-púberes exerceu efeitos imediatos, tardios e de longo prazo na função reprodutiva desses animais. Os animais pré-púberes foram submetidos às condições de estresse térmico (35°C 12h/claro e 21°C 12h/escuro) ou controle (21°C por 24h) em câmara climática entre os dias 10 e 21 do DPN. Esse estresse térmico moderado e crônico, reduziu o número de espermátocitos, espermátides arredondadas e alongadas, aumentou a porcentagem de túbulos seminíferos com atrofia, vacúolos e corpos residuais anormais em animais pré-púberes. Quando os animais atingiram a puberdade, a dinâmica da espermatogênese foi comprometida pelo estresse térmico, havendo aumento no número de espermatogônias e espermátides arredondadas versus uma redução no número de espermátocitos e espermátides alongadas. Os danos tubulares e a desorganização do epitélio germinativo também foram evidentes. A análise computarizada de espermatozoides (CASA) indicou que o estresse térmico na fase pré-púbere exerceu um efeito tardio reduzindo a hiperativação espermática após a puberdade. Quando os animais estressados foram cruzados houve aumento na porcentagem de oócitos não fertilizados e redução na porcentagem de blastocistos e estruturas viáveis (Ferreira, 2022). Além disso, uma vez que os animais atingiram a meia-idade (12-14 meses após o estresse térmico) o estresse térmico não afetou os parâmetros do CASA, mas reduziu a contagem de espermatozoides epididimários.

Estudos e *in vitro*

Enquanto os estudos *in vivo* demonstraram como a temperatura corporal e testicular elevada afetam a espermatogênese, os estudos *in vitro*, conduzidos com espermatozoides pós-ejaculados, refletem os efeitos da temperatura elevada no espermatozoide maduro. Nesse caso, o espermatozoide pode sofrer estresse térmico durante o transporte no trato reprodutor feminino. No entanto, o espermatozoide maduro tem capacidade reduzida de responder aos insultos ambientais em virtude da arquitetura condensada da cromatina que confere um estado transcricionalmente silencioso (Dadoune, 2003; Meistrich et al., 2003; Johnson et al., 2011).

Inúmeros experimentos já demonstraram que em espermatozoides bovinos o choque térmico de 41-41,5°C por 3 ou 4 horas reduziu a motilidade espermática (Monterroso et al., 1995; Chandolia et al., 1999; Hendricks et al., 2009; Rahman et al., 2014; Silva et al., 2022), a integridade da membrana plasmática, o potencial de membrana mitocondrial (PMM) (Hendricks et al. 2009; Rahman et al. (2014); Maya-Soriano et al., 2013) e a atividade mitocondrial (Silva et al., 2022), além de aumentar a porcentagem de espermatozoides com o acrossoma reagido (Maya-Soriano et al., 2013). O choque térmico de 41°C por 4 horas também aumentou a concentração das ROS e a atividade de enzimas caspases no espermatozoide (Silva et al., 2022), indicando que os efeitos da temperatura no espermatozoide podem ser mediados pelo aumento de ROS. Sabe-se que a célula espermática é vulnerável aos danos oxidativos, pois a pequena quantidade de citoplasma do espermatozoide limita o sistema antioxidante enzimático (Mazur et al., 2000). Além disso, a abundância de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) nas membranas espermáticas (Parks e Hammerstedt, 1985) torna essa célula mais vulnerável às ROS. O desequilíbrio nos níveis de ROS danifica DNA, proteínas, lipídios e outros componentes celulares comprometendo a função espermática (Du Plessis et al., 2010) e induzindo a morte celular por apoptose (Liu et al., 1996, Du et al., 2000).

A incubação dos espermatozoides em temperaturas moderadas como 38,5 e 40°C reduziu as taxas de clivagens, mas não afetou o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Hendricks et al., 2009). Já o choque térmico de 41 °C por 4 horas reduziu a proporção de oócitos fecundados (formação de pró-núcleos), clivados, e que progrediram até os estádios de 2-células (Silva et al., 2022) e blastocistos em



