

Alterações celulares induzidas pelo estresse térmico em embriões bovinos

Cellular alterations induced by heat stress in bovine embryos

Rafaela Sanchez de LIMA¹; Mayra Elena Ortiz D'Avila ASSUMPÇÃO²;
José Antonio VISINTIN²; Fabíola Freitas de Paula LOPES^{1,3}

¹ Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, Brasil

² Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil

³ Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Paulo, Diadema – SP, Brasil

Resumo

Condições ambientais adversas, tais como altas temperaturas e umidade relativa, causam aumento da temperatura corporal interna (hipertermia) de vacas lactantes, que resultam em estresse térmico e diminuição dos índices de gestação. A susceptibilidade embrionária à temperatura elevada já foi bem caracterizada tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro*. A exposição de embriões bovinos em estágios de zigoto e duas células à temperatura elevada diminui o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. No entanto, o embrião torna-se mais resistente aos efeitos deletérios da temperatura elevada à medida que progride no desenvolvimento. A redução na competência de desenvolvimento embrionária causada pelo estresse térmico deve-se, em parte, às inúmeras alterações citoplasmáticas e nucleares induzidas pela temperatura elevada. No citoplasma embrionário, o choque térmico aumenta o número de mitocôndrias edemaciadas, desorganiza os microtúbulos e os filamentos de actina. No compartimento nuclear, a temperatura elevada induz a fragmentação de DNA característica de apoptose. Essa forma de morte celular é um fenômeno regulado ao longo do desenvolvimento embrionário pré-implantacional, visto que altas temperaturas não ativam a cascata de apoptose em embriões de duas ou quatro células. A apoptose embrionária induzida pelo choque térmico em embriões ≥ 16 células pode ser considerada um mecanismo de controle de qualidade para remoção dos blastômeros danificados, já que o bloqueio da apoptose nestes embriões aumenta ainda mais a susceptibilidade ao choque térmico. Além disso, o estresse térmico também pode afetar o estado redox do embrião, levando a um conseqüente estresse oxidativo.

Palavras-chave: Estresse térmico. Embrião. Bovino. Alterações celulares.

Abstract

Adverse environmental conditions such as high temperature and humidity increase internal body temperature (hyperthermia) of lactating dairy cows resulting in heat stress and decreased pregnancy rates. Embryonic susceptibility to elevated temperature has been well characterized both *in vivo* and *in vitro*. Exposure of zygote and two cells stage bovine embryos to elevated temperature decreases embryonic development to the blastocyst stage. However, the bovine embryo becomes more resistant to the deleterious effects of heat stress as it proceeds in its development. The heat-induced reduction in embryonic developmental competence is due, at least in part, to the numerous cytoplasmic and nuclear changes induced by high temperature. In the embryo cytoplasm heat shock increases the number of swollen mitochondria, disrupts microtubules and microfilaments. In the nuclear compartment, elevated temperature induces DNA fragmentation characteristic of apoptosis. This form of cell death is a phenomenon regulated throughout the preimplantation embryonic development, since high temperatures do not trigger apoptosis in embryos of two or four cells. Heat-induced apoptosis in embryos ≥ 16 cells can be seen as a quality control mechanism for removing damaged blastomeres, since block apoptosis in these embryos increase its susceptibility to heat shock. Furthermore, heat stress can also affect the redox status of the embryo inducing a consequent oxidative stress.

Keywords: Heat stress. Embryo. Bovine. Cellular changes.

