

NILSON ANTONIO ALVES BARBALHO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO DIA DA OPU NA PRODUÇÃO DE
EMBRIÕES *IN VITRO* E TAXA PREENHEZ DE BOVINOS DA RAÇA NELORE EM
RONDÔNIA**

Ji-Paraná
2021

NILSON ANTONIO ALVES BARBALHO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO DIA DA OPU NA PRODUÇÃO DE
EMBRIÕES *IN VITRO* E TAXA PREENHEZ DE BOVINOS DA RAÇA NELORE EM
RONDÔNIA**

Monografia apresentada à Banca Examinadora do Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná, como requisito de aprovação para obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Dra. Daniela Cristina Lemos de Carvalho

Ji-Paraná
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP

B228i Barbalho, Nilson Antonio Alves.

Influência da temperatura no dia da OPU na produção de embriões in vitro e taxa prenhez de bovinos da raça nelore em Rondônia. / Nilson Antonio Alves Barbalho. – Ji-Paraná, 2021.
43 p. ; il.

Monografia (Bacharel em Medicina Veterinária) – Centro
Universitário São Lucas Ji-Paraná, 2021.

Orientadora: Prof.^a Dra. Daniela Cristina Lemos de
Carvalho.

1. Bovino - reprodução animal. 2. Estresse térmico. 3.
Fertilização in vitro. (PIVE). 4. Blastocisto. 5. Gestação animal. 6.
Aspiração folicular. (OPU). I. Carvalho, Daniela Cristina Lemos de.
II. Título.

CDU 619:636.082.4

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Bibliotecário Giordani Nunes da Silva CRB 11/1125

NILSON ANTONIO ALVES BARBALHO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO DIA DA OPU NA PRODUÇÃO DE
EMBRIÕES *IN VITRO* E TAXA PREENHEZ DE BOVINOS DA RAÇA NELORE EM
RONDÔNIA**

Monografia apresentada à Banca Examinadora do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná, como requisito de aprovação para obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Dra. Daniela Cristina Lemos

Ji-Paraná, 16 de junho de 2021

Avaliação/ Nota:

BANCA EXAMINADORA

Resultado: _____

Dra. Daniela Cristina Lemos de Carvalho

Centro Universitário São Lucas

Dra. Nátalia Malavasi Vallejo

Centro Universitário São Lucas

Dra. Raquel Zaneti Puelker

P&D Progest Biotecnologia e
Botupharma Biotecnologia

Dedico

Aos meus pais, por formarem grande parte do meu caráter, por depositarem confiança e Fé em mim, e terem orgulho assim como eu, dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida e por mais essa vitória alcançada, pois em todos os momentos me deu força para continuar e não desistir.

Agradeço a minha família por acreditar em meus sonhos e me apoiar em minhas decisões.

A empresa Múltipla Embriões por toda confiança depositada em minha pessoa, por todos os ensinamentos, aprendizados, paciência e apoio nesses últimos três anos de estágio. A todos que ali nessa empresa de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos e amigas da faculdade que foram peça fundamental para minha formação, principalmente pessoal.

Agradeço minha orientadora Dra. Daniela Cristina Lemos de Carvalho por todo apoio e auxílio na confecção desse trabalho, bem como por todos os anos de convivência dentro do laboratório.

Ao meu amigo Guilherme Augusto Lemos, por todos os conhecimentos compartilhados comigo ao longo do meu estágio.

As minhas queridas amigas, Camila Pimenta e Tauane Antonia por todo esses anos de faculdade, por todo apoio que me foi dado ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

A minha estimada amiga, se não posso dizer irmã né?! Emelly Mendes agradeço por cada momento compartilhado com você, que mesmo entre idas e vindas nossa amizade sempre prevaleceu.

A minha amiga Kamila Bicalho, agradeço por esses últimos meses e anos por tantos momentos.

Agradeço também ao pesquisador da Embrapa Luiz Pfeifer, pelo auxílio na elaboração desse trabalho, sua colaboração foi de extrema importância para conclusão desse.

Agradeço também a todos os docentes da instituição São Lucas por todo conhecimento me passado e por todos momentos em sala de aula

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia reprodutiva que contribui para a aceleração de melhoramento genético animal. O estresse térmico é um dos principais problemas para o sucesso na PIVE. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da temperatura ambiental no dia da aspiração folicular (OPU) na produção de embriões *in vitro* e na taxa de prenhez de bovinos da raça Nelore no estado de Rondônia. Os dados utilizados para este estudo foram obtidos de resultados das produções de quatro propriedades clientes do laboratório comercial de produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos, localizado no estado de Rondônia, durante o período de janeiro de 2018 até janeiro de 2021. Para obtenção dos resultados, os dados das produções *in vitro* de embriões e de prenhezes foram analisados com as informações de temperatura máxima no dia da OPU (alta > 33,3°C e baixa < 33,3°C). As taxas de embriões de prenhezes foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. Houve maior produção de embriões (D7 e D10) quando as aspirações foram realizadas em dias em que as temperaturas máximas eram baixas (< 33,3°C). As taxas de prenhezes também foram significativamente menores quando as aspirações foram realizadas em dias em que as temperaturas máximas eram altas (> 33,3°C). Foi observado que temperaturas diárias máximas altas (> 33,3°C) influenciaram negativamente na produção de embriões *in vitro* e prenhezes de bovinos da raça Nelore.

