

Influência do estresse calórico na produção *in vitro* de oócitos e embriões de vacas Holandesas de alta produtividade

Influence of heat stress on in vitro oocyte and embryo production in high-yielding Holstein cows

Francieli Berling^{1*} , Fernanda Cavallari de Castro¹ , Ana Carolina dos Santos Oliveira¹ 

¹Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, Santa Catarina, Brasil

²Koe Bio Embryo Laboratorio LTDA, Carambei, Paraná, Brasil

*Correspondente: franci liberling@gmail.com

Resumo

Objetivou-se avaliar a influência do estresse térmico em oócitos utilizados na produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos da raça Holandesa de alta produtividade no dia da aspiração folicular (OPU; 0), 30, 60 e 90 dias antes da OPU. A partir da temperatura média no dia 0 e aos 30, 60 e 90 dias anteriores, foram classificados nos grupos conforto (CT; até 15°C) e estresse por calor (ET - acima de 15°C). Observou-se influência negativa em oócitos e embriões viáveis (total e grau I). A submissão ao estresse térmico nos períodos de 30 e 60 dias anteriores à OPU resultou em menor produção de oócitos viáveis (P=0,0028; P=0,0092, respectivamente). Sob estresse, no dia da OPU (ET-OPU), as vacas não apresentaram redução na quantidade de oócitos viáveis (P=0,5497) e não houve influência da temperatura para o grupo estressado 90 dias antes da OPU (P=0,8287). Para embriões totais, a diferença ocorreu apenas no grupo ET-30 (P=0,0317), onde os grupos ET-OPU, ET-60, ET-90 apresentaram, respectivamente, P=0,1987, P=0,0596 e P=0,4580. Em relação à produção de embriões grau 1, não houve diferença para os grupos ET-OPU (P=0,2291) e ET-90 (P=0,2868), porém houve redução para ET-30 (P=0,0143) e ET-60 (P=0,0253). Em resumo, o estresse por calor teve impacto negativo quando ocorreu 30 ou 60 dias antes da aspiração folicular. Além disso, 30 dias parece ser o período de maior suscetibilidade e que causa os maiores efeitos deletérios na viabilidade oocitária e na PIV.

Palavras-chave: Hipertermia; Estresse térmico; Aspiração Folicular; Vacas leiteiras.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the influence of thermal shock on oocytes used in the production of *in vitro* embryos (IVP) of high productivity Holstein cows on the day of follicular aspiration (OPU; 0), 30, 60 and 90 days before the OPU. From the mean temperature on day 0 and on the previous 30, 60 and 90 days, they were classified into comfort group (TC; up to 15°C) and heat stress (HS; above 15°C) groups. A negative influence was observed on oocytes and viable embryos (total and grade I). The heat stress in the periods of 30 and 60 days prior to OPU resulted in lower production of viable oocytes (P=0.0028; P=0.0092, respectively). Under stress, on the day of OPU (HS-OPU), cows showed no reduction in the amount of viable oocytes (P=0.5497) and there was no influence of temperature for the group stressed 90 days before OPU (P=0.8287). For total embryos, the difference occurred only in the HS-30 group (P=0.0317), where the groups HS-OPU, HS-60, HS-90 presented, respectively, P=0.1987, P=0.0596 and P=0.4580. Regarding the production of embryos of grade 1, there was no difference for the groups HS-OPU (P=0.2291) and HS-90 (P=0.2868), but there was a reduction for HS-30 (P=0.0143) and HS-60 (P=0.0253). In summary, heat stress had a negative impact when it occurred 30 or 60 days before follicular aspiration. In addition, 30 days seems to be the period of more susceptibility and that causes the greatest deleterious effects on oocyte viability and IVP.

Keywords: Hyperthermia; Thermal shock; Ovum Pick Up; Dairy cows.

Recebido : 15 de fevereiro de 2022. Aceito: 7 de junho de 2022. Publicado: 5 de julho de 2022.



Introdução

Mudanças consideráveis caracterizaram a cadeia produtiva do leite nos últimos anos, embora a produção tenha sido ampliada, foi possível observar uma queda significativa no número de produtores e animais ⁽¹⁾. O número de vacas ordenhadas em 2020 foi de 16,2 milhões, um decréscimo de 0,8% em relação ao ano anterior, porém, a produtividade por animal aumentou e atingiu 2.192 litros/vaca por ano ⁽²⁾. Presumivelmente, esse crescimento se deve principalmente ao melhoramento genético desses animais por meio da introdução de biotecnologias que aumentaram a produtividade ⁽³⁾, incluindo a produção *in vitro* de embriões (PIV) ⁽⁴⁾.

A PIV é amplamente aplicada em animais de alto valor zootécnico, pois maximiza o potencial reprodutivo do rebanho ⁽⁵⁾ e aumenta a produtividade por animal, substituindo o rebanho por descendentes geneticamente melhorados em um curto período de tempo ⁽⁴⁾. Assim, é possível que uma fêmea gere em média trinta e seis filhotes por ano, enquanto naturalmente ela geraria apenas um ⁽⁶⁾.

