



O estresse por calor diminui a fertilidade de fêmeas bovinas por afetar o desenvolvimento oocitário e o embrionário

Heat stress disrupts fertility of bovine females affecting the oocyte and embryo development

G.G. Macedo^{1,5}, E.V. Costa e Silva², R.O. Pinho³, T.I. Assumpção¹, J.O. Jacomini¹,
R.M. Santos¹, L.F. Martins⁴

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

³Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

⁴Universidade Paranaense, Umuarama, PR, Brasil.

⁵Correspondência: gmacedo@famev.ufu.br

Resumo

Para tentar minimizar as perdas provocadas pelo estresse por calor, os bovinos, principalmente os zebuínos que foram selecionados em clima tropical, conseguiram desenvolver mecanismos de tolerância ao calor. Entretanto, o desempenho reprodutivo de bovinos, principalmente de taurinos, é severamente afetado pelo calor dos meses quentes do ano. Desta forma, considerando que a diminuição da fertilidade devido ao estresse por calor constitui um problema multifatorial, esta revisão tem por objetivo compreender como e quando o estresse por calor afeta o desenvolvimento oocitário e o embrionário, a fim de desenvolver estratégias potenciais que aumentem a fertilidade de rebanhos bovinos sob estresse por calor.

Palavras-chave: choque térmico, eficiência reprodutiva, oócito, termotolerância.

Abstract

*Bovines developed in tropical areas acquired genes that determine thermotolerance allowing these animals to reach success in reproductive performance. However, fertility, mainly in *Bos taurus*, is severely affected by heat stress in the hot months of the year. Thus, considering that the deleterious effect of heat stress is a multifactorial problem, this review aims to present the relevant and recent information to obtain a better understanding of how and when heat stress affects the embryonic development, offering a basis for the development of potential strategies to increase fertility in a hot environment.*

Keywords: heat shock, oocyte, reproductive performance, thermotolerance.

Introdução

Os bovinos que evoluíram em clima tropical, especialmente os zebuínos, são mais adaptados a climas quentes por conseguirem preservar e/ou adquirir genes que determinam maior tolerância ao calor, o que propicia maior habilidade termorregulatória e diminui sua passividade em apresentar hipertermia como resposta ao estresse por calor (EC; choque térmico quando *in vitro* - CT). Sendo assim, exposição a elevadas temperaturas tem menos efeitos deletérios e pode ser um fator importante para determinar a sobrevivência embrionária (Krininger et al., 2003; Hansen, 2009).

Em programas de multiplicação de material genético por meio de transferência de embriões ou produção de embriões *in vitro* (PIV), por exemplo, se submetida ao EC, a vaca doadora pode apresentar elevada temperatura nos oócitos e/ou embriões e aumentar a mortalidade embrionária, restringindo, desta forma, a coleta ou PIV a níveis insatisfatórios. Assim sendo, fica clara a necessidade de informações a respeito da influência térmica sobre os oócitos e embriões, com o objetivo de aperfeiçoar o manejo de fêmeas em programas reprodutivos e melhorar quantitativa e qualitativamente os embriões. Esta revisão tem por objetivo buscar um melhor entendimento de como e quando o EC afeta o desenvolvimento oocitário e o embrionário.

Efeito do choque térmico (CT) sobre o desenvolvimento oocitário e o embrionário

Durante o verão em regiões tropicais, embriões em estágio inicial de desenvolvimento são expostos a altas temperaturas maternas, o que pode afetar sua qualidade. Vacas sob EC têm uma baixa porcentagem de oócitos fertilizados, alta incidência de mortalidade embrionária inicial e, conseqüentemente, menor prolificidade (Eberhardt et al., 2009). O desenvolvimento embrionário no estágio de clivagem é muito suscetível a elevadas temperaturas. Estas provocam pequenos efeitos na sobrevivência de muitas células, mas podem ser letais para embriões pré-implantados (Rivera et al., 2003; García-Ispuerto et al., 2006). Os efeitos deletérios do CT na taxa



de clivagem são inconsistentes entre os diferentes estudos. É possível que esta variação se deva ao efeito do CT na cinética das divisões mitóticas, resultando em retardo na clivagem, com efeitos mais pronunciados no zigoto do que nos estádios de mórula e blastocisto (Gendelman et al., 2010).