Palavras-chave: Estresse térmico; PIVE; Blastocisto; Gestação; OPU.

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) is a reproductive biotechnology that contributes to the acceleration of animal breeding. One of the main problems for success at PIVE is heat stress. The aim of this study was to evaluate the influence of environmental temperature on the day of ovum pick-up (OPU) on IVP and pregnancy rate of Nelore cattle in Rondônia. The data used for this study were obtained from a commercial IVP laboratory in Rondônia from January 2018 to January 2021. Information from the IVP and pregnancies were examined with the maximum temperature report on the OPU day (high $> 33.3^{\circ}\text{C}$ and low $< 33.3^{\circ}\text{C}$). Embryo and pregnancy rates were analyzed using the chi-square test. Greater production of embryos better embryo production (D7 and D10) was observed when ovum pick-up was performed on days when the maximum temperatures were low ($< 33.3^{\circ}\text{C}$). The conceptions rates were significantly lower when OPU was performed on days when maximum temperatures were high ($> 33.3^{\circ}\text{C}$). The IVP embryos and pregnancies of Nelore cattle were negatively influenced by high maximum daily temperatures ($> 33.3^{\circ}\text{C}$).

Keywords: Heat stress; PIV; Blastocyst; Gestation; OPU.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Procedimento da OPU.....	18
Figura 2 - Complexo cumulus-oócitos imaturos.....	19
Figura 3 - Complexo cumulus-oócitos maturados.....	21
Figura 4 - Receptoras de embriões.	24
Figura 5 - Embriões eclodidos em dia 10 de desenvolvimentos.	30
Figura 6 - Diagnóstico de gestação.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados das PIVEs realizadas na propriedade no município de Ji-Paraná – RO.....	33
Tabela 2 - Dados das PIVEs realizadas na propriedade no município de Parecis – RO.....	33
Tabela 3 - Dados das PIVEs realizadas na propriedade no município de Pimenteiras do Oeste – RO.	33
Tabela 4 - Dados das PIVEs realizadas na propriedade no município de Alta Floresta d'Oeste – RO.	34
Tabela 5 - Taxas de embriões no dia 7 do desenvolvimento (D7) em relação à temperatura máxima no dia da OPU.	34
Tabela 6 - Taxas de embriões no dia 10 do desenvolvimento (D10) em relação à temperatura máxima no dia da OPU.	34
Tabela 7 - Taxas de prenhez (número de gestações em relação ao número de inovulações) em relação à temperatura máxima no dia da OPU.	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Números de embriões nos dias 7 e 10 do desenvolvimento e de prenhez (gestações), em relação à temperatura máxima (baixa ou alta) no dia da OPU.	35
Gráfico 2 - Taxas de embriões nos dias 7 e 10 do desenvolvimento e de prenhez (gestações), em relação à temperatura máxima (baixa ou alta) no dia da OPU.	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina
BSA – Albumina sérica bovina
CCO – Complexo Cumulus Oócito
CIV – Cultivo *in vitro*
CRH – Hormônio liberador de corticotrofina
EUA – Estados Unidos das Américas
FIV – Fecundação *in vitro*
FSH – Hormônio folículo estimulante
GnRH – Hormônio liberador gonadotrofinas
Hg – Mercúrio
HHA – Hormônio-hipofisário-adrenal
HHG – Hipotalâmico-hipofisário-gonadal
IA – Inseminação artificial
LH – Hormônio Luteinizante
MIV – Maturação *in vitro*
Mm – Milímetros
OPU – *Ovum pick-up*
PIVE – Produção *in vitro* de embriões
TCM 199[®] – “Tissue Culture Medium” 199
TE – Transferência de embriões

