

VESÍCULAS EXTRACELULARES: UMA FORMA DE COMUNICAÇÃO INTRAFOLICULAR

Felipe Morales Dalanezi¹
Fernanda Fagali Franchi²
Patrícia Kubo Fontes²
Anthony César de Souza Castilho³
João Carlos Pinheiro Ferreira⁴

RESUMO

A produção de leite de bovinos taurinos apresenta uma série de entraves em regiões tropicais como o Brasil. Um desses entraves é o estresse térmico (ET), que acarreta uma perda econômica importante para os produtores. A perda de capital se deve em grande parte à queda na produção de leite e nas falhas reprodutivas associadas ao ET. Já foram demonstradas várias alterações reprodutivas oriundas do ET. A nível celular, foi notada a comunicação entre células foliculares, por meio de vesículas extracelulares (EVs). Foi observada a comunicação entre células do *cummuluse* células da granulosa por meio de EVs. Sendo assim, esta revisão tem por finalidade correlacionar as EVs produzidas no interior dos folículos com os efeitos do ET sobre os oócitos bovinos.

Palavras-chave: oócito, células do *cummulus*, estresse térmico.

EXTRACELLULAR VESICLES: A FORM OF INTRAFOLLICULAR COMMUNICATION

ABSTRACT

The production of taurine cattle milk presents a number of obstacles in tropical regions like Brazil. One of these barriers is the thermal stress (ET), which entails a major economic loss for producers. The loss of capital should largely fall in milk production and reproductive failures associated with ET. Already it has been demonstrated several reproductive changes arising from the ET. At the cellular level, it was noted between the communication follicular cells through extracellular vesicles (EVs). Communication was observed between cumulus cells and granulosa cells by EVs. Therefore, this review intends to correlate the EVs produced inside the follicles with the effects of ET on bovine oocytes.

Keywords: oocyte, cumulus cells, heat stress.

¹ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu. Contato para correspondência: fmdalanezi@gmail.com

² Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP – Botucatu.

³ Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente – SP.

⁴ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu.

VESÍCULAS EXTRACELULAR: UNA FORMA DE COMUNICACIÓN INTRAFOLLICULAR

RESUMEN

La producción de leche en el ganado taurina presenta una serie de obstáculos en las regiones tropicales como Brasil. Una de estas barreras es la tensión térmica (ET), lo que implica una pérdida económica importante para los productores. La pérdida de capital debe caer en gran medida en la producción de leche y fallas reproductivas asociadas con ET. Ya se ha demostrado varios cambios reproductivos derivados de la ET. A nivel celular se observó entre las células foliculares de comunicación a través de vesículas extracelulares (EVs). Se observó la comunicación entre las células del cúmulo y células de la granulosa de los vehículos eléctricos. Lo que esta revisión se pretende correlacionar los vehículos eléctricos producidos en el interior de los folículos con los efectos de ET en ovocitos bovinos.

Palabras clave: ovocitos, células del cumulus, el estrés por calor.

INTRODUÇÃO

Regiões de clima tropical apresentam verão com elevadas temperaturas médias. São bem conhecidos os decréscimos de fertilidade observados nos taurinos principalmente nos animais da raça Holandesa durante os meses mais quentes do ano. As perdas produtivas e reprodutivas associadas com o estresse térmico (ET) têm um significativo impacto econômico (1). Estimou-se que, em regiões tropicais, essa perda chega a € 69.379,00 por ano na bovinocultura leiteira devido aos efeitos do ET (2). Vacas sob ET podem diminuir sua produção diária de leite em até 40% (3). Já no âmbito da reprodução, o ET ocasiona a diminuição do crescimento folicular, redução das concentrações séricas de estradiol, comprometimento da dominância folicular e, ainda, atraso no dia esperado da luteólise (4); levando assim à falhas na fecundação, falhas no desenvolvimento embrionário, e no reconhecimento materno da gestação (5,6). Entretanto, os mecanismos fisiológicos que levam à infertilidade no verão são apenas parcialmente compreendidos.

