

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS

ANAMARA PEREIRA

**VARIAÇÕES CLIMÁTICAS AO LONGO DO ANO E RESULTADOS
DA PIVE EM DOADORAS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS**

Alfenas – MG

2012

ANAMARA PEREIRA

**VARIAÇÕES CLIMÁTICAS AO LONGO DO ANO E RESULTADOS
DA PIVE EM DOADORAS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano, como parte das exigências do Mestrado em Ciência Animal para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Alfenas – MG

2012

Pereira, Anamara

Variações climáticas ao longo do ano e resultados da PIVE em doadoras de diferentes grupos genéticos/.— Anamara Pereira. – Alfenas, 2012.

59 f.

Orientador: Prof. Dr Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano

1. Bovinos 2. Fêmeas 3. Temperatura 4. Estresse
5. Embriões 6. Oócitos I. Título

CDU: 636.2:575(043)

VARIAÇÕES CLIMÁTICAS AO LONGO DO ANO E RESULTADOS DA PIVE EM DOADORAS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS

Dissertação apresentada como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciência Animal para a obtenção do título de *Magister Scientiae*, da Universidade José do Rosário Vellano.

Aprovado em: _____.

Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes (Orientador)

Universidade José do Rosário Vellano

Prof. Dr. Miller Pereira Palhão

Universidade José do Rosário Vellano

Prof. ^a Dra. Fabiana Cristina Varago

Universidade José do Rosário Vellano

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu força, coragem e sabedoria.

Aos meus pais, José Rubens e Lia, meu porto seguro, pessoas admiráveis, que nunca mediram esforços para a realização dos meus objetivos. Amo vocês!

Ao meu namorado Rodrigo, pelo amor, pela paciência, pelo companheirismo e pelos conselhos. Seu incentivo e sabedoria me fizeram realizar coisas admiráveis. Você é muito especial. Amo você!

Aos meus queridos avós, pela fé, pelo amor e pela presença constante em minha vida. Obrigada por estarem sempre comigo.

Aos meus familiares (Cíntia, Marquinho, Anna Lívia, Suelen, Erinaldo, Naldinho, Rovilson, Simone e Jéssica), pelo carinho, pelo apoio e pelo incentivo. Sei que posso contar sempre com vocês.

A família Rossini, que me acolheu de braços abertos com muito carinho. Os momentos de prazer que passei ao lado de sua família me fortaleceram para continuar minha caminhada.

As minhas queridas amigas Juliana e Ana Laura, pela amizade, pelo carinho e pelos ensinamentos. Sei que posso contar sempre com vocês.

Ao Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, pela amizade, pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança. A você, minha eterna admiração.

Ao Prof. Dr. Miller Pereira Palhão, pelos ensinamentos e pela colaboração com a análise estatística.

À BIOTRAN, que cedeu suas instalações e laboratórios para a execução do experimento.

Aos funcionários da BIOTRAN, pela disponibilidade e pelo apoio. Em especial, a Bruno Ludgero e a Eduardo Ramos pela atenção, pela disponibilidade e pela colaboração para a realização do experimento.

Aos proprietários dos animais, que gentilmente os cederam para a obtenção dos dados do experimento.

À médica veterinária e amiga Tatimara Maria Miyauchi, pelas palavras de fé e de incentivo, pela disponibilidade e pela colaboração com a minha dissertação.

Aos amigos do mestrado, Renatinha, Ariadne, Fabíola, Jules, Alexandre, Luiz Paulo, Leonardo e aos demais que fizeram parte destes dois anos de muito companheirismo, respeito, amizade, alegrias e tristezas.

À médica veterinária Thaís Camargo Rossi, pela colaboração.

À Universidade José do Rosário Vellano e do PROSUPI, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do mestrado, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos funcionários das Ciências Agrárias e do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, meu muito obrigada.

Aos animais.

À banca examinadora, pela disponibilidade e pela presença.

Enfim, a todas aquelas pessoas que fizeram e fazem parte de minha vida e merecem meu profundo agradecimento, muito obrigada.

Ajude sempre
Não tema
Jamais desespere
Aprenda incessantemente
Pense muito
Medita mais
Fale pouco
Retifique, amando
Trabalhe feliz
Dirija, equilibrado
Obedeça, contente
Não se queixe
Siga adiante
Repare além
Veja longe
Discuta serenamente
Faça luz
Semeie paz
Ame com resignação
Espalhe bençãos
Lute, elevando
Seja alegre
Viva desassombrado
Demonstre coragem
Revele calma
Respeite tudo
Ore confiante
Vigie, benevolente
Caminhe, melhorando
Sirva hoje
Espere o amanhã

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

PEREIRA, Anamara. **Variações climáticas ao longo do ano e resultados da PIVE em doadoras de diferentes grupos genéticos.** Orientador: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes. Alfenas: UNIFENAS, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de concentração Reprodução Animal).

Objetivou-se comparar a distribuição dos resultados da PIVE ao longo dos meses do ano em doadoras de diferentes grupos genéticos bovinos. Foram utilizados 2.309 resultados de aspirações foliculares, sendo 960 em fêmeas das subespécies *Bos taurus taurus* e 1349 em doadoras das subespécies *Bos taurus indicus*. O regime de manejo dos animais foi o semiconfinamento, e a suplementação mineral *ad libitum*. Utilizou-se aparelho de ultrassonografia, equipado com transdutor setorial microconvexo intravaginal de 7,5 MHz. Todos os folículos com diâmetro superior a 3 mm foram identificados e puncionados. Os Complexos Cumulus Oócitos (CCOs) recuperados foram transferidos para placas de cultivo 60x15mm contendo meio DPBS Flush onde foram selecionados, contados e classificados com base em seu aspecto morfológico. Os oócitos iniciaram seu desenvolvimento *in vitro* (Maturação, Fertilização e Cultivo), em situações que simulam artificialmente todos os processos biológicos do aparelho reprodutor da fêmea doadora bovina. As doadoras zebuínas apresentaram maior recuperação média por OPU de oócitos viáveis, totais e produção de embriões em relação aos taurinos respectivamente (6,9 vs 13,2; 11,6 vs 20,4 e 1,6 vs 4,0 ; $P < 0,05$). Considerando os grupos genéticos em conjunto, foram observadas diferenças na produção de embriões totais e na conversão de oócitos viáveis a embriões nas diferentes épocas do ano, apenas tendência à melhor conversão de embriões no inverno ($24,4 \pm 1,8$) em relação ao verão ($20,8 \pm 1,6$). A taxa média total de conversão de oócitos em embriões foi maior em zebuínas (23,5 vs 30,6 - $P < 0,0001$). As conversões diferiram em todos os meses ($P < 0,05$) entre zebuínos e taurinos, exceto no mês de maio. Nas fêmeas taurinas, as taxas de conversão se comportaram de maneira semelhante ao longo do ano, não sendo observadas diferenças. Conclui-se que vacas zebuínas produzem mais oócitos viáveis e totais que vacas europeias, que a produção de embriões é maior em vacas zebuínas, não somente pela maior produção de oócitos, mas também pela melhor taxa de conversão. Não

houve variação sazonal na produção de oócitos viáveis e totais e embriões nas vacas de origem europeia. Vacas zebuínas produzem menos embriões nos períodos mais frios do ano, principalmente nos meses de abril e maio.

Palavras-Chave: Bovinos; Fêmeas; Temperatura; Estresse; Embriões; Oócitos.

ABSTRACT

Pereira, Anamara. **Climatic variations throughout the years and results in FIVE donors of different genetic groups**. Advisor: Carlos Antonio Fernandes de Carvalho. Alfenas: UNIFENAS, 2012. Dissertation (MSc in animal science, Animal Reproduction concentration area).

The objective was to evaluate and compare the effects of genetic group of the donor and climatic variables on results of in vitro embryo production in cattle donors. 2313 results of follicular aspiration were used, which 961 in females of the subspecies *Bos taurus taurus* and 1352 from donors in the subspecies *Bos taurus indicus*. The management regime of the animals was the semi-confinement, and the mineral supplementation was ad libitum. The follicular punctures were performed by the same technician, with intervals of at least thirty days. We used ultrasound equipped with intravaginal microconvex sector transducer 5 to 7.5 MHz. All follicles larger than 3 mm were identified and punctured. The cumulus oocyte complexes (COCs) recovered were transferred to plates containing culture medium 60x15mm flush where DPBS were selected, counted and sorted based on their morphological appearance. After their arrival at the laboratory of Biotran Company, the oocytes were transferred to plates where they remain until complete maturation period of 24 hours. The semen used in vitro fertilization (IVF) was thawed at 35°C and evaluated for motility and vigor. IVF was performed after 18 hours in a controlled atmosphere incubator. After seven days of fertilization, the embryos were evaluated in each group. Donors of zebu had higher average recovery of viable and total oocytes and of embryo production in relation to taurus respectively (6.9 vs. 13.2, 11.6 vs. 20.4 and 1.6 vs. 4.0, $P < 0.05$). Whereas genetic groups together will reveal differences in embryo production and total conversion of viable oocytes embryos at different times of the year, only the best conversion trend of embryos in winter (24.37 ± 1.85) compared to summer (20.84 ± 1.57). The average total conversion of oocytes was higher in embryo zebu (23.5 vs. 30.6 - $P < 0.0001$). Conversions differed in all months ($P < 0.05$) between taurus and zebu cattle, except in the month of May. In taurus females, conversion rates

behaved similarly throughout the year, no differences were observed. We conclude that zebu cows produce more total and viable oocytes than the taurus cows, and that the production of embryos is higher in zebu cows, not only because of the increased production of oocytes, but also because of the best conversion rate. There was no seasonal variation in the production of viable and total oocytes and embryos in cows of European origin. Zebu cows produce fewer embryos during the colder periods of the year, especially in the months of April and May.