comparação ao controle (Rahman et al., 2014; Silva et al., 2022). O choque térmico espermático comprometeu de forma marcante a cinética do desenvolvimento embrionário inicial e das clivagens (Silva et al., 2022). A qualidade do embrião foi negativamente afetada pelo choque térmico no espermatozoide havendo uma maior proporção de apoptose celular em blastocistos D7 em comparação ao grupo controle (Rahman et al., 2014). Sabe-se que o espermatozoide desempenha um papel fundamental no transporte do genoma paterno para o oócito durante a fertilização. No entanto, as evidências indicam que o espermatozoide também contribui com uma variedade de RNAs (Ostermeier et al., 2004; Miller et al., 2010) durante a fecundação. Estes RNAs (por exemplo, miRNAs) são essenciais para as primeiras clivagens embrionárias e para prole saudável (Liu et al., 2012; Rodgers et al., 2015). Um estudo recente identificou mais de 300 micro RNAs no espermatozoide maduro. Entre estes, três e sete micro RNAs foram identificados exclusivamente em espermatozoides expostos a 35 e 41°C, respectivamente. Além disso, o miR-181d, envolvido na indução de apoptose através da via PI3K/AKT/mTOR (Tang et al., 2020), foi enriquecido em espermatozoides expostos a temperaturas mais altas (Silva et al., 2022).

Considerações finais

O aumento crescente da temperatura ambiente tem exacerbado os desafios associados à fertilidade animal. Os danos desencadeados pelo estresse térmico nos gametas feminino e masculino causam alterações funcionais já conhecidas, mas que resultam em um fenótipo celular e molecular apenas parcialmente compreendido. A dinâmica temporal na qual essas alterações são estabelecidas e carregadas é também um aspecto que requer maior atenção. A intensidade do estresse, bem como as respostas termoprotetoras específicas de cada gameta influenciam a natureza imediata, tardia e transgeracional do dano, sendo este último ainda pouco explorado. Embora existam abordagens visando contornar os efeitos do estresse térmico, essas medidas permitem apenas uma melhora parcial na eficiência reprodutiva. Novos estudos são necessários a fim de permitir o desenvolvimento de estratégias múltiplas de mitigação e melhores adequações de manejo essenciais para manter o bem-estar animal, a preservação do potencial genético e a qualidade reprodutiva.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2017/20125-3) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Referências

- Abilay TA, Johnson HD e Madan M.** Influence of environmental heat on peripheral plasma progesterone and cortisol during the bovine estrous cycle. *Journal of dairy science*, v.58, n.12, p.1836-1840, 1975.
- Akbarinejad V, Gharagozlou F e Vojgani M.** Temporal effect of maternal heat stress during gestation on the fertility and anti-Müllerian hormone concentration of offspring in bovine. *Theriogenology*, 99, 69-78, 2017.
- Ahmed JA, Nashiruddullah N, Dutta D, Biswas RK e Borah P.** Cumulus cell expansion and ultrastructural changes in in vitro matured bovine oocytes under heat stress. *Iranian journal of veterinary research*, 18(3), 203, 2017.
- Alcamo J, Dronin N, Endejan M, Golubev G e Kirilenko A.** A new assessment of climate change impacts on food production shortfalls and water availability in Russia. *Global Environmental Change*, 17(3-4), 429-444, 2007.
- Al-Katanani YM, Webb DW e Hansen, PJ.** Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *Journal of Dairy Science*. 82(12):2611-2616, 1999.
- Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF e Hansen PJ.** Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.2, p.390-396, 2002.
- Alves MBR, de Arruda RP, Batissaco L, Garcia-Oliveros LN, Gonzaga VHG, Nogueira VJM, Almeida FDS, Pinto SCC, Andrade GM, Perecin F, da Silveira JC e Celeghini, ECC.** Changes in miRNA levels of sperm and small extracellular vesicles of seminal plasma are associated with transient scrotal heat stress in bulls. *Theriogenology*, 161, 26-40, 2021.
- Armstrong LE, Maresh CM, Castellani JW, Bergeron MF, Kenefick RW, LaGasse KE, Riebe D.**



