



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

**Influência da estação do ano na produção de embriões *in vitro* de
bovino no recôncavo Baiano**

Cruz das Almas

2013

Joelmo Figueredo Junior

**Influência da estação do ano na produção de embriões *in vitro* de
bovinos**

Projeto apresentado, como parte do trabalho de conclusão de curso de graduação do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa

Cruz das Almas

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

F475

Figueredo Junior, Joelmo.

Influência da estação do ano na produção de embriões in vitro de bovino no Recôncavo Baiano / Joelmo Figueredo Junior._ Cruz das Almas, BA, 2013.

43f.; il.

Orientadora: Larissa Pires Barbosa.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Bovino – Reprodução animal. 2.Aspectos ambientais – Fertilização in vitro. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.
II.Título.

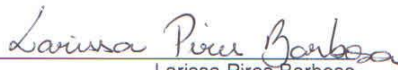
CDD: 636.0824


Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA

COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE
JOELMO FIGUEREDO JUNIOR

INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DO ANO NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO DE
BOVINO NO RECÔNCAVO DA BAHIA


Larissa Pires Barbosa
(Orientadora)


Carmo Emanuel Almeida Biscarde
(Membro)


Carlos Dantas Liborio
(Membro)

Cruz das Almas, 16 de outubro de 2013.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a qualidade dos oócitos recuperados de fêmeas doadoras e a sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro*, inovulados em fêmeas receptoras durante o período de verão e inverno e a qualidade dos corpos lúteo produzidos pelas fêmeas receptoras nesses dois períodos do ano. Os dados bioclimáticos demonstraram consistência entre as estações de verão e inverno com valores de umidade relativa do ar para o verão de $82,52 \pm 7,03\%$ e para o inverno de $81,06 \pm 10,18\%$ ($P > 0,05$); temperatura máxima de $33,07 \pm 1,84$ e $27,76 \pm 2,16^\circ\text{C}$ ($P < 0,05$), para o verão e o inverno, respectivamente e temperatura mínima de $20,57 \pm 1,60$ e de $18,02 \pm 1,58^\circ\text{C}$ ($P < 0,05$), para o verão e o inverno, respectivamente. Mesmo o período de verão tendo apresentado valores de temperatura máxima acima dos limites para conforto térmico, não houve diferença no número de oócitos totais coletados ($21,40 \pm 10,91$ e $22,26 \pm 13,22$, para verão e inverno, respectivamente), número de oócitos viáveis ($11,26 \pm 6,94$ e $13,40 \pm 10,08$, para verão e inverno, respectivamente) e de embriões ($4,07 \pm 3,23$ e $3,80 \pm 3,26$, para verão e inverno, respectivamente) produzidos entre os dois grupos ($P > 0,05$). Não houve diferença para estágio de desenvolvimento embrionário entre a estação de verão e inverno ($P > 0,05$), sendo mais observado nas duas estações o estágio de blastocisto expandido ($84,40\%$ e $84,09\%$, respectivamente para verão e inverno), assim como também não houve diferença na taxa de gestação entre os grupos ($55,25\%$ e $56,89\%$, para verão e inverno, respectivamente) ($P > 0,05$). Houve diferença com relação à qualidade do corpo lúteo entre os grupos ($P < 0,05$), com maior número de CL de Grau 1 produzidos no verão ($41,01\%$ e $28,97\%$ para o verão e inverno, respectivamente). O processo de produção *in vitro* de embriões de bovinos da raça gir leiteiro pode ser realizado em ambas as estações sem que haja diferença nos resultados, na região do Recôncavo da Bahia e com temperatura ambiente máxima de até $33,07^\circ\text{C}$.

Palavras-chave: PIV, Fatores climáticos, Taxa de gestação

ABSTRACT

This study aimed to assess the quality of oocytes recovered from donor females and survival of embryos produced in vitro in ovulated on recipient females during the summer and winter and the quality of corpus luteum produced by female recipients in these two seasons. The bioclimatic data demonstrated consistency between the summer and winter with the relative humidity values for the summer of 82.52 ± 7.03 % and for winter 81.06 ± 10.18 % ($P > 0.05$); maximum temperature of 33.07 ± 1.84 and 27.76 ± 2.16 degrees C ($P < 0.05$) for the summer and winter, respectively, and minimum temperature of 20.57 ± 1.60 and 18.02 ± 1.58 ° C ($P < 0.05$), for summer and winter, respectively. Even the summer period presenting values being above the maximum temperature limits for thermal comfort, there was no difference in the total number of oocytes collected (21.40 ± 10.91 and 22.26 ± 13.22 , for summer and winter, respectively), number of viable oocytes (11.26 ± 6.94 and 13.40 ± 10.08 , for summer and winter, respectively) and embryos (4.07 ± 3.23 and 3.80 ± 3.26 , summer and winter, respectively) produced between the two groups ($P > 0.05$). There was no difference in stage of embryonic development between the summer season and winter ($P > 0.05$) and was observed in both seasons the expanded blastocyst stage (84.40 % and 84.09 %, respectively for summer and winter), and there was no difference in pregnancy rates between groups (55.25% and 56.89%, for summer and winter, respectively) ($P > 0.05$). There was no difference in the quality of the corpus luteum between groups ($P < 0.05$), with the largest number of CL Grade 1 produced in summer (41.01% and 28.97% for summer and winter, respectively). The process of in vitro production of bovine embryos of the Gir breed dairy can be performed in both seasons without any difference in results in the Reconcavo region of Bahia and maximum ambient temperature of up to 33.07 ° C.

Keywords: PIV , Season, Rate of pregnancy

Sumário

1. Introdução.....	10
2. Revisão de literatura.....	12
2.1.Histórico e uso da produção <i>in vitro</i> de embriões no Brasil.....	12
2.2.Técnica de produção <i>in vitro</i> de embriões.....	14
2.3.Produção <i>in vitro</i> de embriões e fatores ambientais.....	19
3. Metodologia.....	22
3.1.Local e período experimental.....	22
3.2.Grupos experimentais: Obtenção e classificação dos complexo cumulus- oócitos.....	22
3.3.Maturação <i>in vitro</i>	24
3.4.Preparo do sêmen e fertilização <i>in vitro</i>	25
3.5.Cultivo <i>in vitro</i>	26
3.6.Transferência dos embriões frescos produzidos <i>in vitro</i>	27
3.7.Delineamento experimental.....	28
4. Resultados e Discussão.....	29
5. Conclusão.....	37
6. Referência Bibliográficas.....	38

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) expandiu-se nas diferentes espécies pouco tempo depois do nascimento de Louise Brown, em 1978, na Inglaterra, o primeiro bebê produzido *in vitro* no mundo (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Após esse fato, em 1982, nasceu o primeiro bezerro bovino produzido por fecundação *in vitro* nos Estados Unidos (BRACKETT et al., 1982).

A PIV é uma biotecnologia utilizada comercialmente na espécie bovina, com o objetivo de obter em um tempo curto, um maior número de embriões e nascimentos de uma única fêmea doadora, produzindo mais rapidamente animais geneticamente superiores (TERVIT, 1996; GOODHAND et al., 1999; MALARD et al., 1999; TANEJA et al., 2000).

Os programas de PIV estabelecem um acelerado crescimento genético por meio da multiplicação de animais com genética diferenciada. Porém, como qualquer outra biotecnologia aplicada aos animais, apresenta vantagens e algumas restrições na sua utilização. Além dos aspectos inerentes ao embrião, à doadora e ao ambiente, as variáveis relacionadas à receptora são de decisiva importância na taxa de gestação (ALVES et al., 2008).

Um fator preponderante em regiões tropicais é o estresse térmico, que pode afetar o sistema reprodutivo da fêmea, tendo uma redução do desempenho reprodutivo do animal. Durante a fase de crescimento folicular, o estresse térmico pode afetar o ócito, tanto pelo efeito direto, com elevação de temperatura sobre o gameta, quanto por mudanças nas funções foliculares, que podem diminuir a qualidade do oócito (FERREIRA et al., 2010).