Key words: Cattle; Female; Heat stress; Embryos; Oocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Classificação morfológica dos Complexos Cumulus Oócitos	29
Figura 2- Média dos limites de temperatura máxima, mínima dos diferentes meses nos dois anos avaliados	33
Figura 3- Variações climáticas e médias de produção de oócitos totais nos dois grupamentos genéticos nos diferentes meses do ano	37
Figura 4- Variações climáticas e médias de produção de oócitos viáveis nos dois grupamentos genéticos nos diferentes meses do ano	37
Figura 5- Variáveis climáticas e médias de produção de embriões nos dois grupamentos genéticos nos diferentes meses do ano	39
Figura 6- Variáveis climáticas e taxa de conversão (Embriões/oócitos viáveis) de doadoras taurinas e zebuínas nos diferentes meses do ano	40
Figura 7- Variáveis climáticas e taxa de conversão (Embriões/oócitos viáveis) de doadoras taurinas e zebuínas ao longo do ano	41

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Classificação morfológica dos Complexos Cumulus Oócitos.	29
Tabela 2 – Recuperação média por OPU de oócitos totais e viáveis nos diferentes grupamentos genéticos de doadoras, independentemente da época, no período analisado	34
Tabela 3 – Produção média de embriões por PIVE e taxa média de conversão oócito viável-embrião nos diferentes grupamentos genéticos de doadoras, independentemente da época do ano	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. AMBIENTE E CLIMA	16
2.2. ESTRESSE TÉRMICO E CARACTERÍSTICAS DE ADAPTAÇÃO	17
2.3. EFEITO DO CLIMA SOBRE A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA	19
2.4. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> (PIVE) DE EMBRIÕES BOVINOS	21
2.5. DIFERENÇAS FISIOLÓGICAS	23
3. OBJETIVOS	26
3.1. GERAIS	26
3.2. ESPECÍFICOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO	27
4.2. ANIMAIS E MANEJO	27
4.3. ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU)	28
4.4. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE)	30
4.5. DADOS CLIMATOLÓGICOS	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. VARIÁVEIS CLIMÁTICAS NAS DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO	33
5.2. RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS NOS DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS	
34	
5.3. VARIAÇÃO CLIMÁTICA NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS	35
5.4. PRODUÇÃO MÉDIA DE EMBRIÕES E TAXA DE CONVERSÃO	38
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Acima de 50% do rebanho bovino mundial se encontra nos trópicos e são submetidos a temperaturas mais altas que animais que habitam climas temperados. Os zebuínos (*Bos taurus indicus*) são predominantes nos trópicos devido a sua maior resistência ao estresse resultante das altas temperaturas, da umidade relativa do ar em certos períodos do ano, quando comparada à resistência das raças de origem europeia (*Bos taurus taurus*) (HANSEN, 2004; BARROS *et al.*, 2001).

Nas regiões tropicais a temperatura média do ar situa-se acima dos 20°C, sendo que a temperatura máxima normalmente se encontra acima dos 30°C durante maior parte do ano, atingindo, muitas vezes, valores acima de 38°C (VIEIRA, 2012).

Existe, para cada espécie, uma faixa de temperatura ambiente dentro da qual o animal homeotermo praticamente não utiliza seu sistema termorregulador. Essa faixa é denominada Zona de Conforto Térmico (ZCT), segundo Titto (1998). Para bovinos leiteiros de origem europeia (*Bos taurus taurus*), a ZCT situa-se entre 5 e 25°C (YOULSEF, 1985; ROENFELDT, 1998) e, para as raças de origem zebuína, no caso *Bos taurus indicus*, de 24 a 27°C (DIRKSEN *et al.*, 1993). Contudo, essa ZCT depende de outros fatores como idade, espécie, raça, consumo alimentar, aclimatização, nível de produção, isolamento externo (pelame), entre outros.

Em resposta ao estresse térmico, os animais apresentam aumento da transpiração, da frequência respiratória, da frequência cardíaca; diminuição do metabolismo, redução na ingestão de matéria seca, aumento no consumo de água e da temperatura corporal. Além disso, o aumento da temperatura afeta negativamente o desempenho reprodutivo.

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a produção de embriões *in vitro* (PIV) são importantes para o melhoramento genético dos rebanhos. A produção e a transferência de embriões no Brasil vêm mantendo o crescimento na última década, consolidando o País como referência no emprego de biotécnicas reprodutivas, particularmente a PIVE (VIANA, 2010). Viana cita também que 66,6% dos embriões PIVE são produzidos no Brasil. Porém, a variação dos resultados da recuperação de oócitos e de conversão em embriões é um grande desafio para a

PIVE no contexto atual, o que leva à necessidade de pesquisa das causas relacionadas a essas variações, nas condições do Brasil.

A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é limitada durante as primeiras clivagens, quando grande parte do genoma embrionário é ainda inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é o aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre (PAULA LOPES E HANSEN, 2002).

Desta maneira, a PIVE se tornou, após 2004, a técnica de eleição para a produção de embriões em raças zebuínas, o que levou o mercado nacional de embriões para um novo patamar (com mais de 200.000 embriões produzidos/ano; VIANA *et al.*, 2010). Essa técnica permite que seja produzida até uma gestação por semana por doadora (BOUSQUET *et al.*, 1999). Em 2008, 66,6% do total de embriões PIVE produzidos no mundo foram no Brasil. Nesse mesmo ano, o Brasil teve 220.425 embriões produzidos *in vitro*, enquanto que, no mundo, a produção de embriões foi de 330.953 (VIANA *et al.*, 2010).

A fertilidade é uma das variáveis de maior impacto econômico em todo o processo de produção. Sendo assim, os efeitos do ambiente sobre essa variável são tão importantes, necessitando o animal sempre de um ambiente de conforto térmico, para maximizar sua eficiência (CARVALHO *et al.*, 1995b).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. AMBIENTE E CLIMA

Dos fatores do meio que afetam o bem-estar, o clima é, sem dúvida, o mais importante. A eficiência produtiva e reprodutiva de qualquer animal se relaciona com estímulos do ambiente onde vivem. A fertilidade é uma das variáveis de maior impacto econômico em todo o processo de produção, por isso os efeitos do ambiente sobre essa variável são tão importantes, necessitando o animal sempre de um ambiente de conforto térmico, para maximizar sua eficiência (CARVALHO *et al.*, 1995b).

O ambiente térmico do animal é composto por elementos como a temperatura, a velocidade e a umidade do ar e, ainda, a radiação solar. Muitas vezes, esses componentes ocorrem em valores extremos, dificultando a resposta produtiva ou mesmo a sobrevivência (CURTIS, 1983).

Bovinos são animais homeotérmicos, ou seja, mantêm a temperatura corpórea relativamente constante independentemente das variações ambientais. Para que isso ocorra, é necessário que haja equilíbrio entre a produção (termogênese) ou absorção e as perdas de calor (termólise). A manutenção da temperatura numa faixa ideal é conseguida por alterações fisiológicas, metabólicas e comportamentais, de modo a sustentar a homeostase orgânica e minimizar as consequências adversas da hipotermia ou hipertermia, dependendo da circunstância. Nesse processo de ajuste, entretanto, funções menos vitais ao organismo, como o desempenho produtivo e reprodutivo, além do bem-estar, podem ser atingidas quando a intensidade e a duração dos estressores ambientais excedem a capacidade compensatória dos animais, que é uma característica geneticamente determinada (BERTIPAGLIA *et al.*, 2007).

O controle da temperatura endógena do organismo é exercido pelo centro termorregulador hipotalâmico. O hipotálamo anterior é responsável pela termorregulação em altas temperaturas e o posterior confere a termorregulação nos ambientes frios. Em situações de estresse, ocorre a ativação dos sistemas termorreguladores, que são: o vasomotor, que controla o fluxo de sangue

tecidual (vasodilatação ou vasoconstrição periférica); o pilomotor, responsável pela ereção dos pelos; as glândulas sudoríparas, no que diz respeito à sudorese; a frequência respiratória, medida em movimentos/ minuto e as modificações na taxa metabólica (MARQUES, 2000).

Quando ocorre desequilíbrio entre a produção e a dissipação de calor corporal, o animal rapidamente lança mão de mecanismos fisiológicos para se manter na temperatura adequada ao funcionamento do seu corpo. Caso falhem todos os mecanismos, ele entra num quadro de estresse calórico, que resulta numa brusca mudança da circulação sanguínea para a periferia, promovendo aumento da frequência respiratória, do ritmo cardíaco e da temperatura corporal. Ocorre, então, diminuição da atividade física e de ingestão de alimentos, aumenta o consumo de água e sudorese (WEST, 2002).

Com o passar do tempo, também se altera o perfil hormonal e os constituintes sanguíneos, o que provoca mudanças em todos os sistemas. Esses fatores estimulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, causando elevação sérica de cortisol, hormônio que, além de mediar vários processos de resposta a estresse, altera outros sistemas como o reprodutivo, pois interfere diretamente na produção e/ou na liberação de outros hormônios (INGRAHAM *et al.*,1979). Em algumas situações, principalmente em animais criados extensivamente, esses efeitos podem ser confundidos com a variação da disponibilidade quantitativa e qualitativa do alimento, caracterizando o estresse nutricional, que determina efeitos não somente sobre a reprodução, como também sobre o crescimento e a produção dos animais (COSTA e SILVA *et al.*,2005).

2.2. ESTRESSE TÉRMICO E CARACTERÍSTICAS DE ADAPTAÇÃO

O termo estresse pode ser definido como um sintoma resultante da exposição do animal a um ambiente hostil, com conseqüentes prejuízos para a homeostase. Esse animal, por sua vez, responde com uma série de reações não específicas de adaptação, ativando mecanismos físicos e fisiológicos, na

tentativa de restabelecer o equilíbrio orgânico (homeostase). Esses fatores estão constantemente interagindo com o animal e podem atuar negativamente sobre o seu bem-estar caso o ambiente não seja capaz de disponibilizar, de forma quantitativa e qualitativa, os recursos necessários para que esse indivíduo se ajuste às condições impostas (COSTA e SILVA *et al.*, 2005).

Os animais *Bos taurus indicus* (Zebuínos) são reconhecidamente mais tolerantes ao clima tropical, especialmente quanto ao calor (TURNER, 1980), apresentando também maior resistência à endo e a ectoparasitos. Entretanto, as características de produtividade dos animais zebuínos, como ganho de peso pré e pós desmama, fertilidade e habilidade materna, são consideradas inferiores em relação aos animais *Bos taurus taurus* (Taurinos), sobretudo os de origem britânica, considerando estes últimos em ambiente original e em situação de conforto (O' CONNOR, 1997).

A adaptabilidade dos animais de origem zebuína ao clima tropical está relacionada à menor produção de calor metabólico, associada à melhor capacidade de termólise. Essas características facilitam a termorregulação contribuindo para que sofram menos estresse térmico (HANSEN, 2004). Propriedades da pele e dos pelos dos animais zebuínos explicam muito de sua tolerância ao calor. Essas propriedades incluem número, distribuição e diâmetro das glândulas sudoríparas, espessura da capa de pelos, diâmetro, comprimento, pigmentação e inclinação dos pelos, espessura e pigmentação da pele. Animais zebuínos tem glândulas sudoríparas de maior volume e em maior densidade por área de superfície da pele, o que favorece o processo de perda evaporativa (ALLEN *et al.*, 1963). Com relação aos fatores genéticos que determinam o tipo de pelame em bovinos, Olson *et al.* (2003) concluíram que há evidências de que um gene de herança dominante controle a manifestação de um pelo liso e curto, observado nas raças Senepol e Crioula, chamado *slick hair gene*, o que contribui para a tolerância ao calor apresentada por estas raças.

Silva *et al.* (2001), estudando a transmissão da radiação ultravioleta (UV) através do pelame e da epiderme de bovinos das raças Holandesa e Nelore, concluíram que, em um ambiente caracterizado por altos níveis de radiação UV, a combinação mais adequada é um pelame de cor branca, sobre uma epiderme de cor negra, e que, na impossibilidade desta combinação, um

pelame de cor negra é a alternativa mais desejável com relação à penetração pela radiação UV. Entretanto, um pelame negro constitui superfície de grande absorvidade da radiação térmica, de modo que a temperatura da superfície cutânea nesses animais é mais elevada que naqueles com pelame branco.