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO	13
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Geral	14
1.2.2 Específicos	14
1.3 DELIMITAÇÃO DO ESTUDO	14
1.4 RELEVÂNCIA DO ESTUDO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 BIOTECNOLOGIAS APLICADAS A REPRODUÇÃO ANIMAL	16
2.1.1 Produção <i>In Vitro</i> de embriões (PIVE)	16
2.1.1.1 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU - <i>OVUM PICK-UP</i>)	17
2.1.1.2 Maturação <i>In Vitro</i> (MIV)	19
2.1.1.3 Fecundação <i>In Vitro</i> (FIV)	21
2.1.1.4 Cultivo <i>In Vitro</i> (CIV)	22
2.1.1.5 Receptoras	23
2.1.2 Homeostase	24
2.1.2.1 Condições de conforto térmico	25
2.1.2.2 Estresse térmico	25
2.1.2.2.1 Efeitos do estresse térmico no animal	26
2.1.2.2.2 Efeito do estresse térmico sobre a reprodução da fêmea	26
2.2 METODOLOGIA UTILIZADA PELO LABORATÓRIO NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Nas últimas décadas as pesquisas relacionadas à produção e à reprodução de bovinos estão cada vez mais intensas, uma vez que esse setor está cada dia mais tecnológico e intenso no Brasil e no mundo. Existe uma constante necessidade de produzir com eficiência e com o menor impacto ambiental possível, visando sempre aumento de produtividade e bem-estar animal.

A reprodução animal é um dos pilares principais para aumentar a produção. Muitos estudos nessa área já foram realizados para aumento de produtividade e com isso, muitas técnicas foram desenvolvidas e aprimoradas para acelerar ganhos genéticos e conseqüentemente ganhos na produtividade (Naves, 2020). Dentre as técnicas utilizadas para melhoramento genético, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) se destaca por ser uma biotecnologia que possibilita o uso de animais geneticamente superiores, fazendo com que se maximize a quantidade de descendentes desses animais e aperfeiçoe o ganho genético, uma vez que esse processo diminui o intervalo de gerações entre os animais e acelera o melhoramento genético, conseguindo assim animais mais produtivos em menor tempo (VARAGO, 2008). A técnica de fertilização *in vitro* está muito bem difundida no Brasil e conta com tecnologia avançada em sua rotina. Essa biotecnologia está entre as mais desenvolvidas do Brasil, dados literários apontam que em 2015 o Brasil produziu um total de 353.539 embriões, ficando no contexto mundial de produção de embriões atrás somente dos Estados Unidos das Américas (EUA) (VIANA, 2018).

A PIVE envolve diversas etapas, como coleta dos gametas femininos, os oócitos (CCOs – complexos cumulus-oócito), e seguindo de três grandes etapas: maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro*, sendo que todas essas etapas são realizadas dentro de uma infraestrutura laboratorial adequada (DE SOUZA, 2019). Mesmo sendo uma biotecnologia com alto nível de tecnológico, a PIVE tem por diversas vezes enfrentado dificuldades para conseguir resultados mais animadores, pois dados não oficiais apontam que a taxa de prenhez varia entre 40% e 60% (NAVES, 2020).

Entre as barreiras existentes para o sucesso na PIVE, o estresse térmico se encontra entre os principais. O estresse térmico é um problema mundial que afeta cerca de 60% do rebanho bovino mundial (WOLFENSON, 2000). O impacto que o

estresse térmico calórico tem sobre a reprodução animal já é bastante difundido entre a comunidade científica, mas como os sistemas de produção de bovinos estão se intensificando frequentemente, esse assunto sempre acaba atraindo a atenção de pesquisadores, devido a importância que os conhecimentos sobre os impactos do estresse térmico calórico causam na produção animal (CORDEIRO, 2017).

Dentro dos pilares da produção animal, a reprodução é uma das mais sensíveis às variáveis climáticas, sendo afetada principalmente pela hipertermia (HANSEN, 2015), uma vez que esta pode levar a alterações prejudiciais nas funções celulares no sistema reprodutor. Algumas respostas indiretas que também estão ligadas a reprodução são afetadas pelo estresse térmico, como a redistribuição do fluxo sanguíneo, redução de ingestão de alimento e, em alguns casos, pode ocorrer quadros de alcalose metabólica (WOLFENSON, 2000). O assunto fica mais sério, principalmente quando há evidências que o planeta está sofrendo com o processo de aquecimento global (SEGNALINI, 2013), que conseqüentemente, promove prejuízos no desempenho produtivo dos animais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Este trabalho teve por objetivo principal avaliar a influência da temperatura ambiental no dia da aspiração folicular (ou do inglês *ovum pick-up*, OPU) na produção de embriões *in vitro* e na taxa de prenhez de bovinos da raça Nelore no estado de Rondônia.

1.2.2 Específicos

- Analisar a influência da temperatura máxima no dia da OPU na produção de embriões bovinos *in vitro* da raça Nelore;
- Avaliar o efeito da temperatura máxima no dia da OPU na taxa de prenhez de receptoras da raça Nelore.