Outra função susceptível é a concentração sanguínea de progesterona, que reflete o crescimento, a manutenção e a regressão luteal (SPANNO e SILVA, 1992). Desse fato, decorre a necessidade de se avaliar tamanho e qualidade do corpo lúteo, pois ele é responsável pela produção de progesterona, que vai controlar o ambiente uterino, essencial ao desenvolvimento embrionário e à manutenção da prenhez (THATCHER et al., 2001)a.

Desta forma, objetivou-se avaliar a qualidade dos oócitos recuperados de fêmeas doadoras, a qualidade dos corpos lúteo produzidos e a sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* inovulados em fêmeas receptoras durante o período de verão e inverno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico e uso da produção *in vitro* de embriões no Brasil

A produção *in vitro* de embriões (PIV) expandiu-se nas diferentes espécies animais pouco tempo após o nascimento de Louise Brown, em 1978, na Inglaterra, o primeiro “bebê de proveta” do mundo (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Em 1982, nasceu o primeiro bezerro bovino produzido *in vitro* nos Estados Unidos, o que só foi possível graças às pesquisas iniciais desenvolvidas em animais de laboratório (BRACKETT et al., 1982).

A produção e transferência de embriões no Brasil vêm crescendo, consolidando o país como referência no emprego de biotecnologias da reprodução, principalmente com a técnica de PIV, onde o Brasil é responsável pela produção de 66,6% dos embriões produzidos *in vitro* do mundo (VIANA, 2009).

A PIV apresenta um grande potencial de acelerar o melhoramento genético, assim como também, é uma importante ferramenta de pesquisa para embriologia animal. Trata-se de uma técnica extremamente versátil, podendo ser aplicada em doadoras de diversas idades não interferindo no estado fisiológico da doadora, já que não há nenhuma estimulação hormonal como pré-requisito (GALLI et al., 2003).

O uso da PIV em bovinos além de estar relacionado à compreensão dos eventos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial, a PIV tem sido utilizada como alternativa em alguns casos ou em complementação a TE, com o uso de

oócitos imaturos recuperados de ovários de doadoras de várias idades e estado fisiológico-reprodutivo distintos (YOUNG et al., 1998).

Inicialmente a tecnologia de embrião foi utilizada no Brasil em raças taurinas leiteiras, atualmente as raças zebuínas dominam o mercado nacional de embriões, correspondendo a cerca de 92,4% do total (VIANA et al., 2010).

Segundo Serapião (2007), a PIV pode aumentar o ganho genético num rebanho em cerca de 10%, se aplicada apropriadamente, pois tem a possibilidade de cruzamentos fatoriais, diminuindo a taxa de consanguinidade, bem como pelo uso de fêmeas pré-púberes, além de possibilitar uma grande produção de animais mestiços, mantendo rebanhos com grau de sangue desejado.

A técnica permite o estudo de processos de maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário no estágio antes da implantação embrionária, além de proporcionar o desenvolvimento de técnicas como clonagem e transferência de genes (STROUD e MYERS, 1993; LOONEY et al., 1994; HASLER, 1996; HANZEN e GOFFIN, 1998).

A aspiração de oócitos imaturos diretamente dos folículos ovarianos, associada à maturação, fecundação e cultivo *in vitro* destes embriões, permitem que sejam produzidas, em média, 36 bezerros por ano oriundos de uma única fêmea doadora (RUMPF et al., 2000). Segundo Bousquet et al. (1999), a PIV permite que seja produzida até uma gestação por semana por doadora.

A PIV tem diversas vantagens e aplicações sendo estas: possibilita a determinação e controle do sexo dos produtos; aumento da eficiência dos programas núcleos de produção; rápidas e melhores possibilidades para executar programas de cruzamento; estimação do efeito materno sobre a descendência; rápida multiplicação de

raças; facilidade de importação e exportação de material genético da fêmea; formação de bancos de gametas congelados; aumento da eficiência do sêmen congelado de alto valor genético além do estudo e desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões (GONÇALVES et al., 2002).

2.2. Técnica de PIV de embriões

Em 1988 foi descrita pela primeira vez a técnica de punção folicular para a coleta de oócitos bovinos, por via transvaginal, guiada por ultrassonografia (PIETERSE e KAPPEN, 1988), para a PIV de embriões, sendo a técnica mais utilizada (RODRIGUES, 2000).

A aspiração folicular, em geral, não causa danos ao sistema reprodutor feminino, embora já foi relatado em alguns casos a presença de tecido conjuntivo no parênquima ovariano de vacas doadoras que foram submetidas ao processo de coleta a cada quinze dias (RODRIGUES e GARCIA, 2000). É importante realizar a higienização prévia da vulva da doadora e anestesia epidural, para evitar traumas ao animal e movimentos peristálticos durante a manipulação (LEIVAS, 2006).

A obtenção dos oócitos é realizada com a introdução de um dispositivo de punção com uma guia transvaginal acoplada a uma bomba de vácuo. Por meio do uso do aparelho de ultrassom é possível visualizar os folículos, agulha que aspira o oócito para um tubo falcon protegido da luz. Em seguida os oócitos são selecionados, classificados e transportados ao laboratório de PIV (GARCIA et al., 2004).

No interior do folículo, o oócito está envolto por células da granulosa, formando o complexo cumulus oócitico (CCOs) (RENESTO e COELHO, 2004). O oócito produz substâncias reguladoras com função importante na atividade das células do cumulus e, da mesma maneira, componentes dessas células somáticas tem participação ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos oócitos (GONÇALVES et al., 2007).

Diferente da transferência de embriões, a aspiração folicular é considerada uma técnica que apresenta maior flexibilidade, uma vez que se pode obter oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade e vacas prenhes até o terceiro mês de gestação entre 2 a 3 semanas após o parto (GALLI et al., 1996).

Para se obter sucesso na técnica de OPU e PIV depende da população folicular em fase antral (BONI et al., 1997), disponibilidade de uma população uniforme e competente de oócitos imaturos à serem utilizados na MIV (DODE, 2006).

O transporte dos oócitos é feito em meio de maturação que pode ser composto por meio TCM 199 bicarbonato, suplementado com soro fetal bovino (SFB), gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio folículo estimulante (FSH), estradiol, piruvato, amicacina a 36 °C, utilizando um transportador de oócitos (RENESTO e COELHO, 2004).

Após a obtenção dos oócitos aspirados do interior dos folículos ovarianos, os mesmos ainda não se encontram aptos a serem fecundados, sendo necessário uma série de transformações do núcleo e do citoplasma, que consiste na maturação oocitária (GALLI et al., 2003).

Segundo Renesto e Coelho (2004), a maturação do oócito envolve transformações nucleares e citoplasmáticas, estando relacionada a uma série de

mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o oócito apto para ser fecundado e se desenvolver subsequentemente.

Os eventos moleculares relacionados à maturação citoplasmática ainda não são totalmente conhecidos, mas acredita-se que proteínas são estocadas em uma forma estável durante este período e têm uma importante função durante o desenvolvimento embrionário precoce, quando o genoma do embrião permanece quiescente (MERMILLOD et al., 2000).

Além da maturação nuclear e citoplasmática, foi constatado que as células foliculares, ou seja, as células da granulosa e do “*cumulus oophorus*” têm um papel importante durante a aquisição da competência oocitária na maturação *in vitro* (STAIGMILLER e MOOR, 1984). Oócitos com massa de células do cumulus clara e expandida apresentavam maiores taxas de clivagem após à fecundação *in vitro* comparados àqueles sem células do cumulus ou elas compactadas (SIRARD e LAMBERT, 1985; 1986; HYTTEL et al., 1986).