2.3. EFEITO DO CLIMA SOBRE A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

Os efeitos do estresse prolongado sobre a reprodução são mediados por alguns hormônios liberados durante as respostas adaptativas, dentre os quais se destacam o hormônio liberador de corticotropina (CRH), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), os opioides endógenos e o cortisol, que desempenham importante função na modulação dos efeitos do estresse sobre a função reprodutiva. Esses hormônios atuam interferindo na secreção de mediadores importantes para a produção de esteroides sexuais e para o desencadeamento da dinâmica folicular normal (RIVIER e RIVEST, 1991).

Além de afetar negativamente o desempenho reprodutivo, condições climáticas adversas, principalmente temperatura ambiental acima da ZCT, reduz o comportamento sexual da fêmea pela exposição a uma carga térmica muito alta. Nas fêmeas de origem europeia, o estro tem duração média de 14-18 horas durante as estações frias, mas em períodos mais quentes pode ser reduzido para 8-10 horas. Fêmeas europeias, e zebuínas em menor proporção, tendem a diminuir a manifestação do cio nas horas mais quentes do dia (ANDERSON, 1944; ADEYEMO *et al.*, 1979).

Na fase folicular de um ciclo estral normal, o padrão correto do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) secretado a partir do hipotálamo leva a aumento da liberação pulsátil do hormônio luteinizante (LH) a partir da glândula pituitária (MOENTER *et al.*, 1990). Em conjunto com o LH, o hormônio folículo estimulante (FSH), também liberado pela hipófise em resposta ao GnRH, determina a taxa de crescimento folicular e a produção de 17 β -estradiol (E₂). Quando o folículo completa seu desenvolvimento e a produção de E₂ atinge o máximo, este sensibiliza o Centro de Controle da Onda Pré-ovulatória, levando a uma grande liberação de GnRH pelo hipotálamo e a um conseqüente

pico de LH pré-ovulatório, o que desencadeia a ovulação (MCNEILLY *et al.*, 1991). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por estresse reduz a pulsatilidade de GnRH e conseqüentemente do LH, privando o folículo ovariano das concentrações adequadas desta gonadotrofina. Isso levaria redução da produção de E₂ e outras alterações metabólicas no folículo em desenvolvimento, comprometendo não somente a dinâmica folicular como a qualidade dos oócitos (DOBSON *et al.*, 1999^a).

Borges *et al.* (1998) observaram que as fêmeas *Bos taurus taurus* (raça Holandesa) apresentaram declínio significativo da qualidade do oócito recuperado e da sua capacidade de desenvolvimento quando em altas temperaturas e umidades, o que não foi observado em outro estudo em fêmeas *Bos taurus indicus* (ROCHA *et al.*, 1998). Trabalhos têm demonstrado que embriões de raças zebuínas produzidos *in vitro*, em estágio de 8 células até o dia 5 depois da fertilização, e submetidos a 41 °C por 6 horas apresentaram menor sensibilidade ao calor, caracterizado pelo efeito sobre o desenvolvimento até a fase de blastocisto e o número de células/embrião, quando comparado a outros de raças europeias (PAULA-LOPES *et al.*, 2003). No entanto, Kriningerm *et al.* (2003) observaram que o efeito genético sobre a termotolerância celular, que faz com que embriões de zebuínos sejam mais resistentes ao estresse por calor, não se expressou no estágio até 2-4 células.

As vacas submetidas à estresse calórico apresentam elevação da temperatura corporal, que passa a ser alta o bastante para danificar diretamente o oócito ou matar o embrião. Com isso, tendem a produzir oócitos de menor capacidade de fertilização e, caso ocorra a fertilização, os embriões passam a ter desenvolvimento anormal. Além disso, os níveis séricos de progesterona (P₄), hormônio responsável pela manutenção da prenhez, podem estar reduzidos (ROSENBERG *et al.*, 1977). A produção de embriões por superovulação é frequentemente reduzida em períodos de estresse por calor. A respectiva redução do número de embriões transferíveis ocorre devido à resposta superovulatória reduzida, à menor taxa de fertilização, e à redução da qualidade do embrião. Há também relatos de que o sucesso dos procedimentos de fertilização *in vitro* é reduzido durante os períodos quentes do ano. O estresse por calor pode comprometer eventos reprodutivos necessários para a produção de embriões, diminuindo a expressão do

comportamento de estro, alterando o desenvolvimento folicular, comprometendo a competência de oócitos e de desenvolvimento embrionário de inibição (MIYAUCHI, 2011).

No período quente, ocorre uma redução no apetite e no consumo de matéria seca (De RENSIS e SCARAMUZZI, 2003), o que prolonga o período pós-parto de balanço energético negativo, resultando em uma expressão insatisfatória dos sinais de estro e causando infertilidade (HANSEN, 2005), aumentando assim o intervalo parto-concepção, particularmente de vacas de alta produção de leite.

A baixa fertilidade em gado de leite, especificamente em vacas de alta produção, está associada intimamente com estresse térmico durante estações quentes (GUZELOGLU *et al.*, 2001). Isso pode ser explicado pelo fato de que a produção de calor metabólico de vacas em lactação leva à hipertermia em condição de clima quente. Já em novilhas, como a produção de calor interna é baixa, estas podem ou não vir a se tornar hipertérmicas.

2.4. PRODUÇÃO *IN VITRO* (PIVE) DE EMBRIÕES BOVINOS

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica que vem sendo bastante utilizada com grande aceitação no que diz respeito à reprodução animal (MIYAUCHI, 2011).

A técnica é utilizada para estudar a fisiologia dos processos de maturação oocitária, de fecundação e de desenvolvimento embrionário no estágio de pré-implantação, bem como proporcionar o desenvolvimento de outras técnicas como a clonagem e a transferência de genes. Além disso, tem sido comercialmente empregada para produzir indivíduos geneticamente melhorados, sendo uma alternativa em programas de transferência de embriões na espécie bovina (STROUD e MYERS, 1993; LOONEY *et al.*, 1994; HASLER, 1996; HANZEN e GOFFIN, 1998).

Em 1982, foi relatado por Brackett *et al.* o nascimento do primeiro bezerro obtido através da produção *in vitro* (PIVE) de embriões. Desde então, essa biotecnologia tem perspectivas promissoras, sendo responsável pelo

nascimento de expressivo número de produtos (GALLI e LAZZARI, 1996). Sendo assim, a utilização da técnica de PIVE é uma alternativa de grande utilidade para prolongar o aproveitamento reprodutivo de animais (SOUSA, 2007). Essas técnicas são ferramentas valiosas para garantir melhorias significativas na produtividade (FABER *et al.*, 2003).

No Brasil, as tecnologias de embriões foram utilizadas inicialmente nas raças taurinas e leiteiras. Hoje, as raças zebuínas têm a maior participação no mercado nacional de embriões, alcançando 92,4% do total. Também existe maior produção de embriões *in vitro* em relação aos produzidos *in vivo*, 85,5% vs 14,2% (VIANA *et al.*, 2010).

Apesar da expressiva contribuição no emprego dessa biotécnica, esta ainda apresenta baixa eficiência nas etapas envolvidas (MIYAUCHI, 2011). Diversos estudos em animais não superestimulados relataram recuperação de 70% de *complexos cumulus oóцитos (CCOs)* por aspiração folicular (SENEDA *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2004), e destes, somente 10% a 40% são convertidos em embriões (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006; LONERGAN e FAIR, 2008; RIZOS *et al.*, 2008), obtendo-se taxas de gestação não superiores a 50% (PETERSON e LEE, 2003; PONTES, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2010). Embora haja grande empenho na busca de novos protocolos, condições e meios de cultivos que aprimorem a técnica, as perspectivas são limitadas, principalmente pela qualidade inicial dos *CCOs* obtidos (BLONDIN *et al.*, 2002; MERTON *et al.*, 2003). O número de folículos nos ovários aptos à aspiração, conciliado com a qualidade e com a competência dos oócitos recuperados são fatores que interferem na eficiência e na viabilidade da técnica (VIANA *et al.*, 2010).

Além dos fatores mencionados acima, o estresse térmico parece estar associado à queda das taxas de fecundação e ao aumento das perdas embrionárias (AL-KATANANI *et al.*, 2002).

2.5. DIFERENÇAS FISIOLÓGICAS

A aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (OPU) consiste na remoção mecânica de oócitos contidos em folículos presentes nos ovários de doadoras. A remoção é realizada introduzindo-se um dispositivo de punção com uma guia transvaginal e com bomba de vácuo. Com o auxílio de aparelho de ultrassonografia, é possível visualizar os folículos, a agulha e o conteúdo aspirado. Após, os oócitos são selecionados, classificados e transportados ao laboratório de PIVE (GARCIA *et al.*, 2004).

O sucesso das técnicas de OPU e de PIVE depende da população folicular em fase antral (BONI *et al.*, 1997) e da disponibilidade de uma população uniforme e competente de oócitos imaturos para serem utilizados na maturação *in vitro* (DODE, 2006) e das variáveis que afetam direta ou indiretamente a eficiência de maturação, da fertilização e do cultivo de embriões (ARLOTTO *et al.*, 1996; HENDRIKSEN *et al.*, 2000). Essas técnicas são importantes fontes de produção de embriões de doadoras vivas (GALLI *et al.*, 1996).

Existem também diferenças em relação ao padrão de desenvolvimento da onda folicular entre taurinos e zebuínos, em recrutamento folicular, em produção de oócitos e em consequente produção embrionária *in vitro* e *in vivo* (FIGUEIREDO *et al.*, 1997; VIANA *et al.*, 2000; VIANA *et al.*, 2010; BARUSELLI, GIMENES e SALES, 2007).

Estudos revelam que o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) estão presentes em CCOs (NUTTINCK *et al.*, 2004) e em embriões no estágio de pré-implantação (LONERGAN *et al.*, 2000), sugerindo a importância desse fator de crescimento na função oocitária e embrionária, sendo responsável pelo aumento no número de folículos por onda em *Bos taurus indicus* e que essa subespécie possui menores concentrações de FSH em relação à *Bos taurus taurus* (ALVAREZ *et al.*, 2000; BARROS e NOGUEIRA, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2009).

Barros e Nogueira (2001) sugeriram que o IGF-I na forma livre pode melhorar a resposta ovariana ao FSH em vacas zebuínas pelo fato de esta raça exigir dose inferior de FSH exógeno para indução de superovulação, quando comparada às raças europeias. Vacas Brahman apresentam maiores

concentrações de IGF-I no plasma quando comparadas a vacas Angus (ALVAREZ *et al.*, 2000). Postula-se que o aumento no número de folículos, apesar das menores concentrações de FSH em gado zebuíno, pode ocorrer devido a maiores concentrações de IGF-I (MONTEIRO *et al.*, 2009).

O maior número de oócitos advém de uma maior população de folículos pré-antrais, em comparação com *Bos taurus taurus* (RUBIN, 2006). Outra teoria seria a de que o período da multiplicação de células germinativas ocorre de maneira diferenciada para fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, ou seja, o término da multiplicação celular seja mais tardio em fêmeas Nelore (RUBIN, 2006). A espécie *Bos taurus indicus* apresenta maior número de folículos recrutados por onda folicular em relação à *Bos taurus taurus*, uma característica que tem influência direta na técnica de OPU (33,4±3,2 vs 25,4±2,5; RUBIN, 2006) e de oócitos (GIMENES, 2010), indicando vantagem das fêmeas zebuínas em relação às taurinas.