Correspondência para:

Fabíola Freitas de Paula Lopes
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema
Rua Prof. Artur Riedel, 275, Jardim Eldorado
CEP 09972-270

Tel.: (11) 4049-3300, Ramal: 3089.
e-mail: ffpaulalopes@gmail.com

Recebido: 06/03/2013
Aprovado: 28/08/2013

Introdução

A exposição de vacas lactantes à temperatura e umidade elevadas causa aumento da temperatura corporal interna, resultando em estresse térmico e diminuição dos índices de gestação. A fertilidade do gado leiteiro é drasticamente reduzida quando há aumento na temperatura ambiental (DUNLAP; VINCENT, 1971; BADINGA et al., 1985; AL-KATANANI; WEBB; HANSEN, 1999; PIRES et al., 2002). Dunlap e Vincent (1971) relataram que o aumento da temperatura retal de novilhas de 38,5°C para 40°C, 72 horas após a inseminação artificial, diminuiu a taxa de gestação de 48 para 0%. Na Flórida – Estados Unidos, as taxas de concepção de vacas Pardo Suíço, Jersey e Holandesas em lactação também diminuíram de 52 para 32% quando a temperatura máxima do ar aumentou de 23,9°C para 32,2°C no verão.

AL-KATANANI, WEBB e HANSEN, 1999, compararam, retrospectivamente, grupos de animais divididos em seis categorias conforme a média de temperatura ambiental ($\leq 6^\circ\text{C}$, 7 a 10°C , 11 a 15°C , 16 a 20°C , 21 a 25°C e $> 25^\circ\text{C}$) em relação ao dia do estro e constatou que a taxa de não retorno ao cio 90 dias após a inseminação foi mais baixa quando a temperatura foi maior que 20°C no dia -9 (dia 0 = estro), no dia do estro e no dia +10 (AL-KATANANI; WEBB; HANSEN, 1999). No Brasil, vacas Holandesas, confinadas em *free stall*, tiveram uma queda na taxa de gestação de 71,2% no inverno para 45,7% no verão (PIRES et al., 2002).

A seleção genética de vacas Holandesas de alta produção de leite está associada ao aumento na quantidade de calor metabólico (BERMAN et al., 1985; MARTELLO et al., 2004). West (2003) verificou que vacas em lactação produzem uma grande quantidade de calor metabólico e que, adicionalmente, acumulam calor de energia radiante. Observou ainda que quando esse incremento calórico estava associado à capacidade de resfriamento comprometida devido às condições ambientais desfavoráveis (alta temperatura e umidade) havia o aumento da temperatura corporal, a diminuição do consumo de matéria seca e, conseqüentemente, do

desempenho produtivo e reprodutivo (WEST, 2003). Dessa maneira, a magnitude dos efeitos deletérios causados pelo estresse térmico na fertilidade animal foi mais acentuada em animais de alta produção de leite (AL-KATANANI; WEBB; HANSEN, 1999).

Nas regiões de clima quente, o estresse térmico em vacas em lactação é um fator de grande impacto econômico para a indústria leiteira. Estima-se um valor de US\$ 897 milhões por ano em perdas econômicas ocasionadas pelo estresse térmico nos EUA (ST-PIERRE; COBANOV; SCHNITKEY, 2003), entretanto, há poucas estratégias disponíveis para o controle deste problema. O uso de aspersores de água e de ventiladores tem sido os procedimentos mais empregados, pois reduzem a temperatura corporal e aumentam a produção de leite, contudo, os seus efeitos na fertilidade durante o verão são limitados (HANSEN, 2004). Desse modo, o desenvolvimento de alternativas destinadas a contornar os efeitos negativos da temperatura e umidade elevadas na reprodução de gado leiteiro é uma temática de grande importância para o incremento da produtividade da pecuária leiteira nas regiões de clima quente.

A redução da fertilidade provocada pelo estresse térmico é um problema de ordem multifatorial, pois afeta as funções celulares de diversos tecidos. No relativo à função reprodutiva, já foi demonstrado que o estresse térmico compromete a secreção hormonal (BADINGA et al., 1993; WILSON et al., 1998; ROTH et al., 2000), bem como a capacidade do desenvolvimento oocitário (ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; JU et al., 2005), folicular (BADINGA et al., 1993; WILSON et al., 1998; ROTH et al., 2000) e embrionário pré-implantacional (PUTNEY; DROST; THATCHER, 1988; EALY; DROST; HANSEN, 1993).