São necessárias de 18 a 22 horas para que ocorra a maturação nuclear em bovinos, passando do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II (THOMPSON et al., 2000). Segundo Antoniolli (2005), o meio de maturação deve ter características similares à composição do fluido folicular.

A maturação inadequada, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário (MINGOTI, 2005).

Na etapa de FIV, os espermatozoides usados são provenientes de palheta de sêmen congelados, o método de separação espermática mais comum é o gradiente de Percoll (GALLI e LAZZARI, 1996). O percoll é composto por partículas de sílica

coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente descontínuo de duas ou três fases (90, 45 e 30%) para separação espermática (GONÇALVES et al., 2002). Esta fase depende da qualidade dos oócitos e da qualidade dos espermatozóides utilizados (CARVALHO NETO, 2009).

O meio utilizado na FIV deve ser capaz de propiciar ao oócito secundário e ao espermatozóide, condições ideais para que a penetração ocorra da forma mais rápida possível (GORDON, 1994).

O ambiente nessa etapa deve permitir o metabolismo dos oócitos e células do cumulus e manter a função espermática eficiente para essa finalidade, sendo o meio mais utilizado o FERT-TALP (ou TALP-FIV), contendo heparina para capacitação espermática (RENESTO e COELHO, 2004).

O tempo de co-incubação dos oócitos e espermatozoides pode variar de 6 a 24 horas, de acordo com os protocolos utilizados pelos laboratórios (GARCIA et al., 2005; MINGOTI, 2005). A fecundação *in vitro* é um processo dependente de temperatura (LENZ et al., 1983), sendo que os melhores resultados são obtidos quando o processo ocorre em temperatura de 39°C, com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GORDON, 1994; GONSALVES et al., 2002; MINGOTI, 2005).

Após o término do tempo de fecundação *in vitro*, os prováveis zigotos são lavados e transferidos para micro gotas de meio de cultivo que é baseado nos fluidos do útero e do oviduto durante o início da gestação (ANTONIOLLI, 2005). A maioria dos laboratórios tem utilizado o cultivo de embriões em meios semi-definidos com pouco ou nenhum soro e baixa tensão de oxigênio (5% de O₂ em comparação aos 20% encontrados no ar atmosférico), sem co-cultivo em células somáticas (MINGOTI, 2005).

O cultivo pode se estender até o 7º dia após a fecundação *in vitro*, quando é realizada a seleção e a avaliação dos embriões para a transferência ou criopreservação. Para avaliação da taxa de eclosão ou da qualidade embrionária, principalmente pela determinação do número e viabilidade de blastômeros, o cultivo *in vitro* pode se estender até o 8º ou 9º dia após a fecundação *in vitro* (GONSALVES et al., 2002; MINGOTI, 2005).

A proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto é, raramente, superior a 40 % (NEVES et al, 2010), sendo que comercialmente a taxa de blastocisto varia, entre 25 e 35 %. Segundo GALLI (2003) o cultivo *in vitro* é o principal passo a determinar a eficiência do sistema e que muito deve ser feito para melhoria dos resultados. Oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento, são o primeiro requisito para o sucesso da produção *in vitro* de embriões (PIVE) (SENEDA et al., 2001).

O tamanho do folículo de origem, a extensão e integridade das células do *cumulus* influenciam a competência oocitária (FAIR et al., 1995). Folículos maiores (6mm) contêm oócitos com maior potencial para tornarem-se blastocisto, enquanto folículos pequenos (<3mm) contêm oócitos incompetentes (PAVLOK et al., 1992).

Animais das raças zebuínas apresentam maiores taxas de recuperação de oócitos e, em consequência, menor quantidade de embriões produzidos *in vitro* (FABER et al., 2003). Segundo Al-Katanani et al. (2002), um fator que limita a execução da técnica é o estresse térmico, que parece estar associado à queda nas taxas de fecundação *in vivo* e o aumento nas perdas embrionárias. O estado reprodutivo e nutricional das receptoras também interfere nos resultados, podendo então a taxa de gestação dos embriões produzidos *in vitro* ser bastante variáveis.

Deve-se avaliar o tamanho e qualidade do corpo lúteo, pois ele é o responsável pela produção de progesterona, que vai controlar o ambiente uterino, essencial ao desenvolvimento embrionário e à manutenção da prenhez (THATCHER et al., 2001). Segundo Spano e Silva (1992) a concentração de progesterona reflete o crescimento, manutenção e a regressão luteal.

2.3. PIV de embriões e fatores ambientais

A maior parte do território brasileiro está situada na região dos trópicos, e devido à elevada temperatura e umidade relativa do ar presentes nesses locais ocorre alterações nos parâmetros fisiológicos e comportamentais dos animais, caracterizando o estresse térmico. Esse por sua vez, causa alto impacto nos índices produtivos e reprodutivos dos animais que venham a estar exposto, gerando grandes perdas econômicas (CRUZ et al., 2011).

O clima é um dos fatores que mais afetam o bem estar animal, onde a eficiência produtiva e reprodutiva de qualquer animal se relaciona com estímulos do ambiente onde vivem. O animal necessita sempre de um ambiente de conforto térmico, pois a fertilidade é uma das variáveis de maior impacto econômico em todo o processo de produção (CARVALHO et al., 1995).

No processo de ajuste da temperatura corpórea, funções menos vitais ao organismo, como o desempenho reprodutivo e produtivo, 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).

A temperatura endógena do organismo é controlada pelo centro termorregulador hipotalâmico, sendo o hipotálamo anterior responsável pela termorregulação em altas temperaturas e o posterior confere termorregulação em ambientes frios. Em situações de estresse, ocorre a ativação dos sistemas termorreguladores, sendo estes o vasomotor que controla o fluxo sanguíneo tecidual, o pilomotor, responsável pela ereção dos pêlos, as glândulas sudoríparas com a sudorese, a frequência respiratória e as modificações na taxa metabólica (MARQUES, 2000).

A zona de conforto térmico ou termoneutralidade é a faixa de temperatura ambiental dentro da qual o animal não demonstra qualquer sinal de desconforto térmico, ou seja, não sensação de frio ou calor. O que limita essa zona de conforto térmico são as temperaturas críticas inferior e superior, sendo a crítica inferior é a temperatura ambiente abaixo da qual os animais são incapazes de mantê-las fisiológica normal, aumentando a taxa metabólica basal e a crítica superior é aquela que requer mecanismo de perda de calor corpóreo (SOUZA et al.,1999).

A alta temperatura da maioria dos ambientes tropicais, afeta os processos reprodutivos diretamente e indiretamente através do estresse térmico ou calórico. Nas fêmeas gera retardamento da maturidade sexual, interferência na fertilidade do oócito e na sua implantação no útero, interrupção da prenhez, entre outros (MEDEIROS e VIEIRA, 1997).

Com o estresse térmico existe uma alteração do perfil hormonal e dos constituintes sanguíneos, provocando mudanças em todos os sistemas. Esses fatores estimulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, levando a um aumento sérico de cortisol, hormônio responsável por mediar processos de resposta a estresse e altera também

outros sistemas como o reprodutivo, interferindo diretamente na produção e/ou liberação de outros hormônios (INGRAHAM et al., 1979).

O estresse térmico tem efeito sobre os folículos de vacas, resultando na produção de oócitos com menor capacidade de fertilização, e caso haja a fertilização, os embriões passam a ter desenvolvimento anormal (HANSEN, 2007), pode atuar de forma negativa no oócito e no embrião de várias maneiras, tanto pela formação de radicais livres ou peróxidos, ou pela indução exagerada de apoptoses celulares (EDWARDS et al., 2001; PAULA-LOPES e HANSEN, 2002).