Diferenças no recrutamento folicular e na recuperação de oócitos são relatadas entre indivíduos e grupamentos genéticos (BONI *et al.*, 1997). Uma das explicações para essas diferenças no PIVE nos determinados grupamentos genéticos (zebuínos e taurinos) seria a quantidade de folículos presentes na reserva ovariana, porém esta pode ser influenciada nos animais de produção por variáveis como manejo, nutrição, categoria, idade dos animais, condições ambientais, condição corporal (VIANA e BOLS, 2005) e dieta, pois, segundo Armstrong *et al.* (2001), vários nutrientes acrescidos na dieta interferem na função ovariana, principalmente, sobre a fase de crescimento folicular e sobre a qualidade oocitária.

Dayan *et al.* (1999) e Santos *et al.* (2005) relataram altas taxas de recuperação de oócitos viáveis em fêmeas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), enquanto Dominguez (1995) observou que fêmeas da raça Holandesa possuem melhor recuperação de oócitos e maior número de folículos grandes (> 10 mm) quando comparadas com fêmeas zebuínas.

Roth e Hansen (2005), avaliando o estresse calórico *in vitro*, observaram uma diminuição na qualidade e no desenvolvimento de oócitos bovinos até embrião e Munhoz e Luna (2008) reportaram alterações na morfometria de folículos pré-antrais bovinos quando submetidos *in vitro* a temperaturas de 42°C por 20 minutos.

Além da qualidade do oócito, Sartori *et al.* (2002) avaliaram a qualidade de embriões de 5 dias, 2 a 3 meses depois do parto e observaram que os embriões de vacas em lactação eram de qualidade inferior, ou até inviáveis, se comparados a embriões de vacas secas e novilhas. De acordo com Camargo *et al.* (2007), oócitos de doadoras Gir no verão foram mais competentes para o desenvolvimento embrionário *in vitro* e pareciam estar sob menor estresse que oócitos oriundos de doadoras holandesas.

No estudo de Nunes *et al.* (2010), a produção de oócitos viáveis em *Bos taurus taurus* foi similar na época das secas (≈ 9) e das águas (≈ 8). No entanto, o número de oócitos em *Bos taurus indicus* foi maior e de melhor qualidade em qualquer época do ano (verão/inverno) respectivamente, (15 e 13).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAIS

- Comparar a distribuição dos resultados da PIVE ao longo dos meses do ano em doadoras de diferentes grupos genéticos bovinos.

3.2. ESPECÍFICOS

- Comparar a produção de oócitos entre fêmeas bovinas de dois grupamentos genéticos;
- Comparar a eficiência da PIVE em diferentes grupamentos genéticos sobre a produção in vitro de embriões;
- Verificar se existem efeitos do clima sobre a técnica de PIVE e sobre a interação com grupamentos genéticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

Os dados se referem a aspirações foliculares realizadas em várias propriedades rurais localizadas na região Sul do Estado de Minas Gerais e na região Noroeste de São Paulo durante um período de 25 meses, compreendidos entre abril de 2010 e abril de 2012. A região possui clima mesotérmico de classificação CWA, segundo classificação Köppen (KÖPPEN e GEIGER, 1928).

4.2. ANIMAIS E MANEJO

Foram utilizados resultados de 2309 aspirações foliculares em fêmeas das subespécies *Bos taurus taurus* (Holandesa, Jersey, Red Angus e Simental) e *Bos taurus indicus* (Gir, Nelore, Brahman, Guzerá) sendo estas manejadas em regime de semiconfinamento, de acordo com a propriedade e a suplementação mineral *ad libitum*.

As doadoras passaram por exame ginecológico prévio, utilizando-se de palpação transretal e ultrassonografia, com aparelho portátil de ultrassom, Mindray modelo DP2200 com transdutor linear de 7,5MHz, visando detectar alguma anormalidade que poderia desqualificá-las para o uso da técnica de OPU.

4.3. ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU)

Todos os procedimentos foram executados por um mesmo técnico. Os animais foram contidos em brete, onde foram retiradas as fezes do reto e realizada limpeza e a desinfecção do períneo com água e álcool 70°. A antisepsia do local para realizar a anestesia epidural foi feita com álcool 70°. A anestesia epidural foi realizada pela administração de Lidocaína 1%, com agulha 30x8mm. O objetivo da anestesia epidural foi evitar desconforto do animal e movimentos peristálticos.

Para um mesmo animal, as punções foliculares foram realizadas com intervalos mínimos de 30 dias, utilizando-se aparelho de ultrassonografia, equipado com transdutor setorial microconvexo intravaginal de 5-7,5 MHz e acoplado a guia para punção folicular e bomba de vácuo da marca Watanabe Tecnologia Aplicada (WTA). O ovário foi posicionado através da manipulação retal na extremidade do transdutor. Os folículos, a introdução da agulha e a aspiração do conteúdo folicular foram visualizados na tela do aparelho.

Folículos com diâmetro superior a 3 mm foram identificados e puncionados, utilizando-se agulhas 20 G descartáveis e pressão de vácuo de 80 mm Hg. O líquido folicular aspirado foi inicialmente recuperado em tubos de 50 ml, contendo de 10 a 15 ml de DPBS Flush (veículo q.s.p.100ml) com Gentamicina (0,005g), acrescido de 1% de Heparina, sendo os CCOs posteriormente separados em filtros de coleta de embriões com malha de 70µm. Os CCOs recuperados foram transferidos para placas de cultivo 60X15mm contendo meio DPBS Flush onde foram selecionados, contados e classificados com base em seu aspecto morfológico, com auxílio de estereomicroscópio em aumento de 40 vezes, conforme descrito por Viana *et al.* (2004) na Tabela 1.

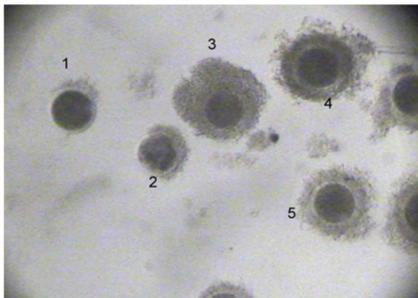
Tabela 1: Classificação morfológica dos *Complexos Cumulus Oócitos*.

Classificação dos CCOs	Células do <i>Cumulus</i>	Citoplasma
GI (Grau I)*	> 3 camadas Compactas	Homogêneo
GII (Grau II)*	> 3 camadas Compactas	Heterogêneo (levemente)
GIII (Grau III)* parcialmente desnudo	ou < 3 camadas remoção de menos de 1/3	
Desnudo ou degenerado	Sem células na > parte da zona pelúcida	Retração e vacuolização
<i>Cumulus</i> expandido ou Atrésicos	Expansão	

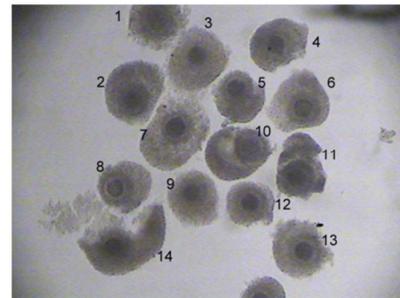
* GI, GII e GIII se referem à qualidade dos oócitos. São considerados oócitos viáveis.

Fonte: Viana *et al.* (2004).

Figura 1: Classificação morfológica dos *Complexos Cumulus Oócitos*.



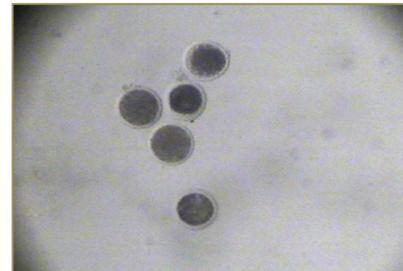
1: Desnudo; 3: GI; 4-5:GII; 2:GIII



2-6-9-13:GI 1-7-10-11-8:GII



Atrésico/ Expandido



Desnudo/ Degenerado

Após a classificação, os oócitos foram transferidos para criotubos de 1,2ml, contendo meio TCM- 199 bicarbonato acrescidos de 5% de gás carbônico (CO₂), transportados em incubadora portátil (Bioceler, modelo INC2040 – R1) até o laboratório de PIVE, em um período máximo de 12 horas.

4.4. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

Todos os processos de maturação dos oócitos e PIVE foram realizados no Laboratório da Empresa Biotran. Os oócitos iniciaram seu desenvolvimento *in vitro* em situações que simulam artificialmente os processos biológicos do aparelho reprodutor da fêmea doadora bovina (maturação, fertilização e cultivo).

Após a chegada ao laboratório, os oócitos GI, GII e GIII foram transferidos para placas de maturação onde permaneceram até completar o período de 24 horas após o início da aspiração a uma temperatura de 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade saturada.

O sêmen utilizado na fecundação *in vitro* (FIV) foi descongelado a uma temperatura de 35°C por 30 segundos e avaliado quanto a sua motilidade e vigor. Os espermatozoides vivos e mortos foram separados por gradiente de densidade antes de serem utilizados para a FIV. A FIV foi realizada por 18 horas em estufa incubadora em atmosfera controlada. Após a FIV, os possíveis zigotos foram transferidos para o cultivo *in vitro*, onde permaneceram por sete dias em temperatura de 38,5°C e atmosfera controlada.

Decorridos os sete dias da fecundação, foram realizadas as avaliações dos embriões de cada grupo, sendo classificados em mórula (MO), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) ou blastocisto eclodido (BE), utilizando-se a classificação dos embriões recomendada pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

Apenas os embriões de Grau I (IETS) de todas as categorias (MO, BI, BL, BX e BE) foram considerados para este estudo.

4.5. DADOS CLIMATOLÓGICOS

Os dados de temperatura ambiente e umidade foram obtidos na estação meteorológica de Machado (32526), Tipo AGROMET, situada na Rodovia Machado- Paraguaçu, Km 3 - Bairro Santo Antônio- Machado- MG – CEP: 37.750-000, distante 25,2 km do Laboratório de Produção dos Embriões e distante no máximo 30 km das propriedades.

Foram coletados os dados de temperatura máxima, média e mínima do ar, médias das máximas e mínimas e umidade relativa do ar, no período de abril de 2010 a abril de 2012.

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de aspirações de folículos ovarianos (ócitos totais e viáveis, e embriões produzidos) de vacas de raças zebuínas e taurinas foram previamente avaliados quanto à distribuição de normalidade (teste de Shapiro Wilk, PROC UNIVARIATE, versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Todas as variáveis deixaram de atender aos critérios da normalidade e foram submetidas a análises não paramétricas pelo teste de Kruskal-Wallis (versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). O modelo experimental incluiu os efeitos de grupo genético (zebuíno e taurino) e mês do ano em que os procedimentos de OPU e PIVE foram realizados. Diferenças significativas para as variáveis analisadas foram posteriormente detectadas entre grupo genético com auxílio do procedimento de qui-quadrado. Diferenças significativas entre os meses dentro de cada grupo genético foram acessadas pelo teste de Dunn para variáveis não paramétricas. Adicionalmente, as taxas (%) de conversão - oócitos (total e viável) para embriões - foram comparadas entre e/ou dentro dos grupos genéticos e o teste de Dunn também foi utilizado para encontrar diferenças significativas. Para todas as análises, as probabilidades menores

que 5% foram consideradas estatisticamente significantes, ao passo que probabilidades menores que 10% foram consideradas aproximações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. VARIÁVEIS CLIMÁTICAS NAS DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO

Os dados de temperatura do ar mostram que os maiores valores ocorreram nos meses de fevereiro, março, maio, outubro, novembro e dezembro. Já no período de junho a setembro, foram observados os menores valores de temperatura (Figura 2).