As raças bovinas europeias são altamente selecionadas para a produção leiteira, dentre elas, as Holandesas se destacam por sua produtividade e por serem cosmopolitas ⁽⁷⁾. No entanto, as vacas taurinas são menos resistentes à hipertermia quando comparadas às raças *Bos taurus indicus*, devido à sua menor capacidade de dissipação de calor para o ambiente ⁽⁸⁾. Nesse contexto, o clima brasileiro pode eventualmente expor esses animais à altas temperaturas e umidade relativa do ar, além da alta incidência de radiação solar, de forma a causar uma quebra da homeostase corporal, impactando negativamente tanto no desempenho produtivo quanto reprodutivo do rebanho ⁽⁹⁾.

As condições climáticas impostas às matrizes influenciam na PIV, onde o desenvolvimento embrionário é comprometido pela alta sensibilidade às altas temperaturas apresentadas tanto pelos oócitos quanto pelos embriões ⁽¹⁰⁾. Essas condições associadas aos altos níveis metabólicos das vacas de alta produção ⁽⁸⁾ tornam as vacas Holandesas mais suscetíveis ao estresse térmico e, conseqüentemente, os oócitos têm menor capacidade de gerar blastocistos ⁽¹¹⁾.

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da temperatura ambiente no dia da OPU (0) e da temperatura média 30, 60 e 90 dias antes do procedimento na viabilidade do oócito produzido. Além disso, foi comparada a produção *in vitro* de embriões totais e grau I de oócitos submetidos ao estresse térmico *in vivo* no dia 0 e nos períodos de 30, 60 e 90 dias anteriores ao procedimento.

Material e métodos

Animais

O presente estudo utilizou dados coletados de junho de 2018 a agosto de 2019 sobre a produção *in vitro* de embriões de um laboratório comercial. Todos os dados foram provenientes de uma única fazenda leiteira, localizada na cidade de Carambeí, estado do Paraná, Brasil, sob as coordenadas 24°47'02.0"S, 50°12'30.5"W. As informações referentes à classificação de oócitos e embriões de 326 vacas leiteiras, com idades entre 4 e 14 anos, foram alocadas em planilha do programa Microsoft Excel 365[®], adotando como critério de exclusão vacas cuja média de lactação em 305 dias foi inferior a 8.000 kg de leite. O rebanho permaneceu confinado em sistema Free Stall com ventilação e aspersão de água e apresentou uma produção média geral de 42 kg de leite/dia/animal e foi homogêneo quanto à condição corporal, que foi classificada como excelente.

Em relação ao número de oócitos coletados, dentre as trezentas e vinte e seis matrizes classificadas como de alta produção (n=326), 138 vacas foram alocadas no grupo denominado conforto térmico no dia da OPU (CT-OPU) e 186 no grupo de estresse por calor (ET-OPU); trinta dias antes da OPU 144 estavam no grupo conforto (CT-30) e 182 no estresse térmico (ET-30); aos sessenta dias 142 (CT-60) e 183 (ET-60); e aos 90 dias 85 (CT-90) e 238 (ET-90). Este é um estudo retrospectivo, portanto, não houve necessidade de aprovação por um comitê de ética.

Temperatura e umidade

A partir de relatório publicado pelo Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil (INMET), foram obtidas as médias de temperatura e umidade relativa do ar para o dia da aspiração folicular (OPU), aos 30, 60 e 90 dias anteriores ao procedimento. Com base nessas informações, as matrizes foram classificadas em grupo controle e grupo estresse térmico aos 0, 30, 60 e 90 dias antes da aspiração. A faixa de temperatura definida por Klein ⁽¹²⁾ como ideal para vacas Holandesas de alto rendimento está entre 4 e 15°C. O limite médio de umidade relativa citado como ideal para o bem-estar animal está entre 50-90% ⁽¹³⁾.

No presente estudo, uma vez que os dados médios de Umidade Relativa, obtidos no dia da OPU (83,8°C ± 6,9), em 30 (81,1°C ± 4,5), 60 (81,5°C ± 8,2) e 90 (81,3 °C ± 7,9) dias anteriores ao processo permaneceram muito próximos e com pequeno desvio padrão (<10%), apenas a variável temperatura média foi fixada para análise dos dados, calculada para cada um dos grupos (0, 30, 60 e 90 dias). Assim, os animais expostos à uma temperatura média acima de 15°C foram classificados como grupo de estresse térmico e aqueles dentro da faixa de conforto (até

15°C) foram chamados de grupo controle (conforto térmico).

Análise de dados

A análise estatística utilizou o teste Anova Two Way com auxílio do software Graphpad Prism 8[®]. Primeiramente, para cada período (dia 0, 30, 60 e 90) foram comparados um grupo controle e um grupo de estresse. Além disso, foram estabelecidas comparações simultâneas entre todos os grupos CT e ET com todos os períodos (dia 0, 30, 60 e 90). Esta metodologia foi aplicada a cada variável estudada (oócitos viáveis, embriões totais e grau I).

Por fim, para aumentar a acurácia, foi utilizado o teste T-Student, que comparou o número de oócitos viáveis aspirados no grupo conforto versus estresse térmico para cada período (0, 30, 60 e 90). Além disso, usando a mesma metodologia, a produção de embriões total e grau I foi comparada nos grupos controle e estresse.