Edwards e Hansen (1996) citaram que os oócitos são hipersensibilizados pelo estresse térmico, pela falta de produção das proteínas de choque térmico como HSP e Glutathione. Recentes pesquisas também mostram que, os efeitos do estresse térmico afetam as propriedades físicas e bioquímicas das membranas celulares, conferindo diferença na morfologia de oócitos no inverno em relação ao verão e, ainda, um maior teor de ácidos graxos saturados no verão e de poliinsaturados no inverno (ZERON et al., 2001).

Vendruscolo (2004) relatou que, temperaturas ambientes acima de 27°C reduzem o fluxo sanguíneo para o útero, causando mudanças em sua secreção. Já Galli et al. (2001), afirmaram que, uma vez estabelecida a gestação, as perdas durante o primeiro trimestre podem chegar de 10 a 12%.

3. METODOLOGIA

3.1. Local e período experimental

A obtenção dos oócitos foi realizada em 10 propriedades localizadas na região do Recôncavo da Bahia/BA, no período de 21 de dezembro de 2011 a 21 de março de 2012 e 21 de junho a 21 de setembro de 2012, correspondendo aos períodos de verão e inverno dessa região, respectivamente. As etapas laboratoriais foram realizadas no Laboratório Ciclo Reprodução Animal, localizado no município de São Gonçalo dos Campos/BA, no mesmo período acima citado.

3.2. Grupos experimentais: Obtenção e classificação dos complexos cumulus-oócitos

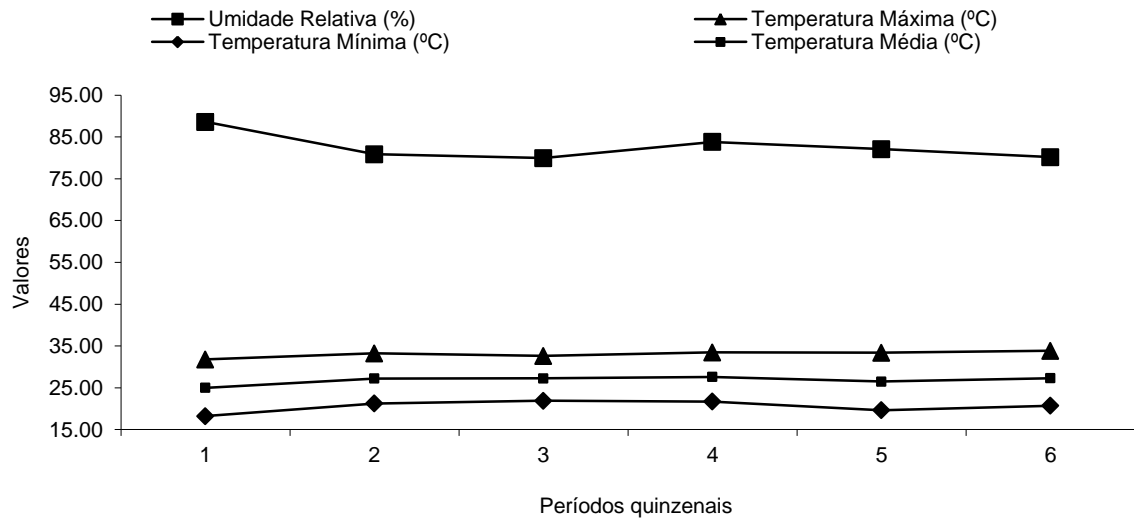
Foram utilizados dois grupos experimentais, sendo:

Grupo I - Verão / Grupo II – Inverno

Nos dois grupos foram recuperados oócitos de vacas doadoras e embriões produzidos *in vitro* desses oócitos e transferidos para vacas receptoras nos respectivos períodos em que os grupos foram divididos.

Os parâmetros bioclimáticos utilizados foram as temperaturas ambientais máxima e mínima e umidade relativa do ar, obtidos da Estação Climatológica da Universidade Estadual de Feira de Santana, 83221-INMET/CTEC, localizada no município de Feira de Santana (Figura 1).

(A)



(B)

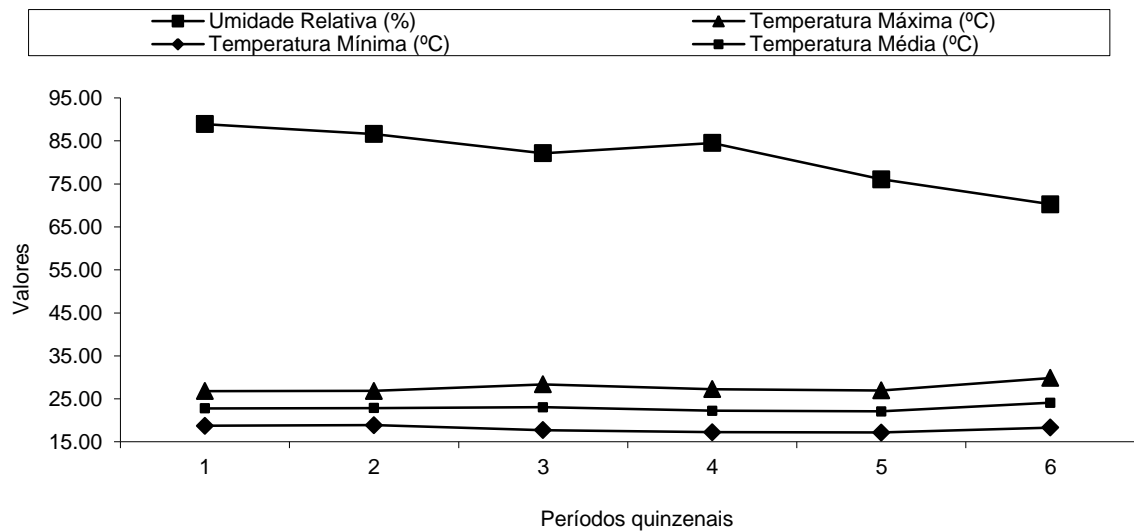


Figura 1. (A) Umidade relativa (%), Temperaturas máxima, mínima e média (°C) no período de verão (21 de Dezembro de 2011 à 21 de Março de 2012), (B) Umidade relativa (%), Temperaturas máxima, mínima e média (°C) no período de inverno (21 de Junho de 2012 à 21 de Setembro de 2012).

Foram obtidos 1.520 oócitos de 71 vacas no período de verão e 1.492 oócitos de 67 vacas no período de inverno de vacas da raça Gir leiteiro. Os oócitos foram coletados das fêmeas doadoras por meio da técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (“Ovum Pick-up”, *OPU*), utilizando o ultrassom da marca Aloka®, modelo SSD-500; bomba de vácuo da marca WTA®, modelo BV 003, utilizando uma pressão de 150 mmHg. Foram aspirados folículos entre 3 e 8mm, em meio de coleta PBS (Solução Salina Fosfatada), acrescido de soro fetal bovino (SFB), TCM 199 hepes, antibiótico, heparina e gás, a uma temperatura de 38 °C.

Imediatamente após a obtenção dos oócitos, esses foram selecionados em microscópio esterioscópico e encaminhados ao laboratório acondicionados em transportadora de oócito da marca WTA®, em meio TCM 199 acrescido de SFB e antibiótico gentamicina à 38 °C. O tempo médio de transporte dos oócitos até o laboratório foi de aproximadamente 2 horas.

Os complexos cumulus oócitos (COCs) foram classificados em função do número de camadas e o grau de compactação do cumulus, pela coloração e uniformidade do citoplasma como: Grau I (Excelente), Grau II (Bom), Grau III (Parcialmente desnudo), Grau IV (Desnudos) e Grau V (Atrésico), segundo Viana et al. (2004).

3.3. Maturação *in vitro* (MIV)

Após a chegada dos COCs ao laboratório, estes foram encaminhados para maturação *in vitro*. Sob estereoscópio (aumento de 10 a 60X), os COCs foram

visualizados, lavados duas vezes em meio TCM-199, colocados em placas de Petri de 100 mm, contendo meio TCM 199 acrescido de bicarbonato.