- Urinary indices of hydration status. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 4(3):265-79, 1994.
- Armengol-Gelonch R, Mallo JM, Ponté D, Jimenez A, Valenza A, Souza AH.** Impact of phase of the estrous cycle and season on LH surge profile and fertility in dairy cows treated with different GnRH analogs (gonadorelin vs. buserelin). *Theriogenology*, 91:121-126, 2017.
- Austin JW, Murphree R e Hupp E.** Effect of scrotal insulation on semen of Hereford bulls. *Journal of Animal Science*, 20(2), 307, 1961.
- Bai H, Ukita H, Kawahara M, Mitani T, Furukawa E, Yanagawa Y, Yabuuchi N, Kim H e Takahashi M.** Effect of summer heat stress on gene expression in bovine uterine endometrial tissues. *Animal Science Journal*, v.91, n.1, p.13474, 2020.
- Báez F, Camargo A, Reyes AL, Márquez A, Paula-Lopes FF e Viñoles C.** Time-dependent effects of heat shock on the zona pellucida ultrastructure and in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Reproductive Biology*, v.19, n.2, p.195–203, 1 jun. 2019.
- Badinga L, Thatcher WW, Diaz T, Drost M e Wolfenson D.** Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 39:797-810, 1993.
- Badinga L, Collier RJ, Thatcher WW e Wilcox CJ.** Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *J Dairy Sci*, 68:78-85, 1985.
- Barth AD e Bowman PA.** The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *The Canadian Veterinary Journal*, 35(2), 93, 1994.
- Boni, R.** Heat stress, a serious threat to reproductive function in animals and humans. *Molecular Reproduction and Development*, v.86, n.10, p.1307-1323, 2019.
- Bollati V & Baccarelli A.** Environmental epigenetics. *Heredity*, 105(1), 105-112, 2010
- Brito LF, Silva AE, Barbosa RT, Unanian MM e Kastelic JP.** Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. *Animal reproduction science*, v.79, n.1-2, p.1-15, 2003.
- Bridges PJ, Brusie MA, e Fortune JE.** Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domestic animal endocrinology*, v.29, n.3, p.508-522, 2005.
- Brown BM, Stallings JW, Clay JS e Rhoads ML.** Correction: Periconceptional Heat Stress of Holstein Dams Is Associated with Differences in Daughter Milk Production and Composition during Multiple Lactations. *PLoS ONE*, v.11, n.2, p.150049, 1 fev. 2016b.
- Camargo LSA, Aguirre-Lavin T, Adenot P, Araujo TD, Mendes VRA, Louro ID, Beaujea, N e Souza, E. D.** Heat shock during in vitro maturation induces chromatin modifications in the bovine embryo. *Reproduction*, v.158, n.4, p.313–322, 1 out. 2019.
- Campbell, B. L.** Uncertainty as symbolic action in disputes among experts. *Social studies of science*, v.15, n.3, p.429-453, 1985.
- Cardone DA, Cáceres ARR, Sanhueza MA, Bruna FA e Laconi MR.** Effects of short-term in vitro heat stress on bovine preantral follicles. *Livestock Science*, v.264, p.105076, 1 out. 2022.
- Chandolia RK, Reinertsen EM e Hansen PJ.** Lack of breed differences in responses of bovine spermatozoa to heat shock. *Journal of dairy science*, 82(12), 2617-2619, 1999.
- Dado-Senn B, Laporta J, Dahl GE.** Carry over effects of late-gestational heat stress on dairy cattle progeny. *Theriogenology*, 2020.
- Dadoune JP.** Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy research and technique*, 61(1), 56-75, 2003.
- Aguiar LH, Hyde KA, Pedroza GH e Denicol AC.** Heat stress impairs in vitro development of preantral follicles of cattle. *Animal reproduction science*, v.213, p.106277, 1 fev. 2020.
- Dahl G E, Skibiell AL, Laporta J.** In Utero Heat Stress Programs Reduced Performance and Health in Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 2019.
- Dahl GE, Tao S, Laporta J.** Triennial lactation symposium/bolfa: Late gestation heat stress of dairy cattle programs dam and daughter milk production. *Journal of Animal Science*, v.95, n.12, p.5701, 1 dez. 2017.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L e Wang X.** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c–dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33-42, 2000.
- Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E e Agarwal A.** The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 7(3), 153-161, 2010.
- Silva, DDF, Rodrigues TA, da Silveira JC, Gonella-Diaza A, Binelli M, Lopes JV, Moura MT e Paula-Lopes F F.** Cellular responses and microRNA profiling in bovine spermatozoa under heat shock. *Reproduction*, v.164, n.4, p.155–168, 1 out. 2022.