Resultados

Ao aplicar o teste Anova Two Way, observou-se a influência da temperatura na produção de oócitos ($P = 0,0012$), embriões totais ($P = 0,0024$) e embriões grau I ($P = 0,0003$). No caso dos ovócitos, o impacto da temperatura foi pronunciado por um período de trinta dias; os grupos CT-30 e ET-30 diferiram entre si e dos demais grupos pelo teste Anova. Ou seja, vacas submetidas ao estresse calórico trinta dias antes da aspiração folicular produziram oócitos viáveis em quantidade significativamente menor do que as observadas nos demais grupos avaliados.

Em relação ao teste T de Student, a submissão ao estresse térmico nos períodos de 30 e 60 dias anteriores à OPU resultou em menor produção de oócitos viáveis para o grupo estressado ($P = 0,0028$; $P = 0,0092$, respectivamente). Quando sob estresse térmico no dia 0 (ET-OPU), as vacas não apresentaram redução no número de oócitos viáveis ($P = 0,5497$), assim como não houve influência da temperatura para o grupo estresse no período de 90 dias antes da OPU ($P = 0,8287$). Os resultados da produção de oócitos analisados pelo teste T são mostrados na Figura 1.

Para embriões totais (Figura 2), a diferença ocorreu apenas no grupo ET-30 ($P = 0,0317$), pois os grupos ET-OPU, ET-60, ET-90 mostraram, respectivamente, $P = 0,1987$, $P = 0,0596$, $P = 0,4580$.

Em relação à produção de embriões grau I (Figura 3), não houve diferença para os grupos ET-OPU ($P = 0,2291$) e ET-90 ($P = 0,2868$), porém houve divergência expressiva para ET-30 ($P = 0,0143$) e ET-60 ($P = 0,0253$).

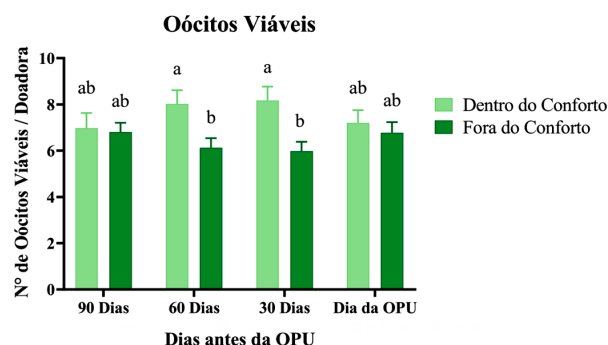


Figura 1. Número de oócitos viáveis produzidos pelos grupos conforto e estresse térmico no dia da OPU e aos 30, 60 e 90 dias anteriores ao procedimento.

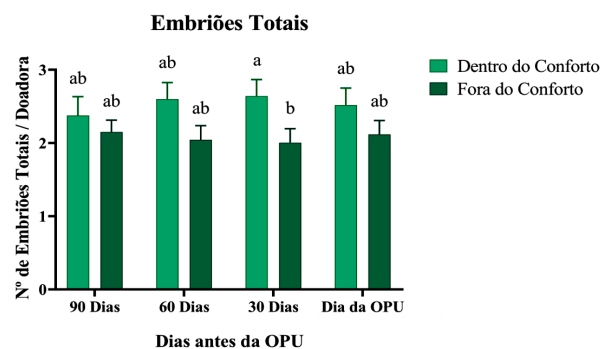


Figura 2. Número de embriões totais produzidos pelos grupos em conforto e estresse térmico no dia da OPU e aos 30, 60 e 90 dias anteriores ao procedimento.

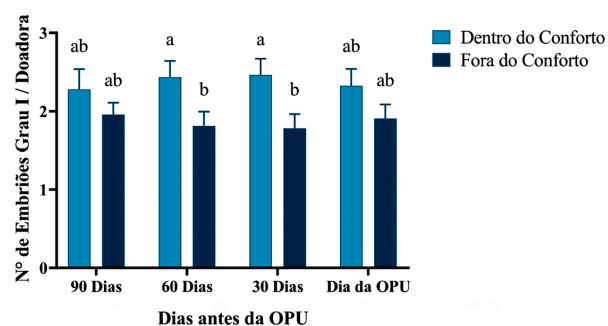


Figura 3. Número de embriões Grau I produzidos pelos grupos em conforto e estresse térmico no dia da OPU aos 30, 60 e 90 dias anteriores ao procedimento.

Discussão

Sabe-se que altas temperaturas impactam negativamente na qualidade oocitária de vacas *Bos taurus*, o que consequentemente dificulta o desenvolvimento embrionário *in vitro* (14,15). Durante o período em que as temperaturas diminuem é possível observar maior quantidade (14) e qualidade de oócitos, o que por sua vez proporciona melhor desenvolvimento

embrionário⁽¹⁵⁾. Além disso, vacas Holandesas de alto rendimento são mais propensas ao estresse térmico e quando submetidas à altas temperaturas reduzem a taxa de concepção *in vivo*⁽¹⁶⁾.

No presente estudo, ao avaliar 326 animais da raça Holandesa de alto rendimento em excelente condição corporal, foi demonstrado que a temperatura tem influência na viabilidade oocitária, bem como no desenvolvimento embrionário *in vitro* e na qualidade dos embriões gerados. Dessa forma, a partir do teste T Student foi possível identificar os períodos em que as matrizes da raça Holandesa, submetidas a estresse térmico, sofreram impacto negativo na produção *in vitro* de embriões.