O meio básico de maturação foi constituído de meio TCM 199, suplementado com aditivos (1 µg/mL de vitamina B₁₂, 10 µg/mL de insulina, 500 µg/mL de álcool polivinil, 75 µg/mL de ácido ascórbico, 5 µg/mL de inositol, 100 µg/mL de acetato de sódio e de glicosamina), Hepes (16,79 mM), bicarbonato de sódio (28,57 mM), piruvato de sódio (2,73 mM), sulfato de kanamicina (75 µg/mL) e 10% de soro inativado de vaca no estro (meio B-199). Os oócitos (até 200 oócitos) foram colocados em placa de polipropileno de 35 mm, contendo 3 mL de meio de maturação. Em seguida foram colocados em cultura por 24h em estufa de cultivo celular, a 38,5 °C, em atmosfera com 5% de CO₂.

Após 24h de maturação *in vitro*, os COCs foram observados em microscópio estereoscópico para confirmação da maturação oocitária, com base na expansão das células do cumulus e na qualidade do citoplasma presente no oócito.

3.4. Preparo do sêmen e fecundação *in vitro* (FIV)

Para fecundação *in vitro* foram utilizados apenas sêmen sexado para nascimento de fêmeas e criopreservado, obtidos em centrais de comercialização de sêmen credenciadas pelo Ministério da Agricultura. A técnica utilizada para separação espermática foi o Gradiente de Percoll, com 45 e 90% de Percoll, onde o sêmen foi centrifugado pela passagem por diferentes gradientes para permitir a separação dos espermatozoides vivos dos demais constituintes do sêmen, com base na diferença de densidade, utilizando uma rotação de 5.000 rpm.

Os oócitos foram retirados do meio de maturação, lavados três vezes em meio H-199 sem soro e posteriormente em meio TALP-FIV, e colocados nas placas de fecundação. A fecundação foi realizada em placas de cultura com 4 fossas, onde em cada fossa foi colocado um volume final de 500 μ L de meio TALP-FIV-PHE com 50 a 80 oócitos (~75 oócitos). A concentração espermática em cada fossa foi de 5×10^6 espermatozoides/mL. As placas contendo os oócitos e os espermatozoides foram incubados em estufa de cultivo celular, com 5% de CO₂ a 38,5 °C, por um período de 18 a 21 horas.

A avaliação da fecundação foi realizada com base na taxa de clivagem, que obtem-se através da divisão do número de oócitos clivados pelo número de oócitos maturados, sendo essa avaliação feita um dia após a fecundação. Apenas os oócitos que estavam claramente degenerados não foram encaminhados para o cultivo *in vitro*. Os oócitos que não sofreram clivagem, mas que não apresentaram aparência de degeneração foram encaminhados para cultivo, pela possibilidade de clivagem tardia.

3.5. Cultivo *in vitro* (CIV)

Após o processo de fecundação *in vitro*, os oócitos fecundados foram encaminhados para o cultivo *in vitro*, utilizando o meio SOF semanal, por um período de 18 à 20 h, em estufa de cultivo celular, com 5% de CO₂ a 38,5 °C.

Uma avaliação de clivagem foi realizada 24 horas após, com a retirada das estruturas que não clivaram. Após seis dias de cultivo fez-se uma avaliação das estruturas e apenas os embriões classificados como Grau I foram transferidos para as fêmeas receptoras.

Os embriões encaminhados para transferência estavam em estágio de: Mórula (MO), Blastocisto inicial (BI), Blastocisto (BL), Blastocisto expandido (BX), Blastocisto eclodindo (BX eclodindo) e Blastocisto eclodido (BE).

3.6. Transferência dos embriões frescos produzidos *in vitro*

Foram transferidos 578 embriões a fresco, envasados em minipalhetas no laboratório, com auxílio de seringas de 1,0 mL com tom cat, e inovulados em receptoras sincronizadas. O protocolo para sincronização das receptoras foi o de TETF, sendo que no D0 foi colocado implantes de progesterona (CIDR® Pfizer; PRIMER® Tecnopec) mais aplicação de 2mg benzoato de estradiol intramuscular (Gonadiol® Intervet Schering-Plough), após 8 dias o implante foi retirado, aplicando 300 UI eCG intramuscular, (Novormon® Intervet Schering-Plough), 0,8 mg cipionato de estradiol intramuscular (ECP® Pfizer) e 0,530 mg prostaglandina F2 α intramuscular (Ciosin® Intervet Schering-Plough). A transferência dos embriões foi realizada 7 dias após a OPU, realizando antes da inovulação a avaliação das receptoras, selecionando as aptas e avaliando e verificando o lado que se encontrava o corpo lúteo. As receptoras usadas foram mestiças. Os corpos lúteo foram classificados em grande (CL1), médio (CL2), pequeno (CL3), e incluso (CLi). Segundo LEAL, L. da S. et al para o CL ser considerado pequeno, a assimetria entre os ovários tinha de ser de 10,0 a 30%, médio 40,0 a 70% e grande >80%.

Após 23 dias da transferência dos embriões foi realizado o exame de ultrassonografia para detecção do diagnóstico de prenhez e entre o 55° ao 70° dia foi feita a sexagem fetal.

3.7. Delineamento Experimental

Foi utilizado um Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), considerando o efeito propriedade. Foi adotado a Análise de Variância (ANOVA) para validação dos dados e o Teste Tukey para análise das variáveis, no programa Sisvar versão 5.1 (1999-2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados bioclimáticos demonstraram consistência entre as estações de verão (21 de Dezembro de 2011 à 21 de Março de 2012) e inverno (21 de Junho de 2012 à 21 de Setembro 2012), com valores de umidade relativa do ar para o verão de $82,52 \pm 7,03\%$ e para o inverno de $81,06 \pm 10,18\%$ ($P > 0,05$); temperatura máxima de $33,07 \pm 1,84$ e $27,76 \pm 2,16$ °C ($P < 0,05$), para o verão e o inverno, respectivamente e temperatura mínima de $20,57 \pm 1,60$ e de $18,02 \pm 1,58$ °C ($P < 0,05$), para o verão e o inverno, respectivamente.

Segundo Pereira (2005) a zona de conforto térmico (ZCT) para os *Bos taurus* seria de 0-16°C e para os *Bos indicus*, de 10-27°C, com temperatura crítica a partir de 35°C e para animais mestiços, de 5- 31°C. Valores para umidade relativa do ar estariam entre 60 e 70% (BAÊTA e SOUZA, 1997). As temperaturas máxima no verão se encontraram acima dos limites, já no inverno se mostraram exatamente nos valores limites. A temperatura mínima encontram-se bem acima dos limites preconizados na literatura. Nos dois períodos experimentais os valores de umidade relativa do ar foram superiores aos citados por Baêta e Souza (1997).

Mesmo no período de verão tendo apresentado valores de temperatura máxima acima dos limites para conforto térmico, não houve diferença no número de oócitos totais coletados, número de oócitos viáveis e de embriões produzidos entre os dois grupos ($P > 0,05$) (Tabela 1). Já de acordo com Ferreira et al. (2006), valores acima de 44°C são limitantes para o conforto do animal, gerando estresse severo.

Tabela 1. Oócitos totais, viáveis e embriões produzidos *in vitro* de 138 vacas da raça gir leiteiro com uso de sêmen sexado nos períodos de verão e inverno na Região do Recôncavo da Bahia

Tratamento	Oócitos totais	Oócitos viáveis	Embriões produzidos <i>in vitro</i>
Verão	21,40 ± 10,91	11,26 ± 6,94	4,07 ± 3,23
Inverno	22,26 ± 13,22	13,40 ± 10,08	3,80 ± 3,26

Os dados foram analisados por meio de Análise de Variância a 5% de probabilidade.

Segundo Sartori et al. (2002), a porcentagem de embriões produzidos é positivamente correlacionada com a quantidade e qualidade de oócitos recuperados, demonstrando a importância desse parâmetro para o sucesso dos programas de PIV.