- Dunlap SE e Vincent CK.** Influence of postbreeding thermal stress on conception rate in beef cattle. *Journal of animal science*, 32:1216-1218, 1971.
- Ealy AD, Drost M e Hansen PJ.** Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal of Dairy Science*, 76:2899-2905, 1993.
- 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*, 88:4326-4333, 2005.
- Ferreira F, Pires MFA, Martinez ML, Coelho SG, Carvalho AU, Ferreira PM, Facury Filho EJ e Campos WE.** Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.5, p.732-738, 2006.
- Ferreira GH.** Efeitos do estresse térmico na espermatogênese de camundongos: aspectos celulares e epigenéticos. 2022. *Dissertação (Mestrado em Biologia Química) – Universidade Federal de São Paulo, Diadema, São Paulo, 2022.*
- Ferreira FC, Marcondes MI, Santos JEP e De Vries A.** Economic analysis of the use of in vitro produced embryos transferred during heat stress under dairy herd constraints. *Animal*, v.15, n.2, p.100117, 1 fev, 2021.
- Fernandes CE, Dode MAN, Pereira D e Silva AEDF.** Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, 70(9), 1560-1568, 2008.
- Frigeri KDM, Kachinski KD, Ghisi NDC, Deniz M, Damasceno FA, Barbari M, Herbut P e Vieira, FMC.** Effects of Heat Stress in Dairy Cows Raised in the Confined System: A Scientometric Review. *Animals*, v.13, n.3, p.350, 1 fev, 2023.
- Garcia-Oliveros LN, de Arruda RP, Batissaco L, Gonzaga VH, Nogueira VJM, Florez-Rodriguez SA, Almeida FDS, Alves MBR, Pinto SCCosta, Nichi M, Losano JDA, Kawai GK e Celeghini ECC.** Chronological characterization of sperm morpho-functional damage and recovery after testicular heat stress in Nellore bulls. *Journal of Thermal Biology*, 106, 103237, 2022.
- Garcia AR.** Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (*Bos taurus taurus*). 2004. *Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, 2004.*
- Gangwar PC, Branton C e Evans DL.** Reproductive and physiological responses of Holstein heifers to controlled and natural climatic conditions. *Journal of dairy science*, v. 48, n. 2, p. 222-227, 1965.
- Gendelman M e 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. *Animal Reproduction Science*, v. 134, n. 3-4, p. 125-134, 1 out. 2012.
- Gendelman M, Aroyo A, Yavin S e Roth Z.** Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, v. 140, n. 1, p. 73-82, 2010.
- Gilad E, Meidan R, Berman A, Graber, Y e Wolfenson D.** Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *Journal of reproduction and fertility*, v. 99, n. 2, p. 315-321, 1993.
- Gunn KM, Holly MA, Veith TL, Buda AR, Prasad R, Rotz, CA, Soder KJ e Stoner AM.** Projected heat stress challenges and abatement opportunities for U.S. milk production. *PloS one*, v.14, n.3, p.e0214665, 1 mar. 2019.
- Hansen PJ.** Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, v. 68, n. SUPPL. 1, p.S242-S249, 1 set. 2007.
- Hansen PJ.** Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.364, n.1534, p.3341-3350, 27 nov. 2009.
- Hendricks KEM, Martins L e Hansen PJ.** Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to post-ejaculatory aging and heat shock: development to the blastocyst stage and sex ratio. *Journal of Reproduction and Development*, 55(1), 69-74, 2009.
- Hirao Y.** Oocyte growth in vitro: potential model for studies of oocyte-granulosa cell interactions. *Reproductive medicine and biology*, v.11, p.1-9, 2012.
- Houston BJ, Nixon B, Martin JH, De Iuliis GN, Trigg NA, Bromfield EG, McEwan Kristen E e Aitken RJ.** (2018). Heat exposure induces oxidative stress and DNA damage in the male germ line. *Biology of reproduction*, 98(4), 593-606, 2018.
- Howell JL, Fuquay JW e Smith AE.** Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. *Journal of dairy science*, v.77, n.3, p.735-739, 1994.