O grupo exposto ao estresse térmico 90 dias antes da aspiração folicular não diferiu estatisticamente do grupo conforto para nenhuma das classes avaliadas. No entanto, para o período de 60 dias, a viabilidade oocitária foi maior no grupo CT. Esses dados estão de acordo com as informações geradas por Britt⁽¹⁷⁾, que indicou um tempo estimado de 60-80 dias para o desenvolvimento dos folículos desde o recrutamento (fase primária) até a maturação.

Portanto, a razão de não haver divergência entre os grupos ET-90 e CT-90 pode ser explicado pelo fato de que a exposição à altas temperaturas ocorreu em um intervalo de tempo maior que o necessário para o crescimento folicular, de modo que houve tempo suficiente para o surgimento de folículos saudáveis. Apesar disso, há relatos do efeito residual durante o outono devido ao estresse sofrido no verão⁽¹⁸⁾, o que desencadeia uma baixa taxa de produção de blastocistos em até 105 dias pós-estresse⁽¹⁹⁾.

Quando o folículo é exposto à condições adversas no período inicial de crescimento a expressão gênica pode ser afetada, causando alterações no desenvolvimento e gerando folículos maduros disfuncionais com oócitos e corpo lúteo de baixa qualidade⁽¹⁷⁾, pois neste período ocorre intensa transcrição e tradução em oócitos⁽²⁰⁾. Portanto, há relatos de regulação negativa durante o verão na expressão de genes associados à maturação oocitária (BMP15; GDF9 e FGF 8, 10, 16 e 17), bem como aqueles relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial (GAPDH, GDF9 e POU5F1)²¹.

Além disso, o início do desenvolvimento folicular é caracterizado por uma alta taxa de mitose das células da granulosa, permanecendo alta até que o folículo atinja diâmetros entre 0,68 – 1,52 mm e atinja o pico da atividade mitótica⁽²²⁾. Desde então, o desenvolvimento folicular é baseado no crescimento exponencial do antro⁽²²⁾.

Nesse contexto, a alta temperatura reduz a viabilidade das células da teca e da granulosa, causando baixa produção de androstenediona e estradiol^(23, 18). Há divergência de dados na literatura sobre a alteração

causada nas gonadotrofinas, porém a maioria sugere que há redução dos níveis plasmáticos^(24,19) e foliculares de inibina⁽²³⁾, aumento da concentração de FSH⁽²⁴⁾ e bloqueio da a onda pré-ovulatória de LH⁽²⁵⁾.

Em contrapartida, já foi observado aumento nas concentrações de LH⁽²⁶⁾, e, em relação ao padrão de secreção também foi relatada diminuição da amplitude⁽²⁷⁾ e da frequência⁽²⁸⁾ de pulso de LH. Talvez essas discrepâncias sejam explicadas pelos níveis de estradiol pré-ovulatórios, uma vez que a amplitude dos pulsos tônicos e plasmáticos de LH pré-ovulatórios induzidos por GnRH estão diminuídos em vacas com baixas concentrações plasmáticas de estradiol, mas não em vacas com altas concentrações⁽²⁷⁾.

Essas alterações endócrinas podem interromper o desenvolvimento folicular por efeito imediato⁽²⁹⁾ ou tardio, pois já foi encontrado efeito residual na esteroidogênese de até 26 dias em vacas Holandesas, mesmo após breve exposição ao ET por 5 dias⁽³⁰⁾. Além disso, níveis reduzidos de andrógenos podem resultar em atresia folicular precoce⁽³⁰⁾. Ferreira *et al.*⁽¹¹⁾ relataram menor quantidade de oócitos viáveis do que aqueles coletados no mesmo período da estação fria, indicando menor competência de oócitos sob estresse térmico.

Os efeitos deletérios causados pelas altas temperaturas sobre o funcionamento do aparelho reprodutor podem durar meses⁽³¹⁾, porém, para o folículo se desenvolver desde o aparecimento do antro até a fase pré-ovulatória (0,13 mm a 8,56 mm), aproximadamente 42 dias são necessários, ou seja, 2 ciclos estrais⁽²²⁾.

No entanto, Al-katanani *et al.*⁽³²⁾, ao estudar vacas sob estresse térmico ao longo do verão, não encontraram redução dos efeitos térmicos na qualidade oocitária após os animais serem resfriados por um período de 42 dias antes da coleta dos gametas, indicando que o dano ao oócito ocorre em um período superior a 42 dias, ou seja, antes do período antral. Assim, essa informação corrobora a dissimilaridade encontrada entre os grupos CT-60 e ET-60, mostrando que a ET causa efeitos deletérios quando há exposição 60 dias antes da OPU. Esses achados se somam aos de Fialho *et al.*⁽³³⁾, que encontraram redução na viabilidade dos complexos *cumulus* oócitos com exposição por 60 dias em animais da raça Pantaneira.

Quando o período de exposição coincide com o início da maturação nuclear os embriões gerados podem falhar na ativação genômica e, consequentemente, no desenvolvimento para os estágios de mórula compacta e blastocisto expandido⁽³⁴⁾. A conexão das junções comunicantes das células do *cumulus* está altamente relacionada ao estado da cromatina e ao desacoplar esses canais observa-se a degradação da vesícula germinativa^(35,36). Dessa forma, altas temperaturas durante a maturação têm impacto negativo nas junções comunicantes, causando aceleração na condensação da cromatina do oócito e danos ao desenvolvimento

posterior⁽³⁷⁾.