O presente trabalho teve o objetivo de caracterizar os efeitos da temperatura elevada no embrião bovino, abordando especialmente as alterações celulares desencadeadas em resposta à temperatura. Para tanto, foi utilizada a terminologia descrita por Hansen et al. em que o aumento da temperatura *in vivo* é chamado “estresse

térmico” e o aumento da temperatura *in vitro* é chamado “choque térmico” (HANSEN et al., 2001).

Efeito do estresse térmico no desenvolvimento embrionário

A susceptibilidade embrionária à temperatura elevada já foi bem caracterizada em experimentos *in vivo* e *in vitro*. A exposição de novilhas Holandesas superovuladas ao estresse térmico durante os primeiros sete dias após o estro aumentou a taxa de recuperação de embriões anormais e com retardo no desenvolvimento (PUTNEY; DROST; THATCHER, 1988). Quando novilhas Hereford foram expostas ao estresse térmico de 32,2°C e 65% de umidade relativa (UR) 12 horas após o estro, durante três dias, a taxa de prenhez foi nula no grupo estressado, enquanto no grupo controle foi de 48% (1). Biggers et al. (1987) avaliaram o desempenho de grupos de vacas multíparas Hereford e Hereford-Angus mantidas em câmaras climáticas em temperaturas de 21°C e 35% de UR (grupo controle) e de 37°C durante 12 horas seguidas por 33°C durante as 12 horas restantes do dia (grupo estresse térmico), do dia oito ao 16 após o estro. Os animais do grupo estresse térmico foram subdivididos em condições de UR alta (38%) e baixa (27%). O estresse térmico aumentou a frequência respiratória nos dois grupos tratados, enquanto o aumento da temperatura retal foi observado apenas no grupo de estresse térmico com alta UR. Embora a taxa de gestação não tenha sido diferente entre os grupos, no estresse térmico houve redução do peso do conceito e do corpo lúteo.

Os efeitos da temperatura elevada também foram observados em embriões produzidos *in vitro*. A exposição de embriões de duas células ao choque térmico de 41°C por nove (RIVERA et al., 2004) ou 12 horas (RIVERA; HANSEN, 2001) reduziu a taxa de blastocisto em relação ao grupo controle (38,5°C). Da mesma forma, quando embriões de oito células foram submetidos a um choque térmico de 41°C por seis horas, houve redução na porcentagem de embriões que chegaram ao estágio de blastocisto (SAKATANI et al., 2008). O

choque térmico de 40°C aplicado após a inseminação *in vitro* e mantido durante todo o cultivo embrionário também diminuiu o desenvolvimento dos embriões nos dias seis e oito (SAKATANI et al., 2012).

No início do desenvolvimento embrionário, os embriões são muito sensíveis aos efeitos do estresse térmico, porém, com o avanço do desenvolvimento eles se tornam mais resistentes. O estresse térmico, quando aplicado no dia um após a inseminação artificial (IA) de vacas Holandesas, causou a redução na viabilidade e no desenvolvimento embrionário após lavagem do útero e recuperação dos embriões no dia oito. Essa redução, entretanto, não foi observada quando os animais foram submetidos ao estresse térmico do verão nos dias três, cinco e sete após a IA. Esses resultados indicaram que, com o avanço do desenvolvimento, os embriões passam a ser mais resistentes aos efeitos do aumento de temperatura (EALY; DROST; HANSEN, 1993). Em condições de cultivo *in vitro*, o choque térmico de 41°C durante 12 horas bloqueou o desenvolvimento de embriões de duas células, diminuiu o desenvolvimento dos embriões de quatro a oito células e não causou efeito nas mórulas (EDWARDS; HANSEN, 1997). O choque térmico de 41°C por seis horas nos dias zero, dois, quatro e seis após a FIV diminuiu o desenvolvimento embrionário apenas nos dias zero e dois (SAKATANY; KOBAYASHI; TAKAHASHI, 2004). Da mesma maneira, a exposição de embriões a 40°C por 24 horas causou uma diminuição no desenvolvimento para blastocisto apenas quando o choque térmico foi aplicado nos zigotos (oito a 32 horas pós-inseminação), contudo não houve a diminuição do desenvolvimento das mórulas (116-140 horas pós-inseminação) (SAKATANI et al., 2012).