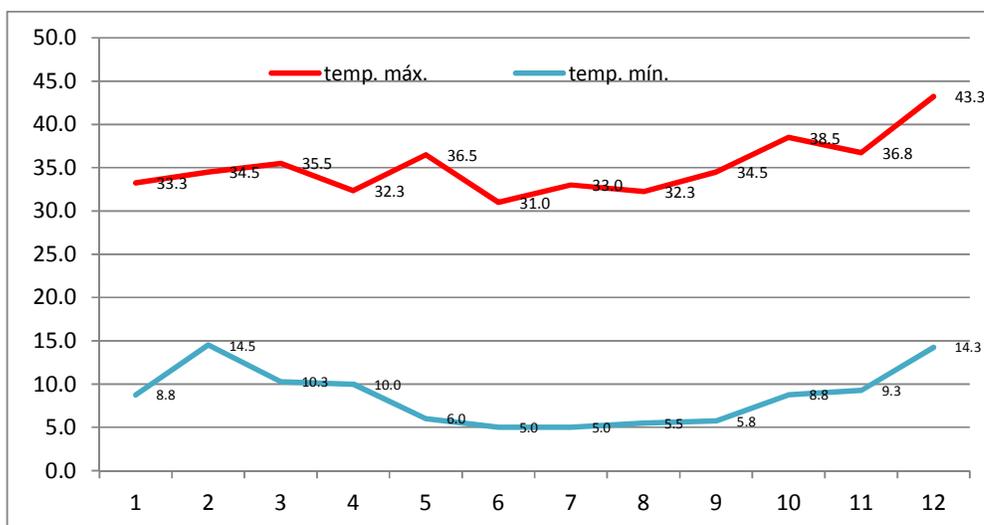


Figura 2: Média dos limites de temperatura máxima, mínima dos diferentes meses nos dois anos avaliados

Segundo Youlsef (1985) e Roenfeldt (1998), em todos os meses, os limites máximos superaram os limites da ZCT para animais de origem europeia (*Bos taurus taurus*), que nesta espécie encontram-se em torno de 5 e 25°C. Já para animais de origem zebuína (*Bos taurus indicus*), os valores de temperatura do ar supera os limites mínimos para esta espécie situados entre 24 e 27°C de acordo com Dirksen *et al.* (1993). Neiva (1998) relata que um ambiente ideal está em torno de 18°C e, caso esteja fora deste limite, o animal terá suas funções produtivas prejudicadas em favor de sua sobrevivência.

5.2. RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS NOS DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS

A produção de oócitos totais e viáveis foi maior no grupamento genético zebu ($P < 0,05$ – Tabela 2). Esses resultados corroboram outros existentes na literatura e se justificam por variações fisiológicas existentes entre as subespécies.

Carvalho *et al.* (2008) observaram que animais de origem indiana apresentam maior recrutamento de folículos por onda de desenvolvimento folicular, acarretando uma maior produção embrionária, possuindo vantagens em relação aos taurinos (BARUSELLI *et al.*, 2007). Gimenes (2010) observou que novilhas *Bos taurus indicus* têm qualidade oocitária superior às *Bos taurus taurus* e bubalinas. Corroborando, Sartori *et al.* (2002) afirmaram que a percentagem de embriões é positivamente correlacionada com o número e com a qualidade dos oócitos recuperados.

Tabela 2: Recuperação média por OPU de oócitos totais e viáveis nos diferentes grupamentos genéticos de doadoras, independentemente da época, no período analisado

Grupo Genético	Número de aspirações	Média de Oócitos Totais	Média de Oócitos Viáveis
Europeias	960	11,6 ^a ± 9,8	6,9 ^a ± 6,4
Zebuínas	1349	20,4 ^b ± 16,5	13,2 ^b ± 12,5

Letras diferentes na coluna diferem a 5% de probabilidade

Diferenças no recrutamento folicular e na recuperação de oócitos são relatadas entre indivíduos e grupamentos genéticos (BONI *et al.*, 1997). Uma das explicações para essas diferenças na PIVE nos determinados grupamentos genéticos seria a quantidade de folículos presentes na reserva ovariana, porém podem ser influenciadas nos animais de produção por variáveis como manejo, nutrição, categoria, idade dos animais, condições ambientais, condição corporal (VIANA e BOLS, 2005) e dieta, pois, segundo

Armstrong *et al.* (2001), vários nutrientes acrescentados na dieta interferem na função ovariana, principalmente sobre a fase de crescimento folicular e sobre a qualidade oocitária.

Não está totalmente elucidado porque bovinos *Bos taurus indicus* possuem mais folículos no início da onda folicular. Há evidências de que os fatores responsáveis são a insulina e as concentrações de IGF- I que, por sua vez, diferem de *Bos taurus taurus* (MONTEIRO *et al.*, 2009). Barros e Nogueira (2001) têm sugerido que o IGF-I pode melhorar a resposta ovariana em vacas zebuínas uma vez que esses animais exigem uma dose inferior de FSH para indução ovariana quando comparada à europeia.

Vacas Brahman possuem maiores concentrações de IGF-I no plasma; em contrapartida, vacas Angus tem menores concentrações (ALVAREZ *et al.*, 2000). Postula-se que o aumento no número de folículos, apesar das menores concentrações de FSH em gado zebuino, pode ocorrer devido a maiores concentrações de IGF-I (MONTEIRO *et al.*, 2009).

Outra hipótese seria a de que o maior número de oócitos advém de uma maior população de folículos pré-antrais, em comparação com *Bos taurus taurus* (RUBIN, 2006). Uma última teoria seria a de que o período da multiplicação de células germinativas ocorre de maneira diferenciada para fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, ou seja, o término da multiplicação celular seja mais tardio em fêmeas Nelore (RUBIN, 2006).

5.3. VARIAÇÃO CLIMÁTICA NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS

A qualidade do oócito está intimamente relacionada com o ambiente em que este se encontra. No interior do folículo, encontram-se fatores de crescimento e de gonadotrofinas que são essenciais aos estágios de crescimento e ovulação (WEBB *et al.*, 2004). Chega-se, assim, à maturação oocitária por meio da interação do oócito com as células da granulosa e da teca (MIYANO, 2003; CECCONI *et al.*, 2004), a qual fornece, ainda, condições para que o oócito possa ser ativado, dando continuidade ao seu crescimento e

conferindo-lhe qualidades que são indispensáveis para o sucesso do desenvolvimento embrionário (SCHULTZ, 2002).

Quando avaliados separadamente, pode-se observar que, nos diferentes grupamentos genéticos, com relação aos oócitos viáveis (Figura 3) e totais (Figura 4), não foram encontradas diferenças entre as épocas do ano nos animais de genética europeia.

No estudo de Nunes *et al.* (2010), a produção de oócitos viáveis em *Bos taurus taurus* foi similar na época das secas ($9,2 \pm 0,9$) e das águas ($7,6 \pm 0,6$). No entanto, o número de oócitos em *Bos taurus indicus* foi maior e de melhor qualidade em qualquer época do ano (verão/inverno) respectivamente, ($14,9 \pm 1,1$ e $12,9 \pm 0,2$). Segundo Lucy (2000) e Armstrong *et al.* (2001), existe maior concentração de IGF-I em animais com balanço energético positivo e, como os animais zebuínos possuem mais receptores para IGF-I, estes recuperam maior número de oócitos totais e viáveis.

Como no estudo em questão, a maioria das doadoras taurinas não estavam em lactação e, como nesta situação fisiológica, são menos sensíveis, é provável que as variações climáticas as tenham afetado em menor intensidade. Os animais zebuínos produziram mais oócitos viáveis e totais no período do verão. Isso pode ser explicado, pois o regime de manejo desses animais foi o semiconfinamento e a melhor qualidade das pastagens na época do verão pode ter levado à diferença observada nos zebuínos. É provável, ainda, que, por serem mais adaptados, esses animais não tenham sofrido estresse térmico. O mesmo pode ter ocorrido com os taurinos, porém pode não ter se traduzido em melhor produção média de oócitos viáveis e totais nessa categoria genética no verão, pois esse grupamento sofre com o estresse térmico, por serem menos adaptados, e o efeito deletério da temperatura nessas doadoras no período mais quente é mais severo.

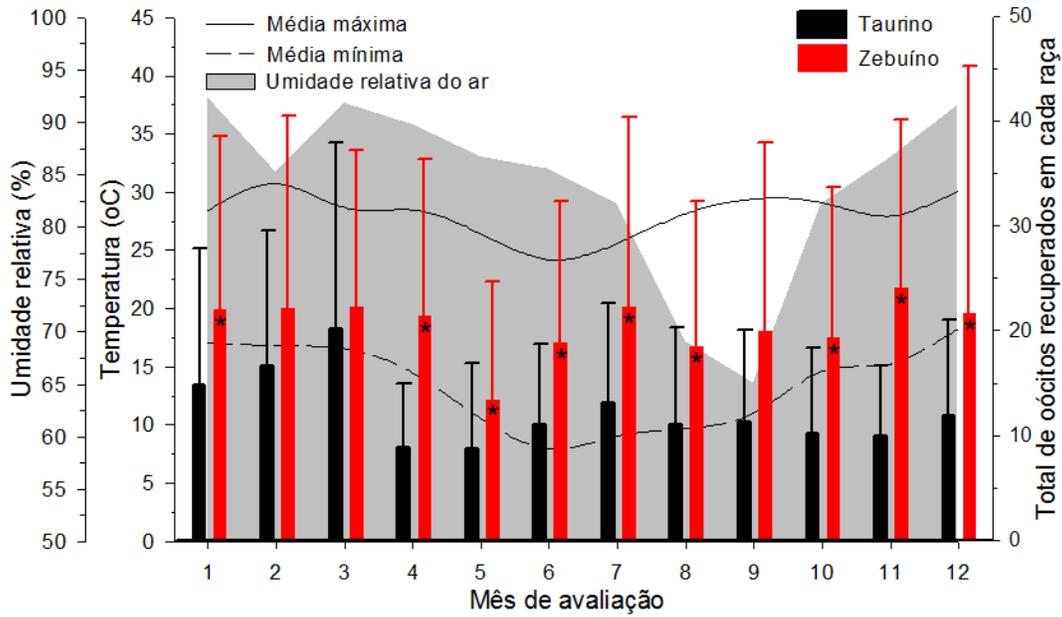


Figura 3: Variações climáticas e médias de produção de oócitos totais nos dois grupamentos genéticos nos diferentes meses do ano