Neste estudo, apesar do número de embriões totais não ter diferido nas vacas em conforto térmico quando comparadas àquelas submetidas a altas temperaturas 60 dias antes da OPU, a quantidade de embriões grau I foi superior no grupo CT, sugerindo que a baixa competência oocitária ocasionada pelo estresse térmico não influencia de modo significativo a quantidade de embriões produzidos, mas afeta a qualidade destes.

Estudos *in vivo* mostram que, sob estresse térmico, as novilhas geram menos embriões classificados como excelentes/bons e mais vesículas anormais e de desenvolvimento retardado⁽³⁸⁾. Anormalidades como blastômeros extrusados da massa celular ou em degeneração, apresentando forma irregular e aparência granular e escurecida podem ser observados⁽³⁹⁾.

Ademais, oócitos obtidos no inverno apresentam citoplasma escuro e homogêneo, enquanto aqueles recuperados no verão podem apresentar-se escuros e heterogêneos, essas irregularidades são ocasionadas pela modificação dos lipídeos desencadeadas pelo estresse térmico⁽⁴⁰⁾. Os autores observaram que durante o verão oócitos, células da granulosa e fluido folicular apresentaram maior porcentagem de ácidos graxos saturados, enquanto no inverno, oócitos e células da granulosa apresentaram maior porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados.

Os ácidos graxos saturados podem aumentar a estabilidade da membrana celular, enquanto os insaturados causam uma diminuição na estabilidade⁽⁴¹⁾. A forma saturada ainda inibe a sobrevivência e proliferação de células da granulosa em vacas de alta produção⁽⁴¹⁾. Deste modo, a temperatura pode influenciar as propriedades bioquímicas da membrana do oócito e esta, por sua vez, influenciar a funcionalidade e a fertilidade, causando impacto negativo na capacidade dos gametas de se desenvolverem até o estágio de blastocisto durante os períodos quentes⁽⁴⁰⁾.

Possivelmente, a dissimilaridade observada entre embriões grau I e não em embriões totais se dá pelo fato de que oócitos submetidos ao ET *in vivo* permanecem aptos a serem fertilizados e sofrerem as clivagens iniciais *in vitro*, entretanto a qualidade é reduzida. Para novilhas, a taxa de fertilização é semelhante em grupos termoneutros e estressados pelo calor⁽³⁴⁾, sugerindo que dependendo do grau de estresse a fertilização não é afetada, ou ainda que não foram observadas alterações por se tratar de novilhas, as quais são menos susceptíveis ao estresse do que vacas em lactação.

Oócitos maturados^(42,43), bem como aqueles fertilizados *in vitro*⁽⁴⁴⁾ sob estresse térmico resultam em menor taxa de clivagem e baixa capacidade de se desenvolverem até blastocisto^(42,44,43). Contudo, Ferreira *et al.*⁽¹¹⁾ ao coletarem oócitos de vacas Holandesas de alta

produção a partir da metade do verão, ou seja, de animais submetidos à altas temperaturas por mais de trinta dias, encontraram taxas de clivagem *in vitro* semelhantes entre o grupo de verão e de inverno, mas a quantidade de blastocisto foi reduzida. Al-Katanani *et al.*⁽³²⁾ encontraram resultados semelhantes a Ferreira *et al.*⁽¹¹⁾, portanto, algum componente do embrião formado a partir do oócito foi danificado pelo ET^(32,29).

O grupo submetido ao estresse calórico 30 dias antes da aspiração folicular apresentou viabilidade oocitária (graus I, II e III), bem como produção de embriões totais e grau I, significativamente menores nos grupos estressados. Os dados obtidos neste estudo estão de acordo com informações encontradas na literatura, onde é conhecida a baixa competência de oócitos de vacas Holandesas em períodos de altas temperaturas^(32,29).

Ainda que o ET possa levar o oócito a apoptose tanto na fase de maturação quanto nos estágios iniciais de desenvolvimento⁽⁴⁵⁾, a indicação da influência térmica na viabilidade oocitária através do teste Anova em exposição prévia de 30 dias, sugere que este intervalo de tempo seja o ponto mais crítico e de maior susceptibilidade ao estresse térmico. Uma vez que, o teste apresenta menor sensibilidade, ou seja, ET-30 e CT-30 diferiram de forma expressiva entre si e dos demais grupos, de modo que foi possível a detecção do impacto térmico no período de 30 dias.

Ao submeter novilhas Holandesas ao ET por 10 horas antes da inseminação, observou-se um aumento na incidência de embriões anormais ou retardados, indicando a sensibilidade dos oócitos ao ET no período periovulatório⁽³⁴⁾. Oócitos bovinos submetidos a choque térmico durante a maturação sofrem alterações celulares que resultam no atraso e/ou interrupção do desenvolvimento embrionário⁽⁴⁵⁾, pois coincide com os estágios iniciais de maturação nuclear e citoplasmática⁽⁴⁶⁾.

O tempo de exposição do grupo ET-30 está de acordo com o período final de crescimento citado por Lussier *et al.*⁽²⁰⁾. A queda na produtividade embrionária causada pela exposição à hipotermia neste período possivelmente se deve à inibição da síntese proteica⁽⁴⁷⁾ e à retomada da meiose para a metáfase II⁽⁴⁸⁾, uma vez que o processo meiótico é extremamente sensível à altas temperaturas⁽³⁴⁾. *In vitro*, esta interrupção da maturação nuclear é observada em oócitos bovinos sob estresse térmico⁽⁴⁹⁾.