A habilidade dos embriões em estágios avançados do desenvolvimento suportarem o aumento da temperatura pode estar relacionada ao maior número de células existentes, quando comparados aos embriões em estágios iniciais, pois nos primeiros é possível a redução de uma fração de suas células sem que haja maiores danos para o embrião. Em uma situação hipotética, pode-se

assumir que o choque térmico determine a perda de 50% das células embrionárias. Caso isso ocorra, em um embrião de duas células restará apenas um blastômero para suportar a sua sobrevivência, o que é incompatível com o desenvolvimento embrionário. Entretanto, se esse embrião for uma mórula ou um blastocisto, após o estresse térmico ainda haverá um número razoável de células capazes de permitir a continuidade do seu desenvolvimento (EDWARDS; HANSEN, 1997). A existência de uma relação positiva entre número de blastômeros e a capacidade de sobrevivência embrionária já foi demonstrada e o maior número de células está associado ao aumento da sobrevivência após a perda de blastômeros resultante da divisão embrionária (WILLIAMS; ELSDEN; SEIDEL, 1984).

A resistência térmica dos embriões em avançado estágio de desenvolvimento pode estar associada à aquisição de mecanismos bioquímicos de termoproteção celular, como é o caso das proteínas do choque térmico (HSP). A HSP70 protege as células da temperatura elevada pelo redobramento de proteínas danificadas e estabilização do RNA ribossomal (DUNCAN; HERSHEY, 1989; NOVER; SCHARF, 1991). A adição de anti-HSP70 ao meio de cultivo, do dia três ao dia nove do desenvolvimento embrionário, aumentou a apoptose e diminuiu significativamente o número de embriões que chegaram ao estágio de blastocisto (MATWEE et al., 2001). O uso do anticorpo contra a forma induzida da HSP70 reduziu a proporção de embriões de duas células que desenvolveram até blastocisto tanto no grupo controle a 38,5°C quanto no grupo choque térmico a 41°C. A sensibilidade do embrião de duas células ao choque térmico não foi aumentada com o uso do anticorpo e, portanto, se conclui que a forma induzida do HSP 70 é necessária para o desenvolvimento normal do embrião (AL-KATANI; HANSEN, 2002).

Inicialmente, foi postulado que nas fases iniciais de desenvolvimento, como o genoma dos embriões é inativo e sem potencial de transcrição (BARNES; FIRST, 1991), estes seriam pouco tolerantes a temperatura elevada, pois são incapazes de montar uma resposta ao

choque térmico e de se adaptarem a esta alteração do seu microambiente. Entretanto, essa hipótese foi negada por Edwards e Hansen (1996), ao demonstrarem que embriões antes do estágio de duas células foram capazes de sintetizar HSP68 (EDWARDS; HANSEN, 1996) e HSPA1A (SAKATANI et al., 2012) em resposta ao choque térmico. Da mesma maneira, a exposição de embriões de duas e quatro células ao choque térmico aumentou o RNAm para HSP70 e a adição de inibidores de transcrição DRB (5,6-dicloro-1-b-D-ribofuranosilbenzimidazol) e actinomicina D reduziu a expressão de HSP70 após o choque térmico de 42°C. Os resultados de tais experimentos indicaram que embriões bovinos no estágio de duas células possuem capacidade para transcrição em resposta ao choque térmico (CHANDOLIA et al., 1999).