- IPCC 2019.** IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. [s.l.: s.n.]. (<https://www.ipcc.ch/srccl/>).
- IPCC 2023.** Climate Science 2030. **Food and climate change.** Disponível em: <https://climatescience2030.com/food-and-climate-change/>. Acesso em 8 de abril de 2023.
- Ispada J, Rodrigues TA, Risolia PHB, Lima RS, Gonçalves DR, Rettori D, Nich M, Feitosa WB e Paula-Lopes FF.** Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(9), 1169-1179, 2018.
- Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G e Krawetz SA.** The sperm nucleus: chromatin, RNA and the nuclear matrix. *Reproduction (Cambridge, England)*, 141(1), 21, 2011.
- Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE e Yang X.** Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 64, n. 8, p. 1677-1689, 1 nov. 2005.
- Junk J, Goergen K, Krein A.** Future Heat Waves in Different European Capitals Based on Climate Change Indicators. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(20):3959., 2019.
- Khulan B e Drake AJ.** Glucocorticoids as mediators of developmental programming effects. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 26(5), 689-700, 2012.
- Laporta J.** ADSA Foundation Scholar Award: Early-life exposure to hyperthermia: Productive and physiological outcomes, costs, and opportunities. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 11, p. 11337-11347, 1 nov. 2021.
- Latorraca LB, Feitosa WB, Mariano C, Moura MT, Fontes PK, Nogueira MF e Paula-Lopes FF.** Autophagy is a pro-survival adaptive response to heat shock in bovine cumulus-oocyte complexes. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- Lee J, Kim D, Son J, Kim D, Jeon E, Jung D, Han M, Ha S, Hwang S e Choi I.** Effects of heat stress on conception in Holstein and Jersey cattle and oocyte maturation in vitro. *Journal of Animal Science and Technology*, 65, n. 2, p. 324, 2023.
- Lima RS, Risolia PH, Ispada J, Assumpção ME, Visintin JA, Orlandi C e Paula-Lopes FF.** Role of insulin-like growth factor 1 on cross-bred *Bos indicus* cattle germinal vesicle oocytes exposed to heat shock. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 29, n. 7, p. 1405-1414, 10 jul. 2016.
- Lima RS.** O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa. Botucatu, Brazil: UNESP. Thesis. 2012.
- Liu, WM, Pang, RT, Chiu, PC, Wong, BP, Lao, K., Lee, KF e Yeung, WS.** Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, n. 2, p. 490-494, 2012.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemerson R, e Wang X.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1), 147-157, 1996.
- Luceño NL, Angrimani DDSR, De Cássia B, L., Szymańska, KJ, Van Poucke M, Demeyere K, Meyer E, Peelman L, Mullaart E, Broekhuise MLWJ e Soom, AV.** Exposing dairy bulls to high temperature-humidity index during spermatogenesis compromises subsequent embryo development in vitro. *Theriogenology*, v. 141, p. 16-25, 1 jan. 2020.
- López-Gatius F.** Is fertility declining in dairy cattle? a retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology*, v. 60, n. 1, p. 89-99, 2003.
- Lussier, JG, Matton P e Dufour JJ.** Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Reproduction*, v. 81, n. 2, p. 301-307, 1987.
- Macciotta NP, Dimauro C, Degano L, Vicario D e Cesarani A.** A transgenerational study on the effect of great-granddam birth month on granddaughter EBV for production traits in Italian Simmental cattle. *Journal of Dairy Science*, 106(4), 2588-2597, 2023.
- Maya-Soriano MJ, Taberner E, Sabés-Alsina M e López-Béjar M.** Retinol might stabilize sperm acrosomal membrane in situations of oxidative stress because of high temperatures. *Theriogenology*, 79(2), 367-373, 2013.
- Malama E, Zeron Y, Janett F, Siuda M, Roth Z e Bollwein H.** Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology*, 87, 79-90, 2017.
- Maya-Soriano MJ, López-Gatius F, Andreu-Vázquez C e López-Béjar M.** Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. *Theriogenology*, 79(2), 299-305, 2013.
- Mazur P, Katkov II, Katkova N e Critser JK.** The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology*, 40(3), 187-209, 2000.



- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR e Zhao M.** Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, 111, 483-488, 2003.
- Meyerhoeffter DC, Wettemann RP, Coleman SW e Wells ME.** Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. *Journal of Animal Science*, 60(2), 352-357, 1985.
- Miller D, Brinkworth M & Iles D.** Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*, 139(2), 287-301, 2010.
- Monterroso VH, Drury KC, Ealy AD, Edwards JL e Hansen PJ.** Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. *Theriogenology*, 44(7), 947-961, 1995.
- Monteiro APA, Tao S, Thompson IMT & Dahl GE.** In utero heat stress decreases calf survival and performance through the first lactation. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 8443-8450, 2016.
- Morrell JM.** Heat stress and bull fertility. *Theriogenology*, v. 153, p. 62-67, 1 set. 2020.
- Moura MT e Paula-Lopes FF.** Thermoprotective molecules to improve oocyte competence under elevated temperature. *Theriogenology*, 156, 262-271, 2020.
- Moura MT, Carvalho, CAI, de Barros F, Mossa F, Bebbere D e Paula-Lopes FF.** Heat stress alters oocyte genome-wide DNA methylation patterns revealed at single base resolution. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 34, n. 2, p. 290-290, 2022.
- Moura MT, Carvalho CAI, Barros FRO, Mossa F, Bebbere D e Paula-Lopes FF.** Effect of heat stress during mice germ-cell DNA methylation programming on oocyte developmental competence: A preliminary study. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 33, n. 2, p. 153-153, 2021.
- Moura MT, De Barros FR, Mossa F, Bebbere D e Paula-Lopes FF.** 155 Elevated temperature on the phenotypic plasticity of female mice across five generations. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 35, n. 2, p. 205-206, 5 dez. 2023.
- Morignat E, Perrin JB, Gay E, Vinard JL, Calavas D, Hénaux V.** Assessment of the impact of the 2003 and 2006 heat waves on cattle mortality in France. *PLoS One*. 4;9(3):e93176., 2014.
- Miyano T e Manabe N.** Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, v. 63, p. 531-538, 2007.
- Nanas I, Chouzouris TM, Dovolou E, Dadouli K, Stamperna K, Kateri I, Barbagianni M e Amiridis GS.** Early embryo losses, progesterone and pregnancy associated glycoproteins levels during summer heat stress in dairy cows. *Journal of Thermal Biology*, v. 98, 2021.
- Ozawa M, Tabayashi D, Latief TA, Shimizu T, Oshima I e Kanai Y.** Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. *Reproduction*, v. 129, n. 5, p. 621-630, 2005.
- Ouellet V, Laporta J, Dahl GE.** Late gestation heat stress in dairy cows: Effects on dam and daughter. *Theriogenology*, v. 150, 2020.
- Paula-Lopes FF, Hansen PJ.** Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of reproduction*, v. 66, n. 4, p. 1169-1177, 2002b.
- Paula-Lopes FF, Hansen PJ.** Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 295, n. 1, p. 37-42, 2002a.
- Paula-Lopes FF, Lima RSD, Satrapa RA & Barros CM.** Physiology and endocrinology symposium: Influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. *Journal of Animal Science*, 91(3), 1143-1153, 2013.
- Paes VM, Vieira LA, Correia HHV, Sa NAR, Moura AAA, Sales AD, Rodrigues A.P.R, Magalhães-Padilha DM, Santos FW, Apgar GA, Campello CC, Camargo LSA e 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*, v. 86, n. 4, p. 994-1003, 1 set. 2016.
- Parks JE e Hammerstedt RH.** Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biology of Reproduction*, 32(3), 653-668. 1985.
- Payton, RR, Romar R, Coy P, Saxton AM, Lawrence JL e Edwards JL.** Susceptibility of Bovine Germinal Vesicle-Stage Oocytes from Antral Follicles to Direct Effects of Heat Stress In Vitro. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 4, p. 1303-1308, 1 out. 2004.
- Payton RR, Rispoli LA, Nagle KA, Gondro C, Saxton AM, Voy BH e Edwards JL.** Mitochondrial-related consequences of heat stress exposure during bovine oocyte maturation persist in early embryo development. *Journal of Reproduction and Development*, 64(3), 243-251, 2018.
- Pinedo PJ e De Vries A.** Season of conception is associated with future survival, fertility, and milk yield of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6631-6639, 2017.
- Pezzini TG, Sartori R, Silva TADSN, McManus C e Mariante ADS.** Características seminais de touros