A média de oócitos viáveis por aspiração obtida neste experimento foi acima da encontrada em diversos estudos, como pode ser observado por Sousa et al. (2007), com média de 5,9±4,88 oócitos viáveis; Bousquet et al. (1999), com média de 9,5±5,6 oócitos viáveis.

Em um trabalho realizado por Fernandes et al. (2001), apesar do percentual de oócitos recuperados (percentual de oócitos totais/total de folículos aspirados) ter sido semelhante na época chuvosa e seca, a proporção de oócitos viáveis foi superior na época chuvosa, com um total de oócitos viáveis na época seca de apenas 19,6%, contra 35,6% na época chuvosa.

Ainda segundo Seneda et al (2002), a taxa de recuperação de oócitos é pior quando os folículos puncionados são maiores que 6mm, e havendo uma melhor recuperação dos mesmos quando oriundos de folículos pequenos entre 2 a 6mm. Bols et al. (1995), relataram que apesar de folículos maiores serem mais fáceis de puncionar, a aspiração de folículos menores parece disponibilizar oócitos de melhor qualidade.

O número de oócitos viáveis está intimamente relacionado com o ambiente em que o animal está submetido. Em climas tropicais, elevada temperatura ambiente e umidade relativa do ar são determinantes no desempenho reprodutivo (ROCHA et al., 2012).

Pesquisas também mostram que, os efeitos do estresse térmico afetam as propriedades físicas e bioquímicas das membranas celulares, conferindo diferença na morfologia de oócitos no inverno em relação ao verão e, ainda, um maior teor de ácidos graxos saturados no verão e de poliinsaturados no inverno (ZERON et al., 2001).

Não houve diferença para estágio de desenvolvimento embrionário entre a estação de verão e inverno ($P>0,05$) (Tabela 2), sendo mais observado nas duas estações o estágio de blastocisto expandido (BX). Resultados coerentes com os encontrados de embriões viáveis produzidos.

Tabela 2. Estádio de desenvolvimento dos embriões produzidos na estação de verão e inverno de vacas gir na região do Recôncavo da Bahia

Tratamento	Blastocisto inicial	Blastocisto	Blastocisto expandido	Blastocisto eclodido
Verão	1,69% (5/295)	13,89% (41/295)	84,40% (249/295)	0,00% (0/295)
Inverno	1,06% (3/283)	13,78% (39/283)	84,09% (238/283)	1,06% (3/283)

Os dados foram analisados pela Análise de Variância à 5 % de probabilidade.

Diversos estágios do desenvolvimento embrionário inicial são importantes para o desenvolvimento e sobrevivência do embrião. O embrião move-se da tuba para o útero no estágio de 8 a 16 células (GREALY et al., 1996). Com 5 a 6 dias de idade o embrião atinge o estágio de 16 a 32 células e estas células começam a se juntar para se formar uma esfera compacta denominada mórula. A compactação celular e as junções intercelulares representam o primeiro estágio crítico em que o embrião começa a atuar como um organismo individual. Nos dias 7 ou 8 uma cavidade se forma e as células do blastocisto inicial diferenciam-se em massa celular interna, destinada a formar o feto, e trofoblasto, destinado a formar a placenta (revisado por SREENAN et al., 2001).

Muitos embriões produzidos *in vitro* não chegam ao estágio de blastocisto e são bloqueados nesse período, sugerindo que a falha em ativar o genoma do embrião se deve, na maioria das vezes, à incompetência dos oócitos utilizados. Entretanto, outros

fatores tais como a composição do meio e atmosfera gasosa também afetam a capacidade de desenvolvimento *in vitro* dos embriões (SARTORI et al., 2008).

Embora a avaliação morfológica não assegure a capacidade dos oócitos de se desenvolverem *in vitro*, essa avaliação serve como indicador de sua viabilidade, pois os oócitos dependem do suporte adequado das células do *cumulus*, que têm ligação direta com o ooplasma, permitindo o transporte de nutrientes e sinais que controlam o metabolismo, a maturação nuclear e citoplasmática (HIRSHFIELD, 1991).

Durante o período de maturação oocitária, o estresse térmico pode agir no complexo cumulus oócitos (CCOs) alterando a arquitetura do citoesqueleto e levando à produção de radicais livres, ocasionando a apoptose oocitária e, interrompendo o alinhamento cromossomal, diminuindo assim, o número de oócitos na fase de metáfase II e, conseqüentemente, diminuindo a proporção de oócitos que se desenvolvem até blastocistos (EDWARDS et al., 2001; PAULA-LOPES e HANSEN, 2002; DE CASTRO e HANSEN, 2007).

O estresse térmico pode atuar de forma negativa no oócito e no embrião de várias maneiras, tanto pela formação de radicais livres ou peróxidos, ou pela indução exagerada de apoptoses celulares (EDWARDS et al., 2001; PAULA-LOPES e HANSEN, 2002). O embrião adquire mecanismos de termoproteção durante seu desenvolvimento, como por exemplo, as proteínas de choque térmico (HSP) e Glutathiona (HANSEN, 1999). A glutathiona (GSH) protege as células contra danos oxidativos causados pelos radicais livres. É produzida pelas células da granulosa que circundam o oócito como forma de proteção oocitária aos efeitos do calor (EDWARDS e HANSEN, 1997; MUNHOZ e LUNA, 2008). Geshi et al. (2000) verificaram que oócitos bovinos envoltos por células da granulosa produzem altas concentrações de

glutaciona durante a maturação *in vitro*, quando comparados à oócitos desnudos (sem as células da granulosa).

Não houve diferença na taxa de gestação entre os grupos ($P>0,05$) (Tabela 3). Rheingantz (2000) citou índice de até 50% de prenhez, trabalhando com dados entre novembro de 2008 até fevereiro de 2009, utilizando doadoras gir e ½ sangue holandês/gir, valores semelhantes aos valores encontrados neste experimento.

Tabela 3. Taxa de gestação de receptoras de embriões produzidos *in vitro* na estação de verão e inverno de vacas gir na região do Recôncavo da Bahia

Tratamento	Taxa de Gestação (%)	Reabsorção embrionária (%)
Verão	55,25 (163/295)	2,03 (6/295)
Inverno	56,89 (161/283)	2,12 (6/283)

Os dados foram analisados por Análise de Variância à 5 % de probabilidade.

Durante o estresse térmico, o fato de haver baixo fluxo sanguíneo no útero impede o abastecimento satisfatório de progestágenos. Essas substâncias são responsáveis por preparar o útero para a gestação, agindo sobre o endométrio favorecendo a fase secretória, caracterizada pelo aumento de teor de glicogênio e enzimas aeróbias das mucosas e, sobre os ovidutos, aumentando a secreção do glicogênio e proteínas em seu epitélio, aumentando a atividade e a motilidade do epitélio ciliar (KOLB, 1987; PIRES et al., 1999; VIANNA, 2002).

Vendruscolo (2004) relatou que, temperaturas ambientes acima de 27°C já reduzem o fluxo sanguíneo para o útero, causando mudanças em sua secreção. Já Galli et al. (2001), afirmaram que, uma vez estabelecida a gestação, as perdas durante o primeiro trimestre podem chegar de 10 a 12%.

Houve diferença com relação à qualidade do corpo lúteo entre os grupos ($P < 0,05$) (Tabela 4), com maior número de CL de Grau 1 produzidos no verão. A influência ou não do estresse calórico no corpo lúteo durante a fase luteínica é menos clara. Foi demonstrado que o estresse calórico aumenta, diminui ou não afeta as concentrações de progesterona no sangue (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999).