Muitos estudos, tanto *in vivo* como *in vitro*, evidenciam o efeito negativo do calor sobre o desenvolvimento embrionário. Exposição de vacas ao EC durante o início da gestação limita a sobrevivência embrionária (Putney et al., 1989; Ealy et al., 1993). Culturas de embriões expostas a elevadas cargas térmicas apresentam reduzido desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Rivera e Hansen, 2001).

Em modelos *in vivo*, a quantidade e a qualidade de blastocistos (ou prenhez) são afetadas por EC tanto nos oócitos como em embriões no estágio inicial de desenvolvimento. Trabalhos antigos já indicavam o efeito do calor em oócitos cujas doadoras Holandesas sob EC (42°C por 10 horas) no dia da inseminação apresentavam redução na taxa de viabilidade de blastocistos (Putney et al., 1989).

Oócitos de vacas Holandesas de alta produção apresentam menor taxa de blastocisto e maior fragmentação embrionária quando obtidos no verão, assim como vacas repetidoras de serviço produzem menos embriões no verão (Ferreira et al., 2011).

Com a melhoria nos protocolos de PIV, elevou-se a quantidade de pesquisas em culturas embrionárias, com o objetivo de obter-se melhor esclarecimento celular/molecular do efeito do CT sobre os embriões jovens. Para isso, é necessário que a temperatura do CT nos embriões seja semelhante à de vacas sob EC, com elevação lenta (°C) até chegar ou ultrapassar 42°C. Sugiyama et al. (2003) avaliaram o desenvolvimento de dois grupos de embriões produzidos *in vitro* e expostos a altas temperaturas (41°C por quatro horas) nos dois primeiros dias ou no quarto dia. Nas duas situações, foi menor ($P < 0,001$) a quantidade de embriões sob CT que chegaram ao estágio de blastocisto. Os embriões com CT nos dois primeiros dias de idade tiveram desenvolvimento inferior ao do grupo com CT no quarto dia. Assim, CT durante estádios iniciais do desenvolvimento embrionário aumenta a incidência de mortalidade de embriões jovens, principalmente nos dois primeiros dias de idade. No mesmo sentido, Ealy et al. (1995) observaram que a incubação de embriões de duas células a 40,8°C por três horas não afeta seu desenvolvimento, mas tratamento térmico de 41 ou 42°C diminui o desenvolvimento embrionário ($P = 0,004$). Porém, em temperatura menor (40°C) por um tempo maior (24 horas), zigotos apresentam menor taxa de blastocisto que embriões recebendo o CT no momento da formação da mórula (dia 5; Sakatani et al., 2012). Assim, CT a temperaturas e tensões de oxigênio semelhantes às observadas *in vivo* pode prejudicar a competência de desenvolvimento de zigotos bovinos.

É importante salientar que temperaturas de cultura de oócitos e embriões, para demonstrar os efeitos do calor no desenvolvimento, são geralmente maiores que a temperatura corporal de vacas em EC. Neste sentido, Rivera e Hansen (2001), ao buscarem mimetizar a condição fisiológica de vacas em EC (verão da Flórida, EUA), observaram que a fertilização de oócitos a 41,5°C, comparada a 38,5 e 40°C, reduz a taxa de clivagem e a de blastocisto. Também, zigotos e embriões de duas células expostos a 38,5, 40,0, ou 41,1°C, por três, seis, nove e 12 horas, possuem menor taxa de blastocistos apenas quando a 41,1°C por nove ou 12 horas. Por fim, zigotos expostos por oito dias a temperaturas flutuantes diárias similares a de vacas em EC (elevando-se de 38,5 a 40,5°C) apresentam menor taxa de blastocisto do que aqueles embriões expostos por um dia apenas. Estes resultados evidenciam que o desenvolvimento embrionário pode ser prejudicado em um CT por um período curto de altas temperaturas, ou prolongado com temperaturas menores.