O ET bloqueia a progressão da meiose I para a meiose II e aumenta a proporção de oócitos apoptóticos, comprometendo as taxas de fertilização⁽⁴⁹⁾. Além do material genético materno, o oócito fornece ao embrião organelas, RNA mensageiro e outras macromoléculas essenciais para o desenvolvimento embrionário⁽²⁹⁾. Dessa forma, o período inicial do embrião depende do RNAm do oócito para a síntese proteica⁽²⁹⁾ e qualquer

intervenção neste processo de transmissão acarreta danos irremediáveis ao embrião ⁽¹⁴⁾.

O grupo submetido ao estresse térmico no dia da aspiração folicular não diferiu do grupo controle na produção de oócitos viáveis, embriões totais e embriões grau I. Estudo semelhante desenvolvido com vacas Pantaneiras por Fialho *et al.* ⁽³³⁾, não apontou alteração na viabilidade dos complexos *cumulus* oócitos quando o estresse ocorreu somente no dia da OPU. É possível que o período de estresse térmico de apenas um dia não tenha sido suficiente para desencadear efeitos deletérios ou ainda, não houve tempo necessário para a expressão dos efeitos negativos, vindo a ser manifestado posteriormente como ocorre em estresse a longo prazo durante o verão. Roth *et al.* ⁽⁵⁰⁾ demonstraram que vacas termicamente estressadas durante o verão apresentam efeito retardado durante o outono com queda na qualidade do oócito e no desenvolvimento embrionário.

Por conseguinte, técnicas para prevenir o estresse térmico em animais de alta produção e reduzir o impacto negativo na produção *in vitro* de embriões devem ser estudadas a fundo e analisadas quanto sua viabilidade para introdução no manejo preventivo. Vale ressaltar que várias semanas são necessárias para que os folículos comprometidos ovulem ou sofram atresia, dessa forma a fertilidade não é restaurada até que folículos danificados sejam removidos ⁽²⁹⁾. O melhoramento genético, com a introdução de genes termotolerantes, é uma possibilidade que deve ser estudada mais a fundo ⁽³¹⁾. Além disso, outra opção seria o uso de substâncias antioxidantes na alimentação animal ⁽³¹⁾ ou sua adição no ambiente *in vitro*, uma vez que o estresse térmico gera produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS's), comprometendo a função do oócito ⁽⁵¹⁾.

Conclusão

Vacas Holandesas de alta produtividade são mais suscetíveis a danos causados por altas temperaturas no desempenho reprodutivo. Todavia, a exposição ao estresse térmico no dia da OPU e 90 dias antes não afetou a viabilidade oocitária, qualidade e quantidade de embriões. Em contrapartida, à medida que o período de exposição se aproxima da aspiração folicular (60 e 30 dias antes), os danos se tornam mais evidentes. Novos estudos devem ser desenvolvidos para avaliar formas de reduzir os efeitos térmicos na produção de embriões em vacas Holandesas de alta produção. Nesse contexto, pode-se considerar a utilização de animais portadores de genótipos mais resistentes aos efeitos do calor, bem como a adoção de dietas ricas em antioxidantes.

Declaração de conflito de interesse

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

Contribuições do autor

Conceituação: F. Berling, F. C. de Castro e A. C. S. Oliveira; *Curadoria dos dados:* F. C. de Castro; *Análise Formal:* F. Berling e F. C. de Castro; *Investigação:* F. C. de Castro; *Metodologia:* F. C. de Castro e A. C. S. Oliveira; *Supervision:* A. C. S. Oliveira; *Visualização:* F. Berling; *Redação (rascunho original):* F. Berling; *Redação (revisão e edição):* F. Berling e F. C. de Castro.

Referências

1. Rocha DT, Carvalho GR, Resende JC. Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária [internet]. Embrapa; 2020 Aug [cited 2021 Sep 28]. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215880/1/CT-123.pdf>. Português.
2. Ibge. Produção da Pecuária Municipal 2020 [internet]. Ibge; 2021 [cited 2022 May 21]; 48:1-12. Available https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2020_v48-br_informativo.pdf.
3. Embrapa. Anuário de Leite 2019: Sua excelência, o consumidor [internet]. Embrapa; 2019 May [cited 2021 Sep 28]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1109959>.
4. Mello RRC, Ferreira JE, Sousa SLG, Mello MRB, Palhano HB. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. Rev Bras Reprod Anim [internet]. 2016 [cited 2022 Feb 07]; 40(2):58-64. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p58-64%20\(RB602\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p58-64%20(RB602).pdf).
5. Golçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 2 ed. São Paulo: Roca; 2016. Português.
6. Rumpf R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. R Bras Zootec. [internet]. 2007 [cited 2022 Feb 07]; 36. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007001000021>.
7. Alvim MJ, Paciullo DSC, Carvalho MM, Aroeira LJM, Carvalho LA, Novaes LP, Gomes AT, Miranda JEC, Ribeiro ACCL. Sistema de produção de leite com recria de novilhas em sistemas silvipastoris [internet]. Embrapa. 2005 Dec [Cited 2021 Sep 28]; (7). Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteRecriadeNovilhas/racas.htm#:~:text=Na%20pecu%C3%A1ria%20leiteira%2C%20considera%20Dse.%2C%20Guzer%C3%A1%2C%20Indubrasil%2C%20Sindi%20ou>.
8. Lopes FFP, Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpção MEOD, Visintin JA. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. Anim Reprod. [internet]. 2012 [cited 2022 Feb 07]; 9(3):395-403. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a605af7783717068b46f6>.
9. Pizzatto J, Vieira FMC, Macagnan R, Mayer LRR, Oliveira NS, Pilatti JA. Comparação da termorregulação de vacas holandesas em sistema compost barn. Bbiomet [internet]. 2017. Disponível em: https://cbbiomet.figshare.com/articles/journal_contribution/Comparação_da_termorregulação_de_vacas_holandesas_em_sistema_compost_barn/5193268.
10. Macedo GG, Silva EVC, Pinho RO, Assumpção TI, Jacomini JO, Santos RM, Martins LF. O estresse por calor diminui a fertilidade de fêmeas bovinas por afetar o desenvolvimento oocitá-