Tabela 4. Qualidade do corpo lúteo de receptoras de embriões produzidos *in vitro* na estação de verão e inverno de vacas gir na região do Recôncavo da Bahia

Qualidade do CL	Verão (%)	Inverno (%)
Grau 1	41,01 (121/295) ^a	28,97 (82/283) ^b
Grau 2	42,37 (125/295) ^b	47,34 (134/283) ^a
Grau 3	11,52 (34/295) ^b	21,20 (60/283) ^a
Grau 1i	0,00 (0/295)	0,35 (1/283)
Grau 2i	3,72 (11/295)	2,12 (6/283)
Grau 3i	1,35 (4/295)	0 (0/283)

Grau 1: CL Grande; Grau 2: CL Médio; Grau 3: CL Pequeno. Os dados foram analisados por Análise de Variância e pelo Teste de Tukey à 5 % de probabilidade ($P < 0,05$).

Quanto maior a área do tecido luteal, maior a influência positiva nas taxas de concepção em receptoras de embrião bovino (TRIBULO et al., 2000). Contudo, Leal et al. (2009) não encontraram diferença na taxa de prenhez em relação ao tamanho/diâmetro do CL (pequeno, médio e grande), trabalhando com embriões produzidos *in vivo*. Observou-se que vacas submetidas a estresse calórico apresentaram fases luteínicas mais longas (WILSON et al., 1998).

A taxa de sobrevivência do embrião após a inovulação pode ser influenciada por vários fatores como anormalidades cromossômicas, efeito da doadora, idade e qualidade dos embriões inovulados, método e local da transferência, sincronia doadora-receptora, estado nutricional e concentração sérica de progesterona na receptora, bem como estresse calórico (HANSEN e EALY, 1991).

A sincronia entre o ambiente uterino e o estágio de desenvolvimento embrião é essencial para maximizar a sobrevivência embrionária, sendo a progesterona importante por controlar mudanças no útero, além de influenciar o crescimento embrionário (REIS et al., 2006). O estresse térmico é responsável também pelo aumento da secreção de prostaglandina pelo endométrio, promovendo assim luteólise prematura em decorrência da dificuldade do embrião gerar sinais bioquímicos que sinalizam a gestação (PUTNEY et al., 1988; PUTNEY et al., 1989).

4. CONCLUSÃO

O processo de produção *in vitro* de embriões de bovinos da raça gir leiteiro pode ser realizado em ambas as estações sem que haja diferença nos resultados, na região do Recôncavo da Bahia e com temperatura ambiente máxima de até 33, 07°C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KATANANI, Y.M., HANSEN, P.J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Molecular Reproduction and Development.**, v.62, p.174-180, 2002.

ALVES, B.G.; NEVES, S.M.N.; ARRUDA, R.P.; NAVES, J.H.F.E.; ALVES, K.A. A classificação do corpo lúteo por assimetria ovariana e sua relação com índices de prenhez em receptoras de embriões de bovinos. In: XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA- CONBRAVET. **Anais...**, Gramado, RS, 2008.

ANTONIOLLI, C.B. **Produção in vitro de embriões bovinos utilizando diferentes condições de maturação oocitária.** Tese (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/4329/000500091.pdf?sequence=1> Acessado em 28/09/2013.

BAÊTA, F. C.; SOUZA, C. F. **Ambiência em edificações rurais: Conforto térmico animal.** Viçosa: Editora UFV, 1997. 246p.

BERTIPAGLIA, E. C. A. **Efeitos das características do pelame e da taxa de sudorese sobre parâmetros reprodutivos em vacas da raça Braford.** 2007. 163f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal – São Paulo – Brasil, fevereiro de 2007.

BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, p.677-687, 1995.

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, 1995.

BOUSQUET, D. et al. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v51, p.59-70, 1999.

BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, p.677-687, 1995.

BRACKETT RG, BOUSQUET D, BOICE ML, DONAWICK WJ, EVANS DRESSEL MA. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.

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, v73, p. 3570-3573, 1995.

CARVALHO NETO, J.O. **Avaliação da qualidade do espermatozóide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na Produção in vitro de embriões.** Tese (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

CUNNINGHAM, James G. **Tratado de fisiologia veterinária.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 528 p.

CRUZ, L.V. et al. Efeitos do estresse térmico na produção leiteira: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária - ISSN: 1679-7353**, Garça, Ano IX, número 16, periódicos semestrais, janeiro de 2011.

CURTIS, S. E. **Environmental management in animal agriculture.** The Iowa State University: Ames, 1983. 410p.

DE CASTRO, L.A.; HANSEN, P.J. Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, p. 763-770, 2007.

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

EDWARDS, J.L. et al. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development.**, v.48, p25-33, 1997.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 46 p. 138-145, 1997.

EDWARDS, J.L.; KING, W.A.; KAWARSKY, S.J.; EALY, A.D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 209-223, 2001.

FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v.59, p.125-138, 2003.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development.**, v.42, p.437-442, 1995.

FERREIRA, F; PIRES, F. A.; MARTINES, M. L.; COELHO, S. G.; CARVALHO, A.U.; FERREIRA, P. M.; FACURY FILHO, E. J.; CAMPOS, W. E. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p.1-9, 2006.

FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M.R.; RODRIGUES, C.A.; FREITAS, B.G.; MEIRELLES, F.V.; BARUSELLI, P.S. Estresse térmico e produção embrionária em vacas de leite de alta produção. **REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), XXIV**, Porto de Galinhas, PE. 2010. P.49-58 (palestras).

FERNANDES, E.C et al. Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso do Sul. Braz. **Journal of Veterinary Research Animal Science**. vol.38 no.3 São Paulo: 2001.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-1357, 2001.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p-599-616,2003.

GALLI, C.; LAZAZARI, G. Practical aspects of Ivm/Ivf in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.371-329, 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.

GARCIA JM, AVELINO KB, VANTINI R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal aplicada, 1, 2005, Londrina, PR. **Biotecnologia da reprodução em bovinos**. Londrina, PR: UEL, 2005, 201p.

GESHI, M.; TAKENOUCI, N.; YAMAGUCHI, N.; NAGAI, T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. **Biololy of Reproduction**, New York, v. 63, p. 393-399, 2000.

GOODHAND, K.L., WATT, R.G STAINES, M.E. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, Gainesville, v.51, p. 951-961, 1999.

GONÇALVES, P.B.D. et al. **Produção in vitro de embriões**. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à Reprodução animal, 2 ed. São Paulo, Editora Roca LTDA, 2007, p.195-224.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L. Produção *in vitro* de embriões. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p. 195-226, 2002.

GORDON I. Oocyte recovery and maturation. In: Gordon I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.30-65.

GREALY M, DISKIN MG, SREENAN JM. Protein content of cattle oocytes and embryos from the two-cell to the elongated blastocyst stage at day 16. **Jornal de Reprodução e Fertilidade**. 107: 229-233, 1996.

GONSALVES PBD, BARRETA MH, SANDRI LR, FERREIRA R, ANTONIAZZI AQ. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.

HASLER, J. F. Commercial production of in vitro-derived bovine embryos. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. Porto Alegre, v.24, p.117-134, 1996.

HANSEN, P.J. Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the mammalian preimplantation embryo for heat shock. **Annual Review of Biomedical Sciences**, Botucatu v.1, p. 5-29, 1999.

HANSEN, P.J.; EALY, A.D. Effects of heat stress on the establishment and maintenance of pregnancy in cattle. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1991. p.108-119.

HANZEN, C.; GOFFIN, L. Use of ultrasonography for ovum pick-up (OPU) in the bovine. A review. **Ann. Med. Vet.**, v.142, p81-91, 1998.

HIRSHFIELD, A. N. Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 2, p. 309-316, 1989.

HYTTEL P, CALLESEN H, GREVE T. Ultrastructural features of preovulatory oocytes maturation in superovulated cows. **Jornal de Reprodução e Fertilidade**, v.76, p.645-656, 1986.

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, p1792-1797, 1979.

KOLB, E. **Fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 612 p., 1987.