Efeito do choque térmico na expressão gênica do embrião e influência do grupo genético (*Bos taurus* x *Bos indicus*)

Para amenizar os efeitos do calor materno sobre o embrião, é possível realizar-se modificações no ambiente e na genética do animal por meio da utilização de raças mais tolerantes ao calor para obter-se melhorias nos índices reprodutivos (Rocha et al., 2012). O *pool* de genes dos mamíferos contém variantes alélicas de genes específicos, que controlam a regulação da temperatura corporal e a capacidade de resposta celular à hipertermia. Assim, a seleção genética, tanto natural quanto artificial, pode modular o impacto do EC sobre a função reprodutiva (Hansen, 2009).

É possível que o mesmo gene ou genes que conferem termotolerância celular estejam presentes em zebus e taurinos adaptados, como o Senepol, o Romosinuano e o Caracu (Magee et al., 2002). Uma hipótese alternativa é que distintos genes de termotolerância estão presentes em diferentes genótipos e que a transferência de genes para gerações posteriores é extremamente relevante, mas todas as espécies podem suspender as atividades reprodutivas se a situação se tornar desfavorável (Von Borell et al., 2007).

A resposta ao estresse térmico inclui alteração de expressão gênica sob a regulação do fator de transcrição de choque térmico (HSF) com uma rápida indução de transcrição de proteínas do choque (HSP) em uma grande variedade de células e tecidos (Collier et al., 2008). No embrião, o HSF1 é essencial para a resposta ao CT e também é necessário para o processo de desenvolvimento, sendo considerado o principal fator de transcrição de CT que se liga na região promotora dos genes das HSPs e permite uma rápida indução de expressão de HSPs nas células submetidas a um ambiente estressor (Silva et al., 2013).

Os efeitos negativos da hipertermia materna são mais pronunciados durante o estro e a inseminação e



durante as primeiras clivagens do embrião em desenvolvimento. Desta maneira, efeito deletério do EC na fertilidade, o qual em parte depende da inibição do desenvolvimento embrionário (Ealy et al., 1993), pode ser afetado pelo genótipo e pelo estágio embrionário. O genoma embrionário em bovinos não pode ser totalmente ativado antes do estágio de oito a 16 células, sendo, portanto, possível que efeitos genéticos na resistência embrionária a elevadas temperaturas não sejam vistos antes deste estágio de desenvolvimento (Memili e First, 2000). O desenvolvimento embrionário inicial em muitas espécies é suportado por RNAs e proteínas sintetizadas durante a oogênese. Dependendo da espécie, a transcrição zigótica/embrionária inicia em momento específico pós-fertilização, sendo a ativação da expressão dos genes do zigoto/embrião feita pela gradual degradação do RNAm e proteínas reservadas pelo oócito (Memili e First, 2000). Isto devido ao fato de que há um baixo nível da atividade transcricional (síntese de RNAm) na estrutura da cromatina, que pode ser chamada de “menor ativação genética”, entre os estádios de uma a quatro células, e uma gradual elevação desta síntese, a qual representa um papel importante no controle da expressão genética, sugerindo que há maior ativação começando no estágio de oito células em embriões bovinos (Memili e First, 1999).

Termorresistência vs. grupo genético

Embriões de animais *Bos indicus* submetidos ao EC durante os estádios iniciais de desenvolvimento apresentam maior habilidade de sobrevivência em comparação a embriões de animais *Bos taurus* ou cruzados (Paula-Lopes et al., 2003; Eberhardt et al., 2009; Rocha et al., 2012). Entretanto, Krininger et al. (2003) abateram vacas Brahman e Holandesas e coletaram embriões nos dias dois e cinco após a IA, a 41°C por quatro horas e meia, e observaram que os efeitos genéticos na termotolerância celular que fazem embriões Brahman mais resistentes ao CT não são expressos no estágio de duas a quatro células no segundo dia pós-IA.

Em embriões PIV, no estágio de nove a 16 células (dia 5 pós-IA) expostos a 41°C por seis e nove horas, a diminuição na taxa de blastocisto causada pela temperatura de 41°C por seis horas é menor na raça Brahman (29% a 38,5°C; 15% a 41°C) do que na raça Holandesa (32% a 38,5°C; 0% a 41°C; Rivera e Hansen, 2001). Similarmente, embriões de Angus sob CT apresentam menor taxa de blastocisto e menor número de blastômeros do que embriões de Brahman (Paula-Lopes et al., 2003), sugerindo que células de raças termotolerantes são menos comprometidas por elevadas temperaturas do que células de raças sensíveis.