- Curraleiros e Holandeses submetidos a insulação escrotal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, p. 863-868, 2006.
- Pérez-Crespo M, Pintado B e Gutiérrez-Adán A.** Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75(1), 40-47, 2008.
- Pires MFA, Ferreira AM, Saturnino HM e Teodoro RL.** Taxa de gestação em fêmeas da raça Holandesa confinadas em free stall, no verão e inverno. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54:57-63, 2002.
- Prosser CL, Heath JE.** Temperature. In *Comparative animal physiology, environmental and metabolic animal physiology* (ed. C. L. Prosser), pp. 109 – 166, 4th edn. New York, NY: John Wiley e Sons. 1991.
- Putney DJ, Mullins S, Thatcher WW, Drost M e Gross TS.** Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 19, n. 1-2, p. 37-51, 1989.
- Rahman MB, Vandaele L, Rijsselaere T, El-Deen MS, Maes D, Shamsuddin M e Van Soom A.** Bovine spermatozoa react to in vitro heat stress by activating the mitogen-activated protein kinase 14 signalling pathway. *Reproduction, fertility, and development*, v. 26, n. 2, p. 245–257, 2014.
- Rahman MB, Vandaele L, Rijsselaere T, Maes D, Hoogewijs M, Frijters A, Noordman J, Granados A, Dernelle E, Shamsuddin M, Parrish JJ e Van Soom A.** Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. *Theriogenology*, 76(7), 1246-1257, 2011.
- Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Borowicz PP, Luther JS, Wallace JM, Wu G e Spencer TE.** Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *Journal of Physiology*, 2006.
- Rhoads ML.** Effects of periconceptional heat stress on primiparous and multiparous daughters of Holstein dairy cows. *Theriogenology*, v. 150, 2020.
- Rodrigues TA, Ispada J, Risolia PH, Rodrigues MT, Lima RS, Assumpção ME, Visintin JA e Paula-Lopes, FF.** Thermoprotective effect of insulin-like growth factor 1 on in vitro matured bovine oocyte exposed to heat shock. *Theriogenology*, v. 86, n. 8, p. 2028–2039, 1 nov. 2016.
- Rodrigues TA, Tuna KM, Alli AA, Tribulo P, Hansen PJ, Koh J e Paula-Lopes FF.** Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 31, n. 5, p. 888-897, 2019.
- Rodgers, AB, Morgan, CP, Leu, NA e Bale, TL.** Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, n. 44, p. 13699-13704, 2015.
- Robert C.** Nurturing the egg: the essential connection between cumulus cells and the oocyte. *Reproduction, Fertility and Development*, 34(2), 149-159, 2021.
- Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA e Hansel W.** High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos taurus* cows. *Theriogenology*, v. 49, n. 3, p. 657-665, 1998.
- Rocha, A, Randel, RD, Broussard, JR, Lim, JM, Blair, RM, Roussel, JD, Godke, RA e Hansel, W.** High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos taurus* cows. *Theriogenology*, 49, n. 3, p. 657-665, 1998.
- Roman-Ponce, H, Thatcher, WW, Caton, D, Barron, DH e Wilcox, C. J.** Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. *Journal of animal science*, 46, n. 1, p. 175-180, 1978.
- Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R, e 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, n. 5, 2001.
- Roth Z, Meidan R, Braw-Tal R e Wolfenson D.** Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *Journal of reproduction and fertility*, v. 120, n. 1, p. 83-90, 2000.
- Roth Z, Aroyo A, Yavin S, e Arav A.** The antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) moderates the deleterious effects of maternal hyperthermia on follicle-enclosed oocytes in mice. *Theriogenology*, v. 70, n. 6, p. 887–897, 1 out. 2008.
- Roth Z e Hansen PJ.** Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biology of reproduction*, 71, n. 6, p. 2072-2078, 2004b.
- Roth Z e Hansen PJ.** 2005. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, 129:235-244, 2005.