LEAL, S.L. et al. avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 174-183, jan./mar. 2009.

LEIVAS, F. G. **Influência da Atmosfera Gasosa e da Fonte Proteica sobre o desenvolvimento embrionário in vitro e taxa de prenhez em bovinos**. Tese (Doutorado). Pp 40-42. Arquivo Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

LENZ RW, BALL GD, LEIBFRIED ML, AX RL, FIRST LA. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent process. **Biology of Reproduction**, v.29, p.173-179, 1983.

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**, v41, p.67-72, 1994.

MALAD, P. F., CORDEIRO, D. M., PEIXER, M. A S. et al. Índice de recuperação, qualidade e potencial de desenvolvimento de ovócitos de bezerras zebuínas de 2 a 4 meses de idade; resultados preliminares. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 27, p. 256, 1999.

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

MEDEIROS, L. F. D; VIEIRA, D. H. Apostila de Bioclimatologia Animal. **Net**, 1997. Disponível em:

http://www.iz.ufrj.br/zootecnia_draa/Biblioteca/Fernando/Apostila%20de%20Bioclimatologia%20I.pdf. Acesso em: 25/09/2013.

MELLACE, E. M. **Eficiência da área de sombreamento artificial no bem-estar de novilhas leiteiras criadas a pasto**. 2009. 95f. Dissertação (Mestrado em Física do ambiente agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2009.

MERMILLOD P, TOMANEK M, MARCHAL R, MEIJER L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.89-95, 2000.

MINGOTI, G. V. Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões bovinos. In: **I Simpósio tópicos avançados em Biotecnologias da Reprodução**, 30/09 a 02/10/2005. UNESP, Campus de Jaboticabal, SP.

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

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V39. P.418, Brasília-DF, 2010.

PAULA-LOPES, F.F; HANSEN, P.J. Heat-shock induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally-regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, New York, v.66, p.1169-77, 2002.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocyte derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.63-67, 1992.

PEREIRA, C.C.J. **Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005.

PIETERSE, M. C., KAPPEN K. A., KRUIP, Th.A.M., TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, n. 04, p. 751-762, 1988.

PIRES, M.F.A.; FERREIRA, A.M.; COELHO, S. G. Estresse calórico em Bovinos de Leite. **Caderno técnico de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 29, p. 23-37, 1999.

PUTNEY, D.J.; MALAYER, J.R.; GROSS, T.S.; THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J.; DROST, M. Heat Stress-Induced Alterations in the Synthesis and Secretion of Proteins and Prostaglandins by Cultured Bovine Conceptuses and Uterine Endometrium. **Biology of Reproduction**, New York, v.39, p.717-28, 1988.

PUTNEY, D.J.; MULLINS, S.; THATCHER, W.W.; DROST, T.S. Embryonic development in superovulate dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.19, p.37-51, 1989.

REIS, A.; METELO, R.; SANTOS, P.; SILVA, F. M. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 629-636, 2006.

RENESTO, A.; COELHO, L.A. **Associação das biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos**. Tese (Mestrado). Arquivos da Faculdade de Ciências Agrárias UNESP, p.17-31, 2004.

RHEINGANTZ, M.G.T. Fecundação *in vitro*, criopreservação de ovócitos e embriões e sexagem de embriões bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.24, p.21-29, 2000.

RICHARDS, J. S.; MIDGLEY Jr., A. R. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. **Biology of Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 82-94, 1976.

ROCHA, D.R et al. **Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.36, n.1, p.18-24, jan./mar. 2012.

RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação in vitro: aplicação comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1,p. 186-187, 2000.

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.

RUMPF, R.; DODE, M. A. N.; SILVA, A. E. D. F. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3, 2000, Belo Horizonte: **Anais...** Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2000. p. 248-253.

SARTORI R, DODE MAN. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. In: Biotecnologia da Reprodução em Bovinos: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 3, 2008, Londrina, PR. Anais... Londrina, UEL, 2008. p.175-193.

SARTORI R, SARTORI-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**, 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.

SENEDA M. M. ; ESPER C. R. ; GARCIA J. M. **Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura**; Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 23, n. 1, p. 101-110, jan./jun. 2002.

SERAPIÃO, R.V. **Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos in vitro cultivados em meio livre de soro**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2007.

SERAPIÃO, R.V.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; GILARDI, S.G.T.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A. A.; NOGUEIRA, L.A.G. Criopreservação de embriões bovinos *in vitro*. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v.12, n1/3, p.58-61, 2005.

SIRARD MA, LAMBERT RD. *In vitro* fertilization of follicular oocytes obtained by laparoscopy. **Biology of Reproduction** v.33,p.487-494, 1985.

SIRARD MA, LAMBERT RD. Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. **Veterinary Record**, v.119, p.167-169, 1986.

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, n 70 fls, Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

SOUZA, C.F.; FAÇANHA, D.A.E.; COSTA E SILVA, E.V. **Influência do ambiente sobre o desempenho de bovinos de corte**. Seminário (Disciplina de Bovinos de corte, Programa de Pós Graduação em Zootecnia) - Unesp, Jaboticabal, 1999.

SPANO, A. A.; SILVA, A. A. M. R. Níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral e na fase inicial da gestação em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*). **Ars Veterinária**, v. 8, p. 131-141, 1992.

STEPTOE PC, EDWARDS RG. Birth after reimplantation of human embryo. **Lancet**, v.2, p.366, 1978.

SREENAN JM, DISKIN MG, MORRIS DG. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. In: Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occ Publ Br Soc **Animal Science**; 93-104, 2001

STAIGMILLER RB, MOOR RM. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside of the follicle. **Gamete Res**, v.9, p.221-229, 1984.

STEPTOE PC, EDWARDS RG. Birth after reimplantation of human embryo. **Lancet**, v.2, p.366, 1978.

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

TANEJA, M .; BOLS, P.E.J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotrooin stimulation. **Bio. Reprod.**, Champaign, v.62, 206-213,2000.

TERVIT, H.R. Laparoscopy/lapatomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, 42, p.227-238, 1996.

THATCHER WW, GUZELOGLU A, MATTOS R, BINELLI M, HANSEN TR, PRU JK. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1435-1450, 2001a.

THATCHER WW, MOREIRA F, SANTOS JEP, MATTOS RC, LOPES FL, PANCARCI SM, RISCO CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v.55, p.75-89. 2001b.

THOMPSON JG. *In vitro* culture and embryos metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.263-275, 2000.

TRIBULO, H.; BO, G. A.; GATTI, G. et al. Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices to eliminate the need for estrus detection. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION**, 14., 2000, Stockholm. **Anais...Stockholm: ICAR**, 2000. v. 2, p.115.

VENDRUSCOLO, M. **Relação entre o tempo do ato da inseminação artificial de bovinos e a fertilidade**. 2004, 41p Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias). Setor de Ciências Agrárias, UFPR, Paraná, Curitiba, 2004.

VIANNA, F.P. **Influência do estresse térmico na atividade reprodutiva de fêmeas bovinas**. 17p. Monografia apresentada á disciplina Seminários I. Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Botucatu. Botucatu, São Paulo, 2002.

VIANA, J.H.M. Mudanças e tendências no mercado de Embriões Bovinos no Brasil. **Jornal O Embrião**, v.10, n.42, p. 5-7, jul/ago.2009.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Evolução no uso das técnicas de fertilização *in vitro* na última década e impacto na indústria de embriões bovinos e produção animal no Brasil. **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE)**, Porto de Galinhas, PE, 2010. P.325-334.

WILSON, S.J. et al. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. **Journal Dairy Science**, v.81, p.2132-2138, 1998.

YOUNG LE, SINCLAIR KD, WILMUT I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev Reprod**, v.3, p.155-163,1998.

ZERON Y, OCHERETNY A, KEDAR O, BOROCHOV 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**, v.121, p.447-454, 2001.