Desta maneira, a tolerância ao CT é inerente à raça (origem do oócito, espermatozoide, ou ambos). O CT (41°C, 12 horas pós-IA, 96 hpi) influencia no desenvolvimento embrionário de oócitos de vacas Nelore e Holandesa, e a resistência ao CT de embriões PIV por fertilização de oócitos de animais Holandeses não foi influenciada pela raça do pai (Gir x Holandês), indicando que o oócito desempenha um papel mais importante do que o espermatozoide no desenvolvimento de termotolerância embrionária inicial (Satrapa et al., 2011).

Silva et al. (2013), ao compararem a expressão dos genes COX2, CDX-2, IFN- τ , HSF1, HSP70 e PLAC8 relacionados com o desenvolvimento embrionário inicial, em embriões bovinos PIV (zebuínos vs. taurinos) submetidos ou não ao EC, puderam observar que o CT (41°C, seis horas, 96 hpi) reduziu significativamente a produção de blastocistos em taurinos, mas não em zebuínos. Além disso, foi identificado que os genes CDX-2, COX2, HSF1 e PLAC8 (importantes para o desenvolvimento embrionário inicial) possuem expressão reduzida principalmente em taurinos sob CT.

As HSPs são chaperonas que promovem a proteção celular contra efeitos deletérios do calor, prevenindo a desnaturação proteica (Kregel, 2002). Suas transcrições são aumentadas com o choque térmico e outros estímulos estressantes e constituem um indicador de estresse em embriões bovinos (Kiang et al., 1998). As HSPs podem estabilizar os efeitos negativos do ambiente como uma resposta ao estresse e, assim, aumentar, a proliferação/reparo celular e a sobrevivência embrionária, inibindo a apoptose e, conseqüentemente, prevenindo a morte celular. A HSP70 e a HSP40 implicam a proteção contra apoptose induzida por uma variedade de estímulos (Gotoh et al., 2004).

Defesas celulares contra o choque térmico em diferentes fases do desenvolvimento embrionário

Zigoto a embrião de oito células

A capacidade de transcrição celular em resposta a elevadas temperaturas parece ser importante para proteção ao CT e expressão de diferenças genéticas (Memili e First, 2000; Krininger et al., 2003). A aquisição de termotolerância pode incluir mudanças na capacidade de produção de moléculas envolvidas em termoproteção, tais como HSPs ou antioxidantes (Kawarsky e King, 2001).

Células submetidas a vários fatores estressantes aumentam a produção de HSPs, que estão presentes em organismos, abrangendo da bactéria ao homem. A identificação de genes HSP específicos que contribuam para a sobrevivência dos embriões pode ser uma oportunidade única para melhorar a proteção dos embriões de PIV de diferentes condições tóxicas, favorecendo a concepção e a manutenção da gestação (Zhang et al., 2011).

O fato de embriões nos estádios de duas a quatro células serem mais susceptíveis a elevações de temperatura do que embriões no estágio de mórula deve-se, principalmente, à incapacidade destes embriões em



sintetizar HSP70 como resposta ao EC (Kawarsky e King, 2001). A síntese das HSPs ocorre prematuramente no estágio de oito células devido à completa ativação do genoma embrionário (Ealy et al., 1993). No estágio de oito células em diante, o aumento da síntese de RNAm HSP70 em resposta ao CT pode ser responsável pela resistência embrionária a elevadas cargas térmicas (Kawarsky e King, 2001).

A diminuição da sobrevivência embrionária após a exposição a elevadas temperaturas envolve um aumento na produção de radicais livres, os quais são moléculas que possuem elétrons sem par, ou seja, que estão desbalanceadas e que se ligam a outras moléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, causando dano celular (Sakatani et al., 2012). A geração de espécies reativas do oxigênio em resposta ao EC diminui com o avanço do desenvolvimento dos embriões bovinos, enquanto a concentração intracelular de antioxidantes citoplasmáticos aumenta (Hansen, 2009).