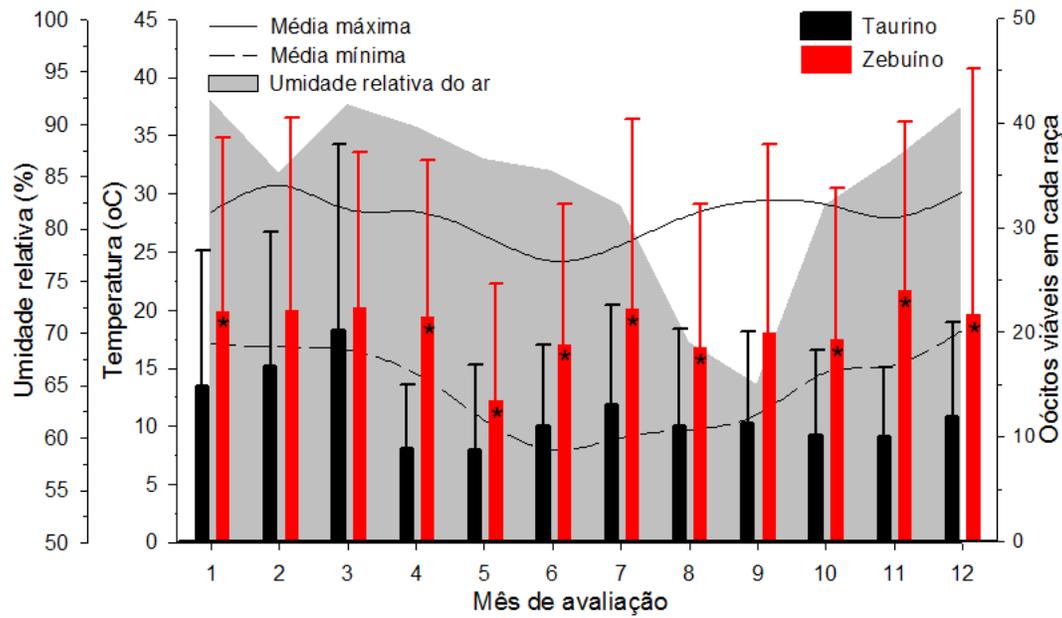


Figura 4: Variações climáticas e médias de produção de oócitos viáveis nos dois grupamentos genéticos nos diferentes meses do ano

5.4. PRODUÇÃO MÉDIA DE EMBRIÕES E TAXA DE CONVERSÃO

A produção média de embriões por doadora foi maior em doadoras do grupamento genético zebuíno ($P < 0,05$ – tabela 3). Essa maior produção é decorrente principalmente do maior número de oócitos viáveis produzidos pelas doadoras desse grupamento genético.

Tabela 3: Produção média de embriões por PIVE e taxa média de conversão oócito viável-embrião nos diferentes grupamentos genéticos de doadoras, independentemente da época do ano.

Grupo Genético	Número de Aspirações	Média de Oócitos Viáveis	Média de Embriões	Conversão Média
Europeias	960	6,9 ^a ± 6,4	1,6 ^a ±0,9	23,5 ^a ±13,6
Zebuínas	1349	13,3 ^b ± 12,5	4,0 ^b ±3,2	30,6 ^b ±15,7

Letras diferentes na coluna diferem a 5% de probabilidade pelo teste de desvio

Quando se avalia a produção embrionária em épocas do ano distintas, nos dois grupamentos genéticos em conjunto, não foram observadas diferenças na produção de embriões totais e na conversão de oócitos viáveis a embriões. Porém apenas tendência à melhor conversão de embriões no inverno (24,4±1,8) em relação ao verão (20,4±1,6).

Quando se avalia a produção média embrionária nos grupamentos genéticos e em épocas distintas, nota-se possível efeito deletério do verão nos oócitos das doadoras europeias. A maior produção no inverno mostra que, embora não tenha havido diferença no total ou qualidade dos oócitos, a capacidade intrínseca do desenvolvimento de embriões foi afetada pelos fatores climáticos tanto nas doadoras taurinas como nas zebuínas. A subespécie *Bos taurus indicus*, em ambientes tropicais, possui melhor desenvolvimento embrionário, como também demonstrado por Camargo *et al.* (2007).

Os dados obtidos neste estudo foram semelhantes a alguns outros da literatura. A produção embrionária, de acordo com Viana *et al.* (2004), em doadoras. Rubin *et al.* (2006), em doadoras Nelore, alcançaram média de 5,1 embriões/ sessão. A maior produção de embriões em Zebu está relacionada a dois fatores: maior recuperação de oócitos nessa subespécie e melhor taxa de conversão de oócitos em blastocistos (D7). Dados que também foram observados por Viana *et al.* (2010), quando compararam zebuínos em relação aos taurinos: 32.1% vs 25.6%, respectivamente ($P < 0,001$).

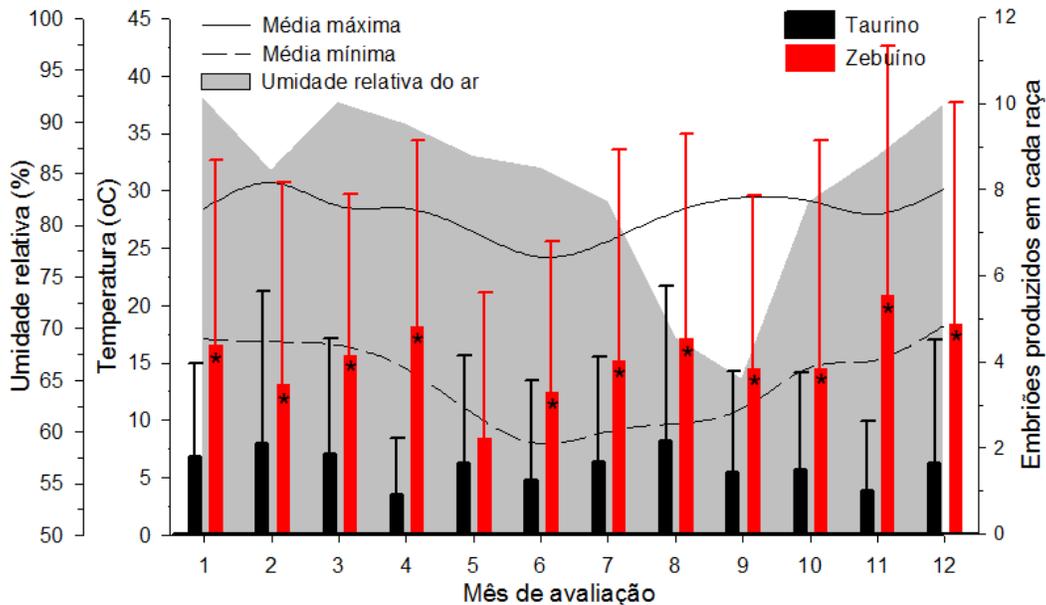


Figura 5: Variações climáticas e médias de produção de embriões nos dois grupamentos genéticos nos diferentes meses do ano

Os animais zebuínos possuem o maior número de pequenos folículos em crescimento nos ovários e, conseqüentemente, um maior número de CCOs recuperados por OPU (VIANA *et al.*, 2004), quando comparados com resultados de *Bos taurus taurus* (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2005). Em outro estudo, Carvalho *et al.* (2008) também descrevem maior número de folículos sendo recrutados em fêmeas zebuínas por onda de crescimento folicular do que em fêmeas taurinas (cerca de 34 e 25, respectivamente). Essa característica, particularmente, tem influência direta nos resultados obtidos pela técnica de TE e de OPU-PIVE, uma vez que possibilita a obtenção de número

maior de oócitos indicando uma vantagem do uso de fêmeas zebuínas sobre taurinas.

Nos resultados de conversão oócitos totais para embrião entre as raças, houve efeito de raça ($P < 0,0001$). As conversões diferiram em todos os meses ($P < 0,05$) entre zebuínos e taurinos, exceto no mês de maio (Figura 6).

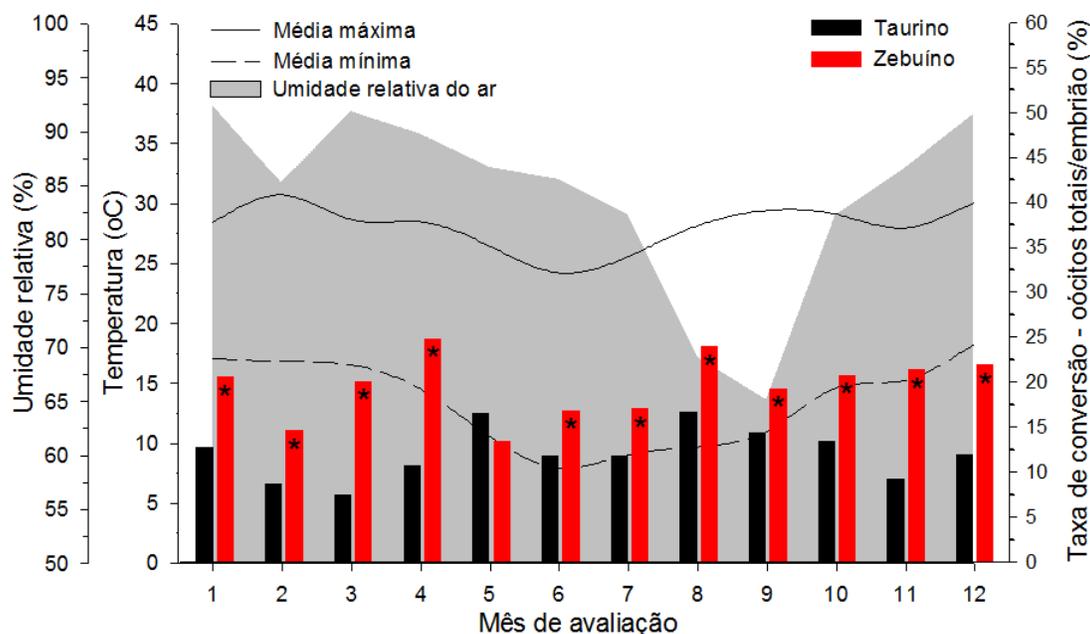


Figura 6: Variáveis climáticas e taxa de conversão (Embriões/oócitos totais) de doadoras taurinas e zebuínas nos diferentes meses do ano

Houve diferença na taxa de conversão de oócitos a embriões praticamente em todo o ano. Isso mostra a menor viabilidade funcional dos oócitos de taurinos para a PIVE. O único mês em que não houve diferença não foi decorrente de melhoria na conversão dos taurinos, mas redução na taxa de conversão dos zebuínos (Figura 9).

Os resultados de conversão oócitos viáveis para embrião entre mostram efeito de raça ($P < 0,0001$). As conversões diferiram em todos os meses ($P < 0,05$), exceto nos meses de janeiro ($P < 0,2$) e maio ($P < 0,9$) (Figura 7).