Alterações celulares causadas pelo estresse térmico no desenvolvimento embrionário

Alterações Citoplasmáticas

Embriões no estágio de duas células, submetidos ao choque térmico de 41 e 43°C por seis horas, apresentaram migração das organelas para o centro do blastômero e edemaciação de mitocôndrias. Além disso, o choque térmico de 43°C aumentou a quantidade de material eletrodense e da cromatina precipitada. A migração das organelas para o centro do blastômero foi bloqueada nos embriões tratados com rizoxina e latrunculina B que, respectivamente, determinaram a despolarização dos microtúbulos e dos microfilamentos. Entretanto, o choque térmico de 43°C causou o rompimento da estrutura dos microfilamentos e o movimento das organelas mesmo quando os embriões foram tratados com despolarizador de microfilamentos (RIVERA et al., 2004).

Alterações Nucleares

Uma alteração nuclear observada em embriões submetidos ao choque térmico é a fragmentação de DNA

característica da apoptose. A apoptose é o processo de morte celular programada em que ocorre a autodigestão controlada da célula.

Paula-Lopes e Hansen (2002b) demonstraram que a apoptose induzida pelo choque térmico é um fenômeno regulado durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional. A exposição de embriões bovinos > 16 células, no dia cinco após a fecundação *in vitro* (FIV), a temperaturas de 41°C ou 42°C, aumentou a porcentagem de blastômeros TUNEL-positivo e atividade das enzimas caspases do grupo II (caspase -3, -2 e -7). Essa mesma temperatura, entretanto, não induziu aumento na proporção de blastômeros TUNEL-positivo ou a atividade de caspases em embriões de duas ou quatro células. Em embriões no estágio de oito a 16 células, a indução de apoptose pelo choque térmico variou com o tempo de desenvolvimento. Quando os embriões de oito a 16 células, foram coletados no dia três após a FIV o choque térmico de 41°C não induziu apoptose, entretanto, quando o choque térmico foi aplicado em embriões de oito a 16 células coletados no dia quatro, houve um aumento na porcentagem de blastômeros marcados para apoptose (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002b). Posteriormente, Brad, Hendricks e Hansen (2007) demonstraram que embriões de duas células expostos ao choque térmico de 41°C por 15 horas não apresentaram aumento da atividade da caspase-9 e nem do grupo II de caspases (caspase -2, -3 e -7). No entanto, quando embriões de cinco dias foram expostos ao mesmo choque térmico houve aumento na atividade das caspases (BRAD; HENDRICKS; HANSEN, 2007).

Na investigação do mecanismo do bloqueio da apoptose em embriões no estágio de duas células, foi constatado que, após o choque térmico, os embriões expostos a um despolarizador de membrana mitocondrial (*carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone* - CCCP) apresentaram a ativação da caspase-9 e das caspases do grupo II. O uso do CCCP, entretanto, não aumentou a fragmentação do DNA quando aplicado a embriões de duas células (BRAD; HENDRICKS; HANSEN, 2007), o

que indicou que além da ausência de despolarização da membrana mitocondrial havia um outro mecanismo que impedia a fragmentação do DNA de embriões de duas células. Carambula, Oliveira e Hansen (2009) demonstraram que a ausência de fragmentação de DNA induzida pelo choque térmico em embriões de duas células estava associada à estrutura condensada da cromatina que torna o DNA inacessível a ação das enzimas DNases. No estágio de duas células, o DNA do embrião é altamente metilado (PARK et al., 2007) e a demetilação só acontece após a ocorrência de algumas divisões (DEAN et al., 2001). Contudo, o nível de acetilação de histonas, que diminui dramaticamente antes da fertilização, aumenta logo após a sua ocorrência (KIM et al., 2003). Baseado em tais evidências, Carambula, Oliveira e Hansen (2009) conduziram experimentos em que embriões no estágio de duas células foram cultivados na presença de inibidores de metilação do DNA (5-Aza-2'-deoxicitina) e de deacetilação das histonas (Tricostatina-A) onde constataram que nos embriões de duas células houve a fragmentação do DNA após a despolarização da mitocôndria induzida por CCCP (CARAMBULA; OLIVEIRA; HANSEN, 2009).