Embrião acima de oito células

Mesmo com ativação genética e síntese de RNAm em embriões com estágio de desenvolvimento avançado, como mórula e blastocisto, o CT interfere de forma negativa, diminuindo as taxas de prenhez. Isto se dá pelo fato de elevadas cargas térmicas destruir o material genético (DNA), induzindo as células à apoptose. A apoptose tem papel no desenvolvimento de mamíferos como um mecanismo de controle de qualidade para eliminar células danificadas, anormais ou malformadas. Células muito danificadas pelo EC que não sofreram apoptose sempre se tornam necróticas (Paula-Lopes e Hansen, 2002). A apoptose no estágio acima de oito células coincide com o período de maior ativação genética, e é possível, portanto, que a transcrição embrionária esteja envolvida na resposta apoptótica em embriões. Além disso, a apoptose é crítica para a aquisição de competência de desenvolvimento dos oócitos de animais pré-púberes (Zaraza et al., 2010).

A exposição de embriões de 16 a 32 células a CT resulta em aumento do número de blastômeros com núcleo apoptótico. Sendo assim, a eliminação de blastômeros comprometidos com apoptose pode ser crítica para a continuação da sobrevivência de embriões a estádios avançados (Paula-Lopes e Hansen, 2002).

Em receptoras inovuladas com embriões de sete dias pós-IATF, a taxa de concepção é menor em vacas receptoras que apresentam maiores temperaturas de pele, e a probabilidade de prenhez eleva-se em cerca de 25% desde o início até o final da tarde (Costa e Silva et al., 2010). A exposição de novilhas superovuladas submetidas ao estresse por 10 horas começando no início do estro não afetou a taxa de fertilização, porém reduziu a proporção de embriões normais coletados (Hansen e Aréchiga, 1999).

Rensis e Scaramuzzi (2003) puderam observar uma variação de 20 a 30% na taxa de concepção quando compararam as estações quente e fria, em vacas de leite sob mesmo manejo e alimentação. Esta redução na fertilidade pode ser significativa, visto que taxas de concepção de 10% ou menos são comuns durante os meses quentes (Hansen, 2009).

Macedo et al. (2012) avaliaram o efeito da temperatura e umidade do ar, no verão em região tropical, na recuperação de embriões bovinos de fêmeas Nelore e puderam observar que uma alta carga térmica nesta época do ano, expressa pelo índice de temperatura e umidade, no dia da inseminação e nos dias seguintes (durante a clivagem embrionária), compromete a quantidade de embriões, sua viabilidade e, conseqüentemente, o desempenho reprodutivo. Pode-se, então, considerar que o calor tem sido determinante no comprometimento da eficiência reprodutiva, além de requerer a associação de eventos diversos, como maturação folicular, biossíntese de estradiol, indução do pico de hormônio luteinizante, ovulação e expressão do comportamento sexual, que devem ocorrer de forma coordenada e ser expressos cada qual no seu momento exato.

Considerações finais

Oócitos e embriões até o estágio de blastocisto são muito sensíveis ao calor. Desta maneira, o estresse por calor afeta severamente o desenvolvimento embrionário inicial. Portanto, ao se ponderar o conhecimento discutido nesta revisão, pesquisas sobre o tema propiciariam o desenvolvimento de estratégias potenciais para elevar a fertilidade de fêmeas bovinas, principalmente considerando-se os aversivos verões das regiões tropicais.

Referências

- Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, Baumgard LH.** Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. *J Dairy Sci*, v.91, p.445-454, 2008.
- Costa e Silva EV, Katayama KA, Macedo GG, Rueda PM, Abreu UGP, Zúccari CESN.** Efeito do manejo e de variáveis bioclimáticas sobre a taxa de gestação em vacas receptoras de embriões. *Cienc Anim Bras*, v.11, p.280-291, 2010.
- Ealy AD, Drost M, Hansen PJ.** Physiology and management. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci*, v.76, p.2899-2905, 1993.
- Ealy AD, Howell JL, Monterroso VH, Aréchiga CF, Hansen PJ.** Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. *J Anim Sci*, v.73, p.1401-1407,



1995.