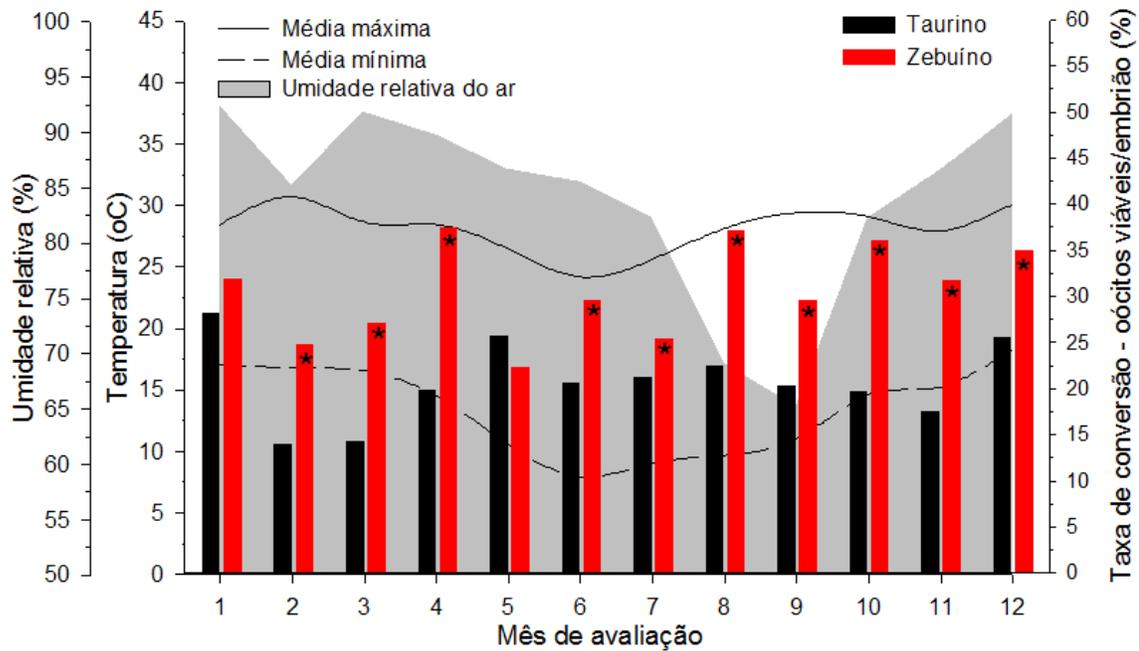


Figura 7: Variáveis climáticas e taxa de conversão (Embriões/oócitos viáveis) de doadoras taurinas e zebuínas ao longo do ano

De acordo com Camargo *et al.* (2007), oócitos de doadoras Gir no verão foram mais competentes para o desenvolvimento embrionário *in vitro* e pareciam estar sob menos estresse que oócitos oriundos de doadoras holandesas.

Dentro de cada raça, o comportamento dessa variável não foi semelhante ao longo do ano. Nos animais de raças taurinas, as taxas de conversão – oócitos totais e oócitos viáveis para embrião - se comportaram de maneira semelhante ao longo do ano ($P < 0,1$ e $P < 0,3$, respectivamente) (Figuras 5 e 6). Isso mostra que a variação das condições climáticas durante os diferentes meses do ano, na região estudada, sob as condições de manejo empregadas, não influenciaram a qualidade dos gametas de taurinos.

Borges *et al.* (1998) observaram que as fêmeas *Bos taurus taurus* (raça Holandesa) apresentaram um declínio significativo da qualidade do oócito recuperado e de sua capacidade de desenvolvimento quando em altas temperaturas e umidades, o que não foi observado em outro estudo em fêmeas *Bos taurus indicus*, (ROCHA *et al.*, 1998).

No entanto, em animais de raças zebuínas, essas taxas variaram ao longo do ano ($P < 0,0001$) para as conversões de oócitos totais e viáveis para embrião.

Pode-se notar uma tendência de redução na taxa de conversão nos meses mais frios (Figura 9), ou seja, na qualidade dos gametas de zebuínos nos períodos onde se observa queda de temperatura. A partir do mês de abril, as temperaturas, principalmente as médias mínimas, apresentaram tendência de queda acentuada. Exatamente a partir desse período se observa a redução na taxa de conversão, indicando relação entre os eventos. Embora a redução média de temperatura observada não coloque os zebuínos totalmente fora da zona de conforto térmico (ZCT), nesse período, as temperaturas mínimas, em todos os meses, atingiram picos mínimos que se situam muito abaixo da ZCT para essa espécie (Figura 1).

Outro fator que provavelmente contribuiu de forma indireta para essa menor taxa de conversão nos animais de origem zebuína está relacionado aos efeitos das variações climáticas sobre a disponibilidade e sobre a qualidade das pastagens. A diminuição do fotoperíodo, associada à redução da temperatura e à umidade relativa, tem efeitos diretos, inicialmente sobre a qualidade e, posteriormente, também sobre a disponibilidade de nutrientes nas pastagens.

Embora este estudo não tenha mensurado diretamente as variações estacionais nas características das pastagens, isto é bem descrito na literatura para pastagens tropicais. Essa influência foi notada nas doadoras taurinas e, não, nas zebuínas por duas situações distintas: o tipo de manejo empregado para as doadoras zebuínas está mais dependente de obtenção de nutrientes das pastagens, sendo essa categoria mais sujeita a tais variações, visto que a suplementação volumosa e concentrada normalmente é menos intensa.

Já para as taurinas, provavelmente esse efeito indireto das variações climáticas observado nos zebuínos a partir do mês de abril, via qualidade das pastagens não tenha sido percebido por essas condições: o manejo desses animais geralmente se baseia em maior intensidade de suplementação, o que minimiza os efeitos deletérios da redução sazonal de nutrientes das pastagens. Além disso, a queda da temperatura observada pode ter influenciado positivamente as fêmeas com essa composição genética, pois, ao contrário das

zebuínas, nesse período, tais animais se encontraram mais tempo dentro da ZCT.

As forragens tropicais têm crescimento rápido, porém são normalmente pobres em proteína e em energia e ricas em fibras, com baixa eficiência para ganho em peso. Sua produção de calor é elevada quando comparada às forragens de clima temperado. Todavia, o aumento da temperatura produz um aumento na digestibilidade e esse aumento compensa parcialmente a diminuição do valor energético e proteico dessas forragens.

A exposição de vacas produtoras de leite ao estresse térmico *in vivo* diminui o consumo de matéria seca, reduzindo os níveis circulantes de glicose, de insulina e de IGF-I. Essa redução de IGF-I compromete o crescimento folicular e a qualidade oocitária (De RENSIS e SCARAMUZZI, 2003).

Ao atingir temperatura de 25,5°C, uma vaca passa a ter dificuldades para eliminar o excesso de calor e o consumo de ração começa a diminuir. À medida que a temperatura aumenta, a quantidade de energia consumida para a manutenção da homeotermia também eleva. Para isso, a ingestão de matéria seca precisa aumentar, porém, quando o estresse térmico é intenso, a ingestão de matéria seca cai, os níveis de energia da vaca são duplamente afetados: maior necessidade de energia para manter a homeotermia e menor consumo de energia (STAPLES, 2009).

Staples (2009) indica que, para reverter pelo menos em parte a diminuição da ingestão de matéria seca ocasionada pelo estresse térmico, é necessário resfriar fisicamente os animais e alimentá-los nas primeiras horas do dia e no final da tarde, atenuando a carga de calor sobre as vacas.

Para diminuir os efeitos do estresse térmico sobre as vacas europeias, devem ser adotadas algumas estratégias de manejo nutricional, como aumentar a frequência de alimentação; fornecer sempre alimentos frescos, se possível, fornecer a dieta como mistura total, evitando a seleção dos alimentos; oferecer maior parte da dieta no período da noite, aproveitando a temperatura ambiente mais baixa; promover pelo menos 75 cm de espaço nos comedouros para cada vaca; não formar lotes com excesso de animais e evitar mudanças repentinas na dieta (DHIMAN & ZAMAN, 2001).

Além disso, durante o estresse térmico, o metabolismo torna-se reduzido, em virtude da diminuição dos hormônios tiroideanos, principalmente

do triiodotironina (MAGDUB *et al.*, 1982). Esse fato, associado à redução da ingestão de matéria seca, faz com que a taxa de passagem da digesta pelo trato gastro intestinal se torne mais lenta, refletindo numa redução da atividade e da motilidade ruminal (SILANIKOVE, 1992).

Oócitos de vacas HPB, aspirados durante o verão, apresentaram menor capacidade de desenvolvimento até a fase de blastocisto após a fertilização *in vitro*, comparados a oócitos obtidos durante o inverno (ROCHA *et al.*, 1998; AL-KATANANI e HANSEN 2002). Além disso, a exposição do complexo cumulus-oócito (CCOs) de bovinos a elevadas temperaturas nas primeiras 12 horas de maturação *in vitro* comprometem a arquitetura do citoesqueleto; reduz a maturação nuclear do oócito (ROTH & HANSEN, 2005); altera a síntese de novas proteínas (EDWARDS & HANSEN, 1996, 1997); promove o aumento de radicais livres (LAWRENCE *et al.*, 2004) e induz o oócito à apoptose (ROTH e HANSEN, 2004). Esses efeitos deletérios diminuem a capacidade do oócito de se desenvolver a blastocisto após a fertilização *in vitro* (EDWARDS *et al.*, 1997).

De acordo com o estudo *in vitro* de Al-Katanani (2002), o desenvolvimento embrionário é influenciado pela exposição prévia do oócito e do embrião ao estresse térmico. Doadoras aspiradas durante o período do verão têm sua capacidade de desenvolvimento até blastocisto reduzido durante a PIVE em comparação ao inverno nas raças taurinas, pois, nas zebuínas, é o contrário.

6. CONCLUSÕES

- Vacas zebuínas produzem mais oócitos viáveis e totais que vacas europeias.
- A produção de embriões é maior em vacas zebuínas, não somente pela maior produção de oócitos, mas também pela melhor taxa de conversão.
- Não houve variação climática na produção de oócitos viáveis e totais nas vacas de origem europeia.
- As vacas zebuínas produzem menos embriões nos períodos mais frios do ano, principalmente nos meses de abril e maio.

7. REFERÊNCIAS

ADEYEMO, O. et al. Estrous in *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers acclimatized to the hot humid seasonal equatorial climate. **Zbl. Vet. Med. A**, v.26, n.10, p. 788-799, 1979.

ALLEN, T.E.; PAN, S.; HAYMAN, R.H. The effect of feeding on evaporative heat loss and body temperature in zebu and Jersey heifers. **Australian Journal of Agricultural Research**, Australia, v. 14, p. 580-593, 1963.

ALVAREZ, P.L. et al. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **J. Anim. Sci.** v. 78, p. 1291–1302, 2000.

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. **Mol. Reprod. Dev.**, v.62, p.174-180, 2002.

AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 396, 2002.

ANDERSON, J. The periodicity and duration of oestrous in zebu and grad cattle. **J.Agric. Sci.**, v. 34, p. 57-68, 1944.

ARLOTTO, T. et al. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 943-956, 1996.

ARMSTRONG, D.G. et al. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology Reproduction**, v.64, p. 1624- 1632, 2001.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483–1496, 2001.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U., SALES, J. N. de S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.205-211, abr./jun. 2007.