Dentre os vários fatores presentes neste microambiente, encontram-se as vesículas extracelulares (EVs) as quais exibem funções biológicas pleiotrópicas (7). Os fatores que influenciam na classificação dessas vesículas são o tamanho, o formato, as proteínas de membranas, alguns lipídios estruturais e a origem. Estudos mostram, também, a presença de EXOs e MVs em diversos fluidos biológicos como saliva, plasma, urina (8-11) e também no líquido folicular de éguas (12). Essas EVs transportam principalmente proteínas, microRNAs (miRNAs) e RNAs mensageiros (mRNAs) e sua bicamada lipídica protege esse biomaterial (13).

AS EVs apresentam sua liberação estimulada por eventos que levam à injúria celular como estresse físico ou químico (14). O ET leva a alterações metabólicas que geram este tipo de estresse (15). As EVs são liberadas por células foliculares e desempenham função importante na transferência de moléculas para as células da granulosa e oócito (16,17). Com base no exposto, esta revisão tem como objetivo demonstrar a importância da comunicação celular pelas EVs e sua relação com a reprodução bovina durante episódios de estresse térmico.

REVISÃO DE LITERATURA

Microvesículas e Exossomos

A comunicação intercelular é muito importante para garantir uma resposta uniforme dos diferentes componentes do tecido (18). As células podem se comunicar pelo fluido extracelular (19), por ligações mediadas por moléculas e por nanotubos que estabilizam a passagem de substâncias da superfície e de componentes do citoplasma (20,21).

A descoberta de estruturas circulares secretadas pelas células não é recente. Quando foram descobertas, acreditava-se que eram resultado de um processo celular específico e demonstrou-se que tinham função de transportar enzimas funcionais na mesma proporção encontrada no citoplasma das células de origem (22). Entretanto, apenas estudos mais recentes demonstraram funções para as EVs secretadas por diversos tipos de células (18). Vesículas extracelulares são classificadas de acordo com o tamanho, morfologia, tipos de proteínas e lipídeos da membrana e a sua origem. As MVs e os EXOs apresentam, respectivamente, diâmetros entre 100 e 1000 nm e 40 a 150 nm (23,24).

As MVs são produzidas pela membrana plasmática enquanto que os EXOs são produzidos dentro de corpos multivesiculares e são secretados pela fusão entre a membrana plasmática e a membrana dos corpos multivesiculares (25). As MVs se originam pela fusão entre a membrana endossomal e a membrana plasmática e após essa fusão, estes componentes celulares são liberados pela superfície celular (26,27). De acordo com a Vesiclepedia (28), já foram descritas 43 mil proteínas, 342 lipídeos, 20 mil RNAs mensageiros e 2400 microRNAs no interior das EVs de diferentes tipos celulares e organismos.

Atualmente, já se sabe que os EXOs são produzidos pela internalização da membrana formando endossomos, que por sua vez são recobertos por outra membrana levando à formação dos corpos multivesiculares (MVBs) (29,30). Após essa formação, ocorre a fusão entre os MVBs e a membrana plasmática e liberam os EXOs do seu interior (31).

As EVs apresentam importante função no espaço intercelular e desempenham um papel de regulação da comunicação entre as células (18). Esta hipótese é fundamentada em observações que demonstraram que EVs liberadas pela célula doadora podem interagir com receptores específicos em outras células promovendo na célula alvo uma estimulação direta ou transferindo receptores de ligação (32,33). Esta interação pode ser limitada por uma ligação a um receptor na membrana da célula alvo, concretizando uma plataforma de recebimento dos complexos multimoleculares ou conduzindo um sinal para a célula, ambos os processos necessitam da internalização das EVs (34). Quando internalizadas, as EVs podem fundir suas membranas com os endossomos e liberar seu conteúdo no citoplasma das células alvo; outro caminho que as vesículas podem seguir é pela não ligação com os endossomos e ocorrer a transferência destas para os lisossomos ou serem descartadas pela fusão com a membrana plasmática (34).

A primeira observação de EVs em fluido folicular de mamíferos foi descrita em éguas, pela microscopia eletrônica e citometria de fluxo. Após a constatação da existência das mesmas, estudou-se a capacidade das vesículas em penetrar nas células da granulosa. Com o uso de EVs marcadas por fluorescência demonstrou-se a capacidade das vesículas em adentrar as células da granulosa tanto *in vivo* como *in vitro* (12). Outro grupo de pesquisadores observou que miRNAs presentes em EXOs isolados de fluido folicular de bovinos estão associados com a maturação oocitária, sugerindo que estes miRNAs podem ser utilizados como marcadores de qualidade oocitária (35).