Eberhardt BG, Satrapa RA, Capinzaiki CRL, Trinca LA, Barros CM. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*). *Anim Reprod Sci*, v.114, p.54-61, 2009.

Ferreira RM, Ayres H, Chiaratti MR, Ferraz ML, Araújo AB, Rodrigues CA, Watanabe YF, Vireque AA, Joaquim DC, Smith LC, Meirelles FV, 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, p.2383-2392, 2011.

García-Ispuerto I, López-Gatius F, Santolaria P, Yániz LJ, Nogareda C, López-Béjar M, De Rensis F. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology*, v.65, p.799-807, 2006.

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, p.73-82, 2010.

Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ*, v.11, p.390-402, 2004.

Hansen PJ. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B*, v.364, p.3341-3350, 2009.

Hansen PJ, Aréchiga CF. Strategies for managing reproduction in the heatstressed dairy cow. *J Anim Sci*, v.77, p.36-50, 1999.

Kawarsky SJ, King WA. Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. *Zygote*, v.9, p.39-50, 2001.

Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther*, v.80, p.183-201, 1998.

Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, v.92, p.2177-2186, 2002.

Krninger CEIII, Block CE, J., Al-Katanani, Y.M., Rivera, R.M., Chase Jr., C.C., Hansen, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.13-24, 2003.

Macedo GG, Zúccari CESN, Costa e Silva EV. Temperature and humidity in the brazilian center-east affecting the *in vivo* embryo production of Nelore cows. *Arch Vet Sci*, v.17, p.44-51, 2012.

Magee DA, Meghan C, Harrison S, Troy CS, Cymbron T, Gaillard C, Morrow A, Maillard JC, Bradley DG. A partial african ancestry for the creole cattle populations of the Caribbean. *J Herd*, v.93, p.429-432, 2002.

Memili E, First NL. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod*, v.61, p.1198-1207, 1999.

Memili E, First NL. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*, v.8, p.87-96, 2000.

Paula-Lopes FF, Chase Jr CC, Al-Katanani YM, Krninger III CE, Rivera RM, Tekin S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction*, v.125, p.285-294, 2003.

Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochim Biophys Res Comm*, v.295, p.37-42, 2002.

Putney DJ, Mullins S, Thatcher WW, Drost M, Gross TS. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim Reprod Sci*, v.19, p.37-51, 1989.

Rensis FD, Scaramuzzi JR. Heat Stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. *Theriogenology*, v.6, p.1139-1151, 2003.

Rivera RM, Hansen PJ. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction*, v.121, p.107-115, 2001.

Rivera RM, Kelley KL, Erdos, GW, Hansen, PJ. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced *in vitro* and *in vivo* following a physiologically relevant heat shock. *Biol Reprod*, v.69, p.2068-2077, 2003.

Rocha DR, Salles MGF, Moura AAAN, Araújo AA. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. *Rev Bras Reprod Anim*, v.36, p.18-24, 2012.

Sakatani M, Alvarez NV, Takahashi M, Hansen PJ. Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. *J Dairy Sci*, v.95, p.3080-3091, 2012.

Satrapa RA., Nabhan T, Silva CF, Simões RAL, Razza EM, Puelker RZ, Trinca LA, Barros CM. Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v.76, p.1162-1167, 2011.



Silva CF, Sartorelli ES, Castilho AC, Satrapa RA, Puelker RZ, Razza EM, Ticianelli JS, Eduardo HP, Loureiro B, Barros CM. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, v.79, p.351-357, 2013.

Sugiyama S, McGowanb M, Kafic M, Phillipsa N, Young M. Effects of increased ambient temperature on the development of *in vitro* derived bovine zygotes. *Theriogenology*, v.60, p.1039-1047, 2003.

Von Borell E, Dobson H, Prunier A. Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs. *Horm Behav*, v.52, p.130-138, 2007.

Zaraza J, Oropeza A, Velazquez MA, Korsawe K, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation *in vitro*-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. *Theriogenology*, v.74, p.75-89, 2010.

Zhang B, Peñagaricano F, Driver A, Chen H, Khatib H. Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos. *J Dairy Sci*, v.94, p.4174-4182, 2011.