- Roth Z.** Effect of heat stress on reproduction in dairy cows: insights into the cellular and molecular responses of the oocyte. *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 5, p. 151–170, 15 fev. 2017.
- Roth Z.** Cooling is the predominant strategy to alleviate the effects of heat stress on dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 57, n. S1, p. 16–22, 1 jan. 2022.
- Roth Z e Hansen PJ.** Involvement of Apoptosis in Disruption of Developmental Competence of Bovine Oocytes by Heat Shock During Maturation. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 6, p. 1898–1906, 1 dez. 2004.
- Sakatani M.** Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. *The Journal of Reproduction and Development*, v. 63, n. 4, p. 347, 2017.
- Sakai S, Hagihara N, Kuse M, Kimura K e Okuda K.** Heat stress affects prostaglandin synthesis in bovine endometrial cells. *Journal of Reproduction and Development*, v. 64, n. 4, p. 311-317, 2018.
- Sakai S, Hatabu T, Yamamoto Y e Kimura K.** Alteration of chemokine production in bovine endometrial epithelial and stromal cells under heat stress conditions. *Physiological Reports*, v. 8, n. 22, p. 14640, 2020.
- Sammad A, Umer S, Shi R, Zhu H, Zhao X e Wang Y.** Dairy cow reproduction under the influence of heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 104, n. 4, p. 978–986, 1 jul. 2020.
- Sejian V, Bhatta R, Gaughan JB, Dunshea FR e Lacetera N.** *Adaptation of animals to heat stress.* *Animal*, v. 12, n. s2, p. s431–s444, 1 jan. 2018.
- Sekoni VO e Gustafsson B K.** Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. *British Veterinary Journal*, 143(4), 312-317, 1987.
- Silanikove N e Koluman N.** Impact of climate change on the dairy industry in temperate zones: Predications on the overall negative impact and on the positive role of dairy goats in adaptation to earth warming. *Small Rumin. Res*;123(1):27–34., 2015.
- Shadmehr S, Tabatabaei SRF, Hosseinifar S, Tabandeh MR e Amiri A.** Attenuation of heat stress-induced spermatogenesis complications by betaine in mice. *Theriogenology*, 106, 117-126, 2018.
- Succu S, Sale S, Ghirello G, Ireland JJ, Evans ACO, Atzori AS e Mossa F.** Exposure of dairy cows to high environmental temperatures and their lactation status impairs establishment of the ovarian reserve in their offspring. *Journal of dairy science*, 103(12), 11957-11969, 2020.
- Smallwood SA e Kelsey G.** De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends in Genetics*, v. 28, n. 1, p. 33-42, 2012.
- Smith DF, Sullivan WP, Marion, TN, Zaitso K, Madden B, McCormick DJ e Toft DO.** Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Molecular and cellular biology*.13(2):869-76., 1993.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Schatten H.** 2001. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction*, 122:155–163, 2001.
- Tang D, Gao W, Yang J, Liu J, Zhao J, Ge J, Chen Q e Liu B.** miR-181d promotes cell proliferation via the IGF1/PI3K/AKT axis in glioma. *Molecular Medicine Reports*, 22(5), 3804-3812, 2020.
- Takahashi M.** Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. *Reproductive medicine and biology*, v. 11, n. 1, p. 37-47, 2012.
- 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 e Paula-Lopes FF.** Gene expression profile in heat-shocked Holstein and Nelore oocytes and cumulus cells. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 29, n. 9, p. 1787-1802, 2017.
- Toledo IM, Bucklin RA, Dahl GE e Beede DK.** Methods to Relieve Heat Stress for Florida Dairies: CIR782/AE022, rev. 2/2019. *EDIS*, v. 2019, n. 3, 2019.
- Torres-Júnior JDS, De FA Pires M, De Sá WF, Ferreira ADM, Viana JHM, Camargo LSDA, Ramos AA, Folhadella IM, Polisseni J, De Freitas C, Clemente CAA, De Sá Filho MF, Paula-Lopes FF e Baruselli PS.** Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 69:155-166. 2008.
- Trout JP, McDowell LR e Hansen PJ.** Characteristics of the estrous cycle and antioxidant status of lactating Holstein cows exposed to heat stress. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n. 5, p. 1244-1250, 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*, 39:146-153, 2004.
- Vogler CJ, Saacke RG, Bame JH, Dejarnette JM e McGilliard ML.** Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *Journal of Dairy Science*, 74(11), 3827-3835, 1991.
- Yaacobi-Artzi S, Kalo D e Roth Z.** Seasonal variation in the morphokinetics of in-vitro-derived bovine



embryos is associated with the blastocyst developmental competence and gene expression. *Frontiers in Reproductive Health*, v. 4, 2022.

Yaeram J, Setchell BP e Maddocks S. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(6), 647-653, 2006.

Yin C, Liu J, He B, Jia L, Gong Y, Guo H e Zhao R. Heat stress induces distinct responses in porcine cumulus cells and oocytes associated with disrupted gap junction and trans-zonal projection colocalization. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 4787-4798, 2019.

Yousef MK, Dill DB, Vitez TS, Hillyard SD e Goldman AS. Thermoregulatory responses to desert heat: age, race and sex. *Journal of Gerontology*, v. 39, n. 4, p. 406-414, 1984.

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. *Animal Reproduction*, v.14(3), p.635-44, 2017.

Walters AH, Eyestone WE, Saacke RG, Pearson RE e Gwazdauskas FC. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. *Theriogenology*, 63(7), 1925-1937, 2005.

West JW. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of dairy science*. 86(6):2131-44., 2003.

Wessel GM, Conner SD, Berg L. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. *Development*, 129:4315-4325, 2002.

Wolfenson D e Roth Z. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animal Frontiers*, v. 9, n. 1, p. 32-38, 3 jan. 2019.

Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savió JD, Meidan R, Lew BJ, Braw-tal R e Berman A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction*. 52:1106-1113. 1995.

Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y e Meidan R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Animal reproduction science*, v.47, n.1-2, p.9-19, 1997.

Wolfenson D, Flamenbaum I e Berman A. Hyperthermia and body energy store effects on estrous behavior, conception rate, and corpus luteum function in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.71, n.12, p.3497-3504, 1988.