- rio e o embrião. *Rev Bras Reprod Anim.* [internet]. 2014 [cited 2022 Feb 07]; 38(2):80-85. Disponível em: [http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n2/pag80-85%20\(RB486\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n2/pag80-85%20(RB486).pdf)
- 11.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.* [internet]. 2011 [cited 2022 Feb 07]; 94(5):2383-2392. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3904>.
- 12.Klein BG. *Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária*. Sed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2014.
- 13.Lima MTV, Feitosa JV, Oliveira CW, Costa ANL. Influência da temperatura e umidade sobre o conforto térmico bovino em Barbalha, Ceará. *Pubvet* [internet]. 2019 [cited 2022 May 03]; 13(12): 477, 1-8. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n12a477>.
- 14.Gendelman M, Aroyo A, Yavin S, Roth Z. Seasonal effects on expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* [internet]. 2010 [cited 2022 Feb 07]; 140(1):73-82. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-10-0055>.
- 15.Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* [internet]. 1998 [cited 2022 Feb 07]; 49(3):657-65. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00016-8).
- 16.Pires MFA, Ferreira AM, Saturnino HM, Teodoro RL. Taxa de gestação em fêmeas da raça Holandesa confinadas em free stall, no verão e no inverno. *Arq Bras Med Vet Zootec.* [internet]. 2002 [cited 2022 Feb 07]; 54(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352002000100009>.
- 17.Britt JH. Impacts of Early Postpartum on Follicular Development and Fertility. In: *Proceedings of the Twenty-Fourth Annual Conference American Association of Bovine Practitioners* [internet]. 1991 Sep [cited 2022 Feb 07]; 18-21. Disponível em: <https://journals.tdl.org/bovine/index.php/AABP/article/view/6706>.
- 18.Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci* [internet]. 2000 [cited 2022 Feb 07]; 60-61:535-47. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00102-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00102-0).
- 19.Torres-Júnior JRS, Pires MFA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA, Ramos AA, Folhadella IM, Polisseni J, Freitas C, Clemente CAA, Sá Filho MF, Paula-Lopes FF, Baruselli PS. Effect of maternal heat stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* [internet]. 2008 [cited 2022 Feb 07]; 69(2):155-66. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.023>.
- 20.Roth Z. Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows: Insights into the Cellular and Molecular Responses of the Oocyte. *Annu Rev Anim Biosci* [internet]. 2017 [cited 2022 Feb 07]; 5:151-170. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022849>.
- 21.Ferreira RM, Chiaratti MR, Macabelli CH, Rodrigues CA, Ferraza ML. The infertility of repeat-breeder cows during summer is associated with decreased mitochondrial DNA and increased expression of mitochondrial and apoptotic genes in oocytes. *Biol Reprod* [internet]. 2016 [cited 2022 May 03]; 94(3):66, 1-10. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.133017>.
- 22.Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fert* [internet]. 1987 [cited 2022 Feb 07]; 81(2):301-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810301>.
- 23.Lew BJ, Meidan R, Wolfenson D. Concentrações hormonais e desenvolvimento folicular de vacas leiteiras em hipertermia sazonal e aguda. *Arq Bras Med Vet Zootec* [internet]. 2006 [cited 2022 Feb 07]; 58(5):816-822. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000500017>.
- 24.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. *J Reprod Fert* [internet]. 2000 [cited 2022 Feb 07]; 120(1):83-90. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11006149/#:~:text=The%20enhanced%20growth%20of%20follicles,cycle%3B%20P%20%3C%200.05>.
- 25.Armengol-Geloch 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. busereclin). *Theriogenology* [internet]. 2017 [cited 2022 Feb 07]; 91:121-126. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.001>.
- 26.Roman-Ponce H, Thatcher WW, Wilcox CJ. Hormonal interrelationships and physiological responses of lactating dairy cows to a shade management system in a subtropical environment. *Theriogenology* [internet]. 1981 [cited 2022 May 03]; 16(2): 139-154. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(81\)90097-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(81)90097-2).
- 27.Gilad E, Meidan R, Berman A, Graber Y, Wolfenson D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of estradiol in plasma of cyclic cows. *Journal of Reproduction and Fertility* [internet]. 1993. [cited 2022 May 03]; 99(2):315-321. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990315>.
- 28.Wise ME, Armstrong DV, Huber JT, Hunter, R, Wiersma F. Hormonal Alterations in the Lactating Dairy Cow in Response to Thermal Stress. *J Dairy Sci* [internet]. 1988. [cited 2022 May 03]; 71(9): 2480-2485. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16725628/>.
- 29.Hansen PJ. Antecedents of mammalian fertility: Lessons from the heat-stressed cow regarding the importance of oocyte competence for fertilization and embryonic development. *Animal Frontiers* [internet]. 2013 [cited 2022 Feb 07]; 3(4): 34-39. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/af.2013-0031>.
- 30.Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy U, Braw-Tal, R, Wolfenson D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* [internet]. 2001 [cited 2022 Feb 07]; 121(5):745-51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11427162/>.
- 31.Hansen PJ. Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted reproduction. *Anim Reprod* [internet]. 2019 [cited 2022 Feb 07]; 16(3):497-507. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0053>.
- 32.Al-katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci* [internet]. 2002 [cited 2022 Feb 07]; 85(2):390-6. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74086-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74086-1).