Investigando a hipótese de que após o choque térmico a morte celular por apoptose seria um processo benéfico para a continuação no desenvolvimento embrionário, no dia quatro após a inseminação, Paula-Lopes e Hansen (2002a) expuseram embriões ≥ 16 células a temperaturas de 41°C por nove horas e constataram o aumento da atividade das caspases do grupo II e da proporção de células positivas para apoptose. Entretanto, com o uso de um inibidor de caspases do grupo II (z-DEVD-fmk) os efeitos foram bloqueados e houve acentuada redução no desenvolvimento embrionário. Deste modo, concluíram que a apoptose podia ser vista como um mecanismo adaptativo e de controle de qualidade que poderia remover blastômeros danificados pelo choque térmico e, conseqüentemente, permitir a sobrevivência e o desenvolvimento embrionário após o estresse celular (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002a).

Alterações no estado redox

Já foi demonstrado que uma das ações do estresse térmico embrionário foi o aumento da produção dos radicais livres pelo embrião. Em bovinos, o choque térmico de 41°C por seis horas nos dias zero, dois, quatro e seis após a FIV aumentou a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuiu o desenvolvimento embrionário nos dias zero e dois (SAKATANI; KOBAYASHI; TAKAHASHI, 2004).

A tensão de oxigênio durante o cultivo é considerada como um grande determinante dos efeitos do choque térmico no desenvolvimento embrionário. Rivera et al. (2004) demonstraram que os efeitos deletérios do choque térmico moderado ocorreram em embriões bovinos de duas células cultivados em alta e baixa tensão de oxigênio (RIVERA et al., 2004). Posteriormente, De Castro e Paula e Hansen (2008) discordaram de tais resultados e demonstraram que os efeitos negativos do choque térmico em embriões de duas células e embriões de dia cinco ocorriam em embriões cultivados em ar, porém, não nos cultivados a 5% de oxigênio (DE CASTRO E PAULA; HANSEN, 2008). Sakatani et al. (2012) encontraram resultados contrários e demonstraram que os embriões mantidos a 41°C por 12 e 24 horas apresentaram uma acentuada diminuição do desenvolvimento quando eram submetidos a uma baixa tensão de oxigênio (SAKATANI et al., 2012). Novos estudos são necessários para o esclarecimento dos fatores responsáveis pela discordância dos resultados encontrados.

Uma estratégia usada para reverter os efeitos negativos do estresse oxidativo causado pelo estresse térmico é o uso de antioxidantes. No entanto, os resultados dos ensaios *in vivo* e *in vitro* ainda são controversos (ARÉCHIGA et al., 1998a,b; TROUT; MCDOWELL; HANSEN, 1998; PAULA-LOPES et al., 2003). Em embriões bovinos de duas células, a adição de antioxidantes como glutatona (50 nM), taurina (50 mM) ou éster glutatona (10 µM, 100 µM, 1 mM e 10 mM) (WEST, 2003) e de 100 µM de vitamina E (PAULA-LOPES et al., 2003) não reduziu os efeitos do choque térmico no

desenvolvimento embrionário *in vitro*. Sakatani et al. (2008) demonstraram que o choque térmico de 41°C por seis horas em embriões oito células aumentou as EROs, porém, não houve alteração na concentração de glutatona. Contudo, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com antioxidante biológico mercapto-etanol diminuiu significativamente os níveis de EROs em embriões do grupo choque térmico e aumentou as concentrações de glutatona (SAKATANI et al., 2008). Em outro experimento, o uso de baixas doses de antocianinas, detentoras de ação antioxidante, aumentou a taxa de formação de blastocisto, aumentou o conteúdo de glutatona e diminuiu as EROs em embriões de dois dias expostos ao choque térmico de 41°C durante seis horas e que a adição de concentrações mais elevadas de antocianinas ao meio de cultura do grupo em choque térmico não aumentou a taxa de desenvolvimento embrionário (SAKATANI et al., 2007).