Ainda não está claro se as células do *cummulus*, as células da granulosa e ou os oócitos secretam as EVs. O primeiro passo foi a realização da microscopia eletrônica do fluido folicular de folículos entre 3 e 6 mm de diâmetro, normalmente usados em procedimentos de aspiração para coleta de oócitos, assim pode-se observar a presença de MVBs contendo EXOs

no interior das células da granulosa e células do *cummulus*, sugerindo então que estes tipos celulares produzem e liberam as EVs para o fluido folicular (36).

Estudos levantaram a hipótese de que os EXOs desempenham função importante de transferir moléculas para as células da granulosa, na metade e no fim do ciclo estral de bovinos, os EXOs atuam aumentando a proliferação celular e estimulando a expressão de receptores de LH. As EVs são produzidas no interior dos folículos e agem sobre as células da granulosa (16).

A adição de EVs extraídas do fluido folicular de bovinos em meio de maturação de oócitos de ratas e vacas acarretou uma melhor expansão das células do *cummulus* bem como aumentou a expressão de genes relacionados a estas células em ambas as espécies (37).

1.1. Estresse Térmico

Em condições de estresse térmico (ET) uma vaca holandesa de alta produção pode atingir temperatura retal de 41,0°C, enquanto que sua temperatura média em condições de termoneutralidade é de 38,5 a 39,0°C. Porém, quando levamos em consideração os órgãos do sistema reprodutivo, esse aumento na temperatura é ainda mais relevante, pois a temperatura uterina pode atingir valores 0,2 a 0,5°C maiores que a retal (38).

Sob ET, o organismo possui alguns mecanismos para tentar restabelecer a temperatura ideal, sendo assim uma forma de perder calor é pela pele. Para tanto, ocorre um direcionamento de maior aporte sanguíneo para a periferia em detrimento dos órgãos internos. Esse direcionamento diminui a quantidade de sangue que atinge os órgãos internos e, por conseguinte o útero e os ovários, causando assim a queda da concentração de nutrientes e hormônios para esses órgãos (38). Recentemente foi demonstrado que o aporte sanguíneo para o sistema reprodutivo interno, útero e ovários diminui de 20 a 30% em animais sob ET, enquanto que o fluxo sanguíneo para a vulva aumenta cerca de 40%, devido a vasodilatação periférica (39).

Nas células, o estresse térmico (ET) leva a expressão de vários genes protetores que são regulados pelo fator de transcrição do estresse térmico (HSF) (40). O HSF rege a produção de proteínas do choque térmico (HSP), que possuem funções protetoras contra a hipertermia, hipóxia e isquemia cerebral durante o ET (41). Acredita-se que a resposta ao ET seja um mecanismo integrado de células e tecidos com o propósito de diminuir o dano das temperaturas elevadas à célula (42).

Quando as células são expostas a temperatura acima da faixa de conforto, algumas alterações ocorrem como: inibição da produção de proteínas, alterações no citoesqueleto, disfunções metabólicas, mudanças na dinâmica da membrana plasmática e diminuição da proliferação celular (43). Essas alterações levam às mudanças na expressão de alguns genes e, consequentemente, na produção proteica (44). O tempo e a eficiência da adaptação a essas condições é o que vai determinar a viabilidade ou a morte celular (42).

Todavia o ET pode alterar todas as fases do desenvolvimento folicular, como pode ser observado pela diminuição da diferença de tamanho entre folículos subordinados e dominantes, tanto animais que sofreram longo período de ET como animais submetidos a períodos curtos de estresse, ambos apresentaram uma continuação do crescimento dos folículos subordinados por mais tempo (45).

Em vista da ausência da dominância total de um dos folículos, há uma antecipação da segunda onda. Esse fenômeno provavelmente está relacionado a baixa concentração de inibina, que por sua vez não inibe a secreção de FSH, permitindo o crescimento do folículo subordinado (46). Essa falha na dominância além de atrapalhar o desenvolvimento correto da segunda onda (46), ainda altera a conformação uterina e a liberação de PGF2 α (47), diminuindo a capacidade de implantação do embrião (6).