33. Fialho ALL, Souza-cáceres MB, Silva WAL, Arruda EDS, Kischel H, Ribeiro-Ferreira MGC, Medeiros CF, Silva JR, Oliveira MVM, Ferraz ALJ, Melo-Sterz, F. A. Efeito do estresse térmico calórico agudo e crônico sobre a qualidade oocitária de bovinos de raças adaptadas. *Arq Bras Med Vet Zootec* [internet]. 2018 [cited 2022 Feb 07]; 70(1):64-72. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9494>.
34. 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* [internet]. 1989 [cited 2022 Feb 07]; 19(1-2):37-51. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(89\)90045-6](https://doi.org/10.1016/0378-4320(89)90045-6).
35. Luciano AM, Franciosi F, Modena SC, Lodde V. Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s). *Biology of Reproduction* [internet]. 2011 [cited 2022 May 03]; 85(6): 1252-1259. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092858>.
36. Lodde V, Modena S, Galbusera C, Franciosi F, Luciano AM. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Mol Reprod Dev* [internet]. 2007 [cited 2022 May 03]; 74(6):740-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17075796/>.
37. Campen KA, Abbott CR, Rispoli LA, Payton RR, Saxton AM, Edwards JL. Heat stress impairs gap junction communication and cumulus function of bovine oocytes. *J Reprod Dev* [internet]. 2018 [cited 2022 May 03]; 64(5):385-392. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29937465/>.
38. Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* [internet]. 1988 [cited 2022 Feb 07]; 30(2):195-209. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90169-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90169-0).
39. Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology* [internet]. 1989 [cited 2022 Feb 07]; 31(4):765-78. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90022-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90022-8).
40. Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* [internet]. 2001 [cited 2022 Feb 07]; 121(3):447-54. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11226071/>.
41. Vanholder T, Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Maes D, Coryn M, Kruijff A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation *in vitro*. *Anim Reprod Sci* [internet]. 2005 [cited 2022 Feb 07]; 87(1-2):33-44. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.09.006>.
42. Ispada J, Rodrigues TA, Risolia PHB, Lima RS, Gonçalves DR, Rettori D, Nichi M, Feitosa WB, Paula-Lopes FF. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocyte. *Reprod Fertil Dev* [internet]. 2018 [cited 2022 Feb 07]; 30(9):1169-1179. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD17271>.
43. Rodrigues TA, Tuna KM, Alli AA, Tribulo P, Hansen PJ, Koh J, Paula-Lopes FF. Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock. *Reprod Fertil Dev* [internet]. 2019 [cited 2022 Feb 07]; 31(5):888-897. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD18450>.
44. Rivera RM, Hansen PJ. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* [internet]. 2001 [cited 2022 Feb 07]; 121(1):107-15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11226033/>.
45. Roth Z, Hansen PJ. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod* [internet]. 2004 [cited 2022 Feb 07]; 71(6):1898-906. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031690>.
46. Hyttel P, Callesen H, Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fert* [internet]. 1986 [cited 2022 Feb 07]; 76(2):645-56. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0760645>.
47. Edwards JL, Hansen P J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev* [internet]. 1997 [cited 2022 Feb 07]; 46(2):138-45. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199702\)46:2<138::AID-MRD4>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<138::AID-MRD4>3.0.CO;2-R).
48. Baumgartner AP, Chrisman CL. Cytogenetic analysis of ovulated mouse oocytes following hyperthermic stress during meiotic maturation. *Exp Cell Res* [internet]. 1981 [cited 2022 Feb 07]; 32(2):359-366. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(81\)90111-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(81)90111-7).
49. Roth Z, Hansen PJ. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* [internet]. 2005 [cited 2022 Feb 07]; 129(2):235-44. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00394>.
50. Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* [internet]. 2001 [cited 2022 Feb 07]; 122(5):737-44. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11690534/#:~:text=The%20results%20show%20a%20delayed,quality%20oocytes%20in%20the%20autumn>.
51. Cavallari, F. C.; Leal, C. L. V.; Zvi, R.; Hansen, P. J. Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock and oxidative stress during *in vitro* maturation. *Zygote* [internet]. 2019 [cited 2022 May 03]; 27(4):262. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31171044/>.