O antioxidante lipossolúvel astaxantina, um carotenoide proveniente de produtos de pesca, restaurou os efeitos deletérios do choque térmico de 40,5°C no desenvolvimento de embriões bovinos e o nível de expressão de RNAm de uma proteína adaptadora de estresse oxidativo- *Src homology 2 domain-containing transforming protein C1* (SHC1) e superóxido dismutase 2 (SOD2- espécie reativa de oxigênio mitocondrial) foi mais baixo no grupo submetido ao choque térmico e tratado com astaxantina. Tais resultados indicaram que a adição de astaxantina melhorou o desenvolvimento embrionário pela alteração na expressão de genes relacionados às espécies reativas de oxigênio e apoptose (NAMEKAWA et al., 2010).

Conclusão

Nas regiões de clima tropical e subtropical o estresse térmico em vacas em lactação é um fator de grande impacto econômico para a pecuária leiteira. As estratégias atualmente disponíveis para solucionar esse problema ainda são muito limitadas. A diminuição da capacidade de desenvolvimento embrionário pré-implantacional é um dos principais fatores responsáveis pelo complexo

mecanismo pelo qual o estresse térmico reduz a fertilidade das vacas lactantes. A redução na competência de desenvolvimento embrionário decorre das inúmeras alterações celulares induzidas pelo estresse térmico, destacando-se os danos ao citoesqueleto, a indução da apoptose e o estresse oxidativo embrionário. O conhecimento dos danos celulares e dos mecanismos desencadeados pelo estresse térmico são de grande impor-

tância para o desenvolvimento de medidas corretivas destinadas a minimizar os efeitos adversos da temperatura elevada na função reprodutiva dos bovinos.

Agradecimentos

FAPESP (processo número 2010/04728-0).

Referências

- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 390-396, 2002.
- AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2611-2616, 1999.
- AL-KATANANI, Y. M.; HANSEN, P. J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 2, p. 174-180, 2002.
- ARÉCHIGA, C. F.; VIIZQUEZ-FLORES, S.; ORTÍZ, O.; HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; PORRAS, A.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Effect of injection of b-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 50, p. 65-76, 1998a.
- ARÉCHIGA, C. F.; STAPLES, C. R.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Effects of timed insemination and supplemental beta-carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 390-402, 1998b.
- BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; DIAZ, T.; DROST, M.; WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 39, p. 797-810, 1993.
- BADINGA, L.; COLLIER, R. J.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 1, p.78-85, 1985.
- BARNES, F. L.; FIRST, N. L. Embryonic transcription in vitro cultured bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 2, n. 2, p. 117-123, 1991.
- BERMAN, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; MAMEN, M.; HERZ, Z.; WOLFENSON, D.; ARIEL, A.; GRABER, Y. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical environment. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 1488-1495, 1985.
- BIGGERS, B. G.; GEISERT, R. D.; WETTEMAN, R. P.; BUCHANAN, D. S. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. **Animal Science**, v. 64, n. 5, p. 1512-1518, 1987.
- BRAD, A. M.; HENDRICKS, K. E. M.; HANSEN, P. J. The block to apoptosis in bovine two-cell embryos involves inhibition of caspase-9 activation and caspase-mediated DNA damage. **Reproduction**, v. 134, n. 6, p. 789-79, 2007.
- CARAMBULA, S. F.; OLIVEIRA, L. J.; HANSEN, P. J. Repression of induced apoptosis in the 2-cell bovine embryo involves DNA methylation and histone deacetylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, n. 2, p. 418-421, 2009.
- CHANDOLIA, R. K.; PELTIER, M. R.; TIAN, W.; HANSEN, P. J. Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1644-1648, 1999.
- DE CASTRO E PAULA, L. A.; HANSEN, P. J. Modification of actions of heat shock on development and apoptosis of cultured preimplantation bovine embryos by oxygen concentration and dithiothreitol. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 75, n. 8, p. 1338-1350, 2008.
- DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, v. 98, n. 24, p. 13734-13738, 2001.
- DUNCAN, R. F.; HERSHEY, J. W. B. Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. **Journal of Cell Biology**, v. 109, pt. 1, p. 1467-1481, 1989.
- DUNLAP, S. E.; VINCENT, C. K. Influence of postbreeding thermal stress on conception rate in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 32, n. 6, p. 1216-1218, 1971.
- EALY, A. D.; HOWELL, J. L.; MONTERROSO, V. H.; ARECHIGA C. F.; HANSEN, P. J. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 5, p. 1401-1407, 1995.
- EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 10, p. 2899-2905, 1993.
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 340-346, 1996.
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, n. 2, p. 138-145, 1997.
- HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82/83, p. 349-360, 2004.

- HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER III, C. E.; CHASE JR, C. C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 91-103, 2001.
- JU, J. C.; JIANG, S.; TSENG, J. K.; PARKS, J. E.; YANG, X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 64, n. 8, p. 1677-1689, 2005.
- KIM, J.; LIU, H.; TAZAKI, M.; NAGATA, M.; AOKI, F. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 1, p. 37-46, 2003.
- MARTELLO, L. S.; SAVASTANO JÚNIOR, H.; LUZ E SILVA, S.; TITTO, E. A. L. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p.1 81-191, 2004.
- MATWEE, C.; KAMARUDDIN, M.; BETTS, D. H.; BASRUR, P. K.; KING, W. A. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 9, p. 829-837, 2001.
- NAMEKAWA, T.; IKEDA, S.; SUGIMOTO, M.; KUME, S. Effects of astaxanthin-containing oil on development and stress-related gene expression of bovine embryos exposed to heat stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 387-391, 2010.
- NOVER, L.; SCHARF, K. D. Heat shock proteins. In: _____. (Ed): **Heat shock response**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 41-128.
- PARK, J. S.; JEONG, Y. S.; SHIN, S. T.; LEE, K. K.; KANG, Y. K. Dynamic DNA methylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. **Developmental Dynamics**, v. 236, p. 2523-2533, 2007.
- PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; MAJEWSKI, A. C.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 7, p. 2343-2351, 2003.
- PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 295, n. 1, p. 37-42, 2002a.
- PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1169-1177, 2002b.
- PIRES, M. F. A.; FERREIRA, A. M.; SATURNINO, H. M.; TEODORO, R. L. Taxa de gestação em fêmeas da raça Holandesa confinadas em free stall, no verão e inverno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 1, p. 57-63, 2002.
- PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. **Theriogenology**, v. 30, n. 2, p. 195-209, 1988.
- RIVERA, R. M.; DAHLGREN, G. M.; DE CASTRO E PAULA, L. A.; KENNEDY, R. T.; HANSEN, P. J. Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development. **Reproduction**, v. 128, n. 1, p. 33-42, 2004.
- RIVERA, R. M.; KELLEY, K. L.; ERDOS, G. W.; HANSEN, P. J. Reorganization of microfilaments and microtubules by thermal stress in two-cell bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1852-1862, 2004.
- RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 107-115, 2001.
- ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEL, J. D.; GODKE, R. A.; HANSEN, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 657-665, 1998.
- ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, n. 1, p. 83-90, 2000.
- SAKATANI, M.; ALVAREZ, N. V.; TAKAHASHI, M.; HANSEN, P. J. Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 3080-3091, 2012.
- SAKATANI, M.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, n. 1, p. 77-82, 2004.
- SAKATANI, M.; SUDA, I.; OKI, T.; KOBAYASHI, S.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 3, p. 605-614, 2007.
- SAKATANI, M.; YAMANAKA, K.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. Heat shock-derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in in vitro early stage bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 6, p. 496-501, 2008.
- ST-PIERRE, N. R.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic losses from heat stress by US livestock industries. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. E52-E77, 2003. Supplement.
- TROUT, J. P.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. 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.
- WEST, J. W. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 2131-2144, 2003.
- WILLIAMS, T. J.; ELSDEN, R. P.; SEIDEL, G. E. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 521-531, 1984.
- WILSON, S. J.; MARION, R. S.; SPAIN, J. N.; SPIERS, D. E.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 8, p. 2124-2131, 1998.