Recentemente, observou-se que o ET levou a um aumento da taxa de perda fetal, diminuiu a porcentagem de prenhez, aumentou o número de fetos mortos ao nascimento,

aumentou a taxa de abortamento, e por fim aumentou o período de espera (período entre o nascimento e a primeira inseminação) e o intervalo entre os partos (48)

O efeito do ET sobre a liberação de LH é muito controverso. Alguns autores relatam aumento da liberação de LH (49), enquanto outros relatam que não há alteração (38,50) e ainda existem autores que defendem a diminuição da liberação de LH devido ao ET (51-54). A teoria mais aceita ainda é que o ET leve a diminuição da liberação de LH pela diminuição da amplitude (53) e da frequência (52) dos pulsos deste hormônio, sendo assim o folículo dominante desenvolve-se em baixas concentrações de LH, resultando em uma menor liberação de estradiol e uma diminuição na expressão do estro e conseqüentemente redução na fertilidade (6).

Em se tratando mais especificamente do oócito na espécie bovina, foi relatado que o ET leva a redução na capacidade do oócito se desenvolver em blastocisto (55), aumenta a chance de ocorrer anomalias durante a maturação oocitária (56), diminui a porcentagem de embriões saudáveis (57) e redução da esteroidogênese (58). A queda na capacidade oocitária pode estar associada ao fato dos oócitos sofrerem alterações morfológicas (59). Alterações no perfil de ácidos graxos de membrana e da homogeneidade do citoplasma estão presentes durante o ET, assim como foram observadas falhas no armazenamento do mRNA e da transcrição reversa desse oócitos (60).

COMENTÁRIOS FINAIS

As EVs desempenham uma função importante na comunicação celular de vários tecidos, inclusive reprodutivos. Sendo assim, o ET possui a capacidade de modificar o conteúdo das EVs, portanto essas vesículas produzidas durante situações de estresse têm a capacidade de sinalizar para outras células que devem modificar seu metabolismo visando sobreviver à situação adversa. Acredita-se que células foliculares apresentam esse tipo de comunicação evitando assim a morte oocitária.

REFERÊNCIAS

1. Igono MO, Bjotvedt G, Sanford-Crane HT. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. *Int J Biometeorol.* 1992;36(2):77-87.
2. Boni R, Perrone LL, Cecchini S. Heat stress affects reproductive performance of high producing dairy cows bred in an area of southern Apennines. *Livest Sci.* 2014;160:172-7.
3. Rhoads ML, Rhoads RP, VanBaale MJ, Collier RJ, Sanders SR, Weber WJ, et al. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J Dairy Sci [Internet].* 2009;92(5):1986-97.
4. Wilson SJ, Marion RS, Spain JN, Spiers DE, Keisler DH, Lucy MC. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J Dairy Sci.* 1998;81(8):2124-31.
5. Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci.* 2002;85(11):2803-12.

6. De Rensis F, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. *Theriogenology*. 2003;60(6):1139-51.
7. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2010;73(10):1907-20.
8. Caby M, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*. 2005;17(7):879-87.
9. Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, et al. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res*. 2009;8(3):1304-14.
10. Berckmans RJ, Sturk A, Van Tienen LM, Schaap MCL, Nieuwland R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood*. 2011;117(11):3172-80.
11. Pisitkun T, Shen R, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(36):13368-73.
12. da Silveira JC, Veeramachaneni DNR, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod*. 2012;86(3):71.
13. Taylor DD, Gercel-taylor C. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet*. 2013;4:1-12.
14. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 2006;20(9):1487-95.
15. Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*. 2010;4(07):1167-83.
16. Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, et al. Identification of MicroRNAs in human follicular fluid: characterization of MicroRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(7):3068-79.
17. Silveira JC, Winger QA, Bouma GJ, Carnevale EM. Effects of age on follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth factor- β signalling during follicle development in the mare. *Reprod Fertil Dev*. 2015;27(6):897-905.
18. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes / microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int*. 2010;78(9):838-48.

19. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzowski Z, Anna Kowalska M, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001;97(10):3075-85.
20. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 2004;303(5660):1007-10.
21. Sherer NM, Mothes W. Cytonemes and Tunnelling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol*. 2009;18(9):414-20.
22. De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, Roels F. Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. *Clin Chim Acta*. 1977;81(3):237-45.
23. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985;101(3):942-8.
24. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc cell Biol*. 2006;Chapter 3:Unit 3.22.
25. Raposo G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996;183(3):1161-72.
26. Heijnen BHFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Blood*. 1999;94(11):3791-9.
27. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, et al. Platelet and Megakaryocyte derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS*. 2003;17(1):33-42.
28. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):8-12.
29. Johnstone RM. Exosomes biological significance: a concise review. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36(2):315-21.
30. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):581-93.
31. De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*. 2011;16(3):235-49.

32. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reca R, Robert Turner A, et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*. 2001;98(10):3143-9.
33. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet J. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol*. 2004;11(3):156-64.
34. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009;19(2):43-51.
35. Soheli MMH, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, et al. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS One*. 2013;8(11).
36. Silveira JC, Andrade GM, Nogueira MFG, Meirelles F V, Perecin F. Involvement of miRNAs and cell-secreted vesicles in mammalian ovarian antral follicle development. *Reprod Sci*. 2015;22(12):1474-83.
37. Hung W-T, Christenson LK, McGinnis LK. Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. *Biol Reprod*. 2015;93(5):117.
38. Gwazdauskas FC, Thatcher WW, Wilcox CJ. Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination which may affect conception. *J Dairy Sci*. 1973;56(7):873-7.
39. Rocha DR, Salles MGF, Moura AN, Araújo A. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. *Rev Bras Reprod Anim*. 2012;36(1):18-24.
40. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J*. 2001;15(7):1118-31.
41. Lee WC, Wen HC, Chang CP, Chen MY, Lin MT. Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *J Appl Physiol*. 2006;100(6):2073-82.
42. Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, Baumgard LH. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. *J Dairy Sci*. 2008;91(2):445-54.
43. Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol*. 2002;92(4):1725-42.
44. Lanks KW. Modulators of the eukaryotic heat shock response. *Exp Cell Res*. 1986;165(1):1-10.
45. Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, et al. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol Reprod*. 1995;52(5):1106-13.
46. 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 Fertil*. 2000;120(1):83-90.

47. Shaham-Albalancy A, Folman Y, Kaim M, Rosenberg M, Wolfenson D. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF 2α secretion in the subsequent oestrous cycle. *Reproduction*. 2001;122(4):643-8.
48. El-Tarabany MS, El-Tarabany AA. Impact of maternal heat stress at insemination on the subsequent reproductive performance of Holstein, Brown Swiss, and their crosses. *Theriogenology*. 2015;84(9):1523-9.
49. 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*. 1981;16(2):139-54.
50. Gauthier D. The influence of season and shade on oestrous behaviour, timing of preovulatory LH surge and the pattern of progesterone secretion in FFPN and Creole heifers in a tropical climate. *Reprod Nutr Dev*. 1986;26(3):767-75.
51. Madan ML, Johnson HD. Environmental heat effects on bovine luteinizing hormone. *J Dairy Sci*. 1973;56(11):1420-3.
52. 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*. 1988;71(9):2480-5.
53. Gilad E, Meidan R, Berman A, Graber Y, Wolfenson D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J Reprod Fertil*. 1993;99(2):315-21.
54. Lee CN. Environmental stress effects on bovine reproduction. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1993;9(2):263-73.
55. Torres-Júnior JRS, Pires MFA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA, et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2008;69(2):155-66.
56. Andreu-Vázquez C, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Maya-Soriano MJ, Hunter RHF, López-Béjar M. Does heat stress provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation? *Zygote*. 2010;18(04):293-9.
57. 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*. 1988;30(2):195-209.
58. Roth Z, Meidan R, Wolfenson D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*. 2001;121(5):745-51.

59. 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*. 2001;121(3):447-54.
60. Gendelman M, Roth Z. Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes Is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. *Biol Reprod*. 2012;86(1):1-9.

Recebido em: 01/03/2016

Aceito em: 15/01/2017