BÉNYEI, B.; BARROS, C.W.C. Variações fisiológicas de parâmetros reprodutivos em vacas de raça Holandesa importadas da Hungria para o Nordeste brasileiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 3, 2000.

BERTIPAGLIA, E.C.A. et al. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de características do pelame e de desempenho reprodutivo de vacas holandesas em clima tropical. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 350 - 359, 2007.

BLONDIN, P. et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 38–43, 2002.

BONI, et al. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48, n.2, p.277-289, 1997.

BORGES, A.M. et al. Influência da temperatura na qualidade dos embriões de novilhas mestiças. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. **Anais...**, Botucatu: FMVZ/UNESP, 1998. p. 99-101.

BOUSQUET, D. et al. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, p. 59-70, 1999.

BRACKETT, B. C. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 101, p. 147-158, 1982.

CAMARGO, L. S. A. et al. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, p. 626-632, 2007.

CARVALHO, F.A. et al. Breed effects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, p. 3570-3573, 1995.

CARVALHO, F. A.; LAMMOGLIA, M. A.; SIMÕES, M. J. Breed effects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat estresse. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 3570-3573, 1995b.

CARVALHO, J. B. P et al. Effect of early luteolysis in progesterone- based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

CECCONI, S.; CICCARELLI, C.; BARBERI, M. Granulosa cell-oocyte interactions. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.115, p.19-22, 2004.

COSTA E SILVA, E.V. Ambiência e produção de carne com qualidade. In: CURSO DE MELHORAMENTO DE GADO DE CORTE DA EMBRAPA – GENEPLUS, 9, Campo Grande, **Anais...** Campo Grande, Embrapa Gado de Corte, 2003, CD-ROM.

COSTA E SILVA, E. V.; RUSSI, Livia dos Santos. Ambiência e reprodução de bovinos de corte. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA - ZOOTEC, 7, 2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2005.

CURTIS, S.E. **Environmental management in animal agriculture**. Iowa: State University Press, 1983. p. 409.

DAYAN, A. et al. A influência da condição ovariana na aspiração folicular e produção in vitro de embriões em raças zebuínas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, n. 1, p. 226, 1999.

De RENSIS, F., SCARAMUZZI, J.R. Heat Stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow – a review. **Theriogenology**, v. 60, p. 1139-1151, 2003.

DHIMAN, T. R.; ZAMAN, M. S. Desafio dos sistemas de produção de leite em confinamento em condições de clima quente. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO DE GADO DE LEITE, 2, 2001, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte, 2001. p. 5-20.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M. **Exame clínico dos bovinos** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 419.

DODE, M. A. N. Avanços na maturação oocitária em bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 34, p. 115-130, 2006.

DOBSON, H. et al. Effect of reducing LH pulse frequency and amplitude on ovarian o estradiol production in the ewe. In: 5th International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 54, (in press), 1999^a.

DOMINGUEZ, M. M. Effect of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v. 43, p. 1405-1418, 1995.

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. **Biol. Reprod.**, v.55, p.341-346, 1996.

EDWARDS, J.L. et al. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.48, p.25-33, 1997.

EDWARDS JL, HANSEN PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol Reprod Dev**, v. 46, p. 138-145, 1997.

FABER, D. C. et al. Commercialization of animal biotechnology, **Theriogenology**, v. 59, p. 125-138, 2003.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

GALLI, C.; LAZAZARI, G. Practical aspects of lvm/lvf in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 371-379, 1996.

GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R.; Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2004, Londrina, PR. **Anais...** São Paulo: Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 2004. p. 223- 230.

GIMENES, L.U. **Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular.** 2010. 122 fls.Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2010.

GUZELOGLU A. et al. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Anim Reprod Sci**, v.66, p.15-34, 2001.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 349-360, 2004.

HANSEN, J.P. Managing the Heat-Stressed Cow to Improve Reproduction.
In: WESTERN DAIRY MANAGEMENT CONFERENCE, 7, 2005.
Proceedings... 2005, p. 9-11.

HANZEN, C.; GOFFIN, L. Use of ultrasonography for ovum pick-up (OPU) in the bovine. A review. **Ann. Med. Vet.**, v. 142, p. 81-91, 1998.

HASLER, J. F. Commercial production of in vitro-derived bovine embryos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, p. 117-134, 1996.

HENDRIKSEN, P. J. et al. Bovine follicular development and as effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 11-20, 2000.

INGRAHAM, R. H.; STANLEY, R. W.; WAGNER, W. C. Seasonal effects on shade and nonshade cows as measure by rectal temperature, adrenal cortex hormones, thyroid hormone and milk production. **Am. J. Vet. Res.**, v. 40, p. 1792-1797, 1979.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes, 1928. Mapa, color, 150 cm x 200 cm.

KRININGERM III, C.E. et al. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, p.13-24, 2003.

LAWRENCE, J.L. et al. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. **J. Dairy. Sci.**, v.87, p.2449-2454, 2004.

LOONEY, C. R.; LINDSEY, B. R.; GONSETH, C. L. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 67-72, 1994.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 17-22, 2008.

LONERGAN, P. et al. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.57, p.146-52, 2000.

LUCY, M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1635-1647, 2000.

MAGDUB, A.; JOHNSON, H. D.; BELYEA, R. L. Effect of environmental heat and dietary fiber on thyroid physiology of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 12, p. 2323-2331, 1982.

MARQUES, J. A. **Estresse e produção animal**. [S. l.: s, n.], 2000 (Curso de Atualização- FUNDEPEC- PR).

MCNEILLY, A.S., PICTON, H.M., CAMPBELL, B.K., BAIRD, D.T. Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. **J. Reprod. Fertil**, v. 92, p. 177-186, 1991.

MERTON, J. S. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

MIYANO T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. **Theriogenology**, v.59, p.61-72, 2003.

MIYAUCHI, T. M. **Protocolos hormonais de preparação de doadoras bovinas para produção de embriões *in vitro***. 2011. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de concentração Reprodução Animal) – UNIFENAS, Alfenas, 2011.

MOENTER, S.M., CARATY, A., KARSCH, F.J. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. **Endocrinology**, v. 127, p. 1375–1384, 1990.

MONTEIRO, F. M. et al. Influence of Superovulatory Protocols on In Vitro Production of Nellore (*Bos indicus*) Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 860–864, 2009.

MUNHOZ, A. L. R.; LUNA, H. S. Morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos submetidos aos estresses calóricos *in vitro*. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n. 3, p. 85-88, 2008.

NEIVA, S. R. **Produção de bovinos leiteiros**. Lavras: UFLA,1998. 534 p.

NUNES, D. S. R. et al. Fatores que interferem na qualidade oocitária e no número de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, 2010.

NUTTINCK, F. et al. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulusoocyte complexes during oocyte maturation. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.27, p.179-795, 2004.

OLSON,T.A. et al. Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 80-90, 2003.

O'CONNOR, S. F. et al. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.75, p. 1822-1830, 1997.

PAULA –LOPES, FF, HANSEN PJ. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biol Reprod**, v. 66, p. 1169-1177, 2002.

PAULA-LOPES, F.F. et al. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v.125, p. 285-294., 2003.

PETERSON, A. J.; LEE, R. S. Improving successful pregnancies after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 687- 697, 2003.

PONTES, J. H. F. **Aspectos aplicados da produção *in vitro* de embriões *bos indicus***. 2009. 160 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RIVIER, C., RIVEST, S. Effects of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 523-532, 1991.

RIZOS, D. et al. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 44-50, 2008.

ROCHA, A. et al. 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.

ROENFELDT, S. You can't afford to ignore heat stress. **Dairy Manage**, v.35, n.5, p.6-12, 1998.

ROSENBERG M, et al. Seasonal variations in post-partum plasma progesterone levels and conception in primiparous and multiparous dairy cows. **J Reprod Fertil**, v. 51, p. 363-367, 1977.

ROTH, Z., HANSEN, P.J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biol. Reprod.**, v.71, p.1898-18906, 2004.

ROTH, Z., HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v.129, p.235-244, 2005.

RUBIN, K. C. P. **Particularidades reprodutivas da raça Nelore na produção in vitro de embriões (PIVE)**. 2006. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR, 2006.

SANTOS, R.G. et al. Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005. **Anais...** 2005, p.79.

SARTORI R et al. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J Dairy Sci**, v.85, p.2803-2812, 2002.

SENEDA, M. M. et al. Aspiração folicular transvaginal sem estímulo hormonal em vacas holandesas. **ARS veterinária**, v. 17, n. 1, p. 11-16, 2001.

SIQUEIRA, L. G. et al. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 949-958, 2009.

SILANIKOVE, J. Effects of water scarcity and hot environment on appetite and digestion in ruminants: a review. **Livestock Production Science**, v. 30, n. 6, p. 175-194, 1992.

SILVA, G. R. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo: Nobel, 2000.

SILVA, R.G.; SCALA Jr, N.L.; POYAY, P.L.B. Transmissão de Radiação Ultravioleta Através do Pelame e da Epiderme de Bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1939 - 1947, 2001.

SOUSA, A. J. O. **Avaliação da técnica de aspiração ovocitária transvaginal (Ovum Pick Up) e produção in vitro de embriões da raça nelore (Bos taurus indicus) oriundos de doadoras com alterações da fertilidade**. 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

SCHULTZ RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Hum Reprod Updated**, v.8, p.323-331, 2002.

STAPLES, C. R. Alimentação de vacas leiteiras sob estresse térmico. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 13, 2009. Uberlândia, MG. **Anais...** Uberlândia, 2009. p. 42-58.

STROUD, B. K.; MYERS, M. W. Clinical results in a comercial IVF facility **Ars Veterinária**, v. 9, p. 105-230, 1993.

TITTO E. A. L. Clima: influência na produção de leite. In: SILVA, I. J. O. **Ambiência de leite em clima quente**. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 2, p. 10-23.

TITTO, C. G.; AMADEU, C. C. B. Manejo ambiental e instalações para vacas leiteiras em ambiente tropical. In: WORKSHOP DE AMBIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE LEITE, I., 2008, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa, 2008.

TURNER, J. W. Genetic and biological aspects of zebu adaptability. **Journal of Animal Science**, v. 50, p. 1201 – 1205, 1980.

VAN WAGTENDONK-De LEEUW, A. M. Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, p. 914-925, 2006.

VIANA, J. H. M. et al. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

VIANA, J. H. M. et al. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 1-12, 2004.

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-ócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, 2005.

VIANA, J. H. M. et al. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 661-s674, 2010. (Suplemento 2)

VIEIRA, Maurício Rocha. **Influência do sombreamento de pastagens no desempenho reprodutivo de bovinos**. 2012. 40 fls. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Sustentabilidade). Centro Universitário de Caratinga, Caratinga – MG, 2012.

WEBB R. et al. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **J Anim Sci**, v.82, p.63-74, 2004.

WEST, J.W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 21-35, 1999.

WEST, J.W. Physiological effects of heat stress on production and reproduction. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 2002, Fort Wayne. **Proceedings...** Fort Wayne: Eastridge, M.D., 2002. p.1-9.

YOULSEF, M.K. **Stress physiology in livestock.** Boca Raton: CRC Press, 1985. 217p.