1.3 DELIMITAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi realizado através de dados comerciais da produção *in vitro* de embriões e prenhezes de bovinos da raça Nelore de quatro propriedades no estado de

Rondônia, entre janeiro de 2018 a janeiro de 2021, cedidos pelo laboratório MÚLTIPLA EMBRIÕES LTDA.

1.4 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Com a grande demanda mundial por alimentos, faz-se necessário uma produção de proteína animal mais intensa. A PIVE é uma biotecnologia que promove uma rápida multiplicação do rebanho, além de fomentar o melhoramento genético. Com isso, é importante conhecer os fatores que possam diminuir ou aumentar a produção de embriões e prenhezes. Este estudo mostrou que a temperatura ambiental tem influência de forma significativa na produção de embriões in vitro e nas taxas de prenhezes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOTECNOLOGIAS APLICADAS A REPRODUÇÃO ANIMAL

O uso de biotecnologias reprodutivas faz com que o Brasil obtenha êxito na produtividade animal. Essas técnicas vêm sendo continuamente aprimoradas e otimizadas para que, cada vez mais, se obtenha resultados satisfatórios.

O principal objetivo dessas biotecnologias é aumentar a eficiência reprodutiva de animais geneticamente superiores fazendo com que se obtenha o máximo de seu potencial genético e o máximo de descendentes possíveis. Para isso, algumas técnicas reprodutivas são utilizadas como inseminação artificial (IA) transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (SILVA, 2019).

A PIVE tem maior destaque por sua habilidade em aproveitar tanto o potencial do macho quanto da fêmea. Esta biotecnologia consiste em, basicamente, manipular os gametas masculinos e femininos fora do corpo do animal, visando simular o que ocorreria naturalmente no organismo do animal (SCANAVEZ, 2013).

2.1.1 Produção *In Vitro* de embriões (PIVE)

A PIVE vem ganhando destaque no âmbito nacional e mundial por sua grande capacidade de aproveitamento do potencial genético das fêmeas bovinas (MELLO, 2016). No Brasil, a PIVE foi utilizada de forma comercial a partir do ano de 1998, através de um projeto financiado pelas instituições FAPESP, Beabisa Agricultura Ltda e a Gertec Tecnologia (GALLI, 2003; SILVA, 2019).

Esta biotecnologia é composta por algumas etapas como: recuperação de CCOs imaturos, por meio de aspiração folicular guiada por ultrassonografia, maturação *in vitro* (MIV) dos CCOs, fecundação *in vitro* e cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até o estágio de blastocisto, onde já podem ser envasados e transferidos, ou em alguns casos criopreservados (VARAGO, 2008). Para que seja possível a realização das diversas etapas da PIVE, deve-se fornecer ambiente e condições adequadas ao cultivo dos gametas e das estruturas embrionárias, mimetizando o que aconteceria *in vivo*. Deve-se fazer uso de incubadoras que necessitam ser aquecidas, úmidas, escuras, estéreis, bem como o ambiente uterino e sendo importante o uso de meio de cultivo específico para cada etapa de PIVE (SANTOS, 2017).

2.1.1.1 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU - *OVUM PICK-UP*)

Uma das primeiras etapas da PIVE, a OPU é a técnica utilizada para obtenção do CCOs através da aspiração folicular transvaginal (SENEDA; RUBIN e LISBOA, 2005). A OPU aliada a PIVE permitiu grande expansão no uso do potencial genético da fêmea de alto valor zootécnico, outra vantagem da utilização dessa técnica é a possibilidade da utilização de fêmeas que sejam portadoras de alguma anormalidade adquirida que as impeçam de se reproduzirem normalmente (NOGUEIRA, MINGOTE e NICACIO, 2013).

A aspiração folicular pode ser realizada em qualquer fase do ciclo estral, pois alguns autores relatam que não há diferenças consideráveis na qualidade dos oócitos, mesmo em momentos diferentes do ciclo estral (SENEDA; RUBIN e LISBOA, 2005). Entretanto, segundo SENEDA et al. (2005) e HONORATO et al. (2013), existe diferença na quantidade de folículos disponíveis para a aspiração, sendo o início da emergência de uma nova onda, o momento mais propício para obtenção de maior quantidade de folículos.

Para a realização da OPU, a doadora deve ser conduzida ao tronco de contenção, deve-se atentar a esse momento, para ser feito o máximo de esforço possível para se evitar o estresse da fêmea doadora. O tronco de contenção deve oferecer segurança, tanto ao animal quanto ao profissional que está realizando o procedimento. Após a contenção, realiza-se a palpação retal prévia, para verificar as condições ovarianas, então é feita a higienização da região perineal, com água limpa, e a secagem com papel toalha, algumas etapas da OPU são demonstradas na figura 1. Deve-se também realizar analgesia com anestesia epidural, com lidocaína a 2% sem vasoconstritor. A anestesia tem por finalidade evitar que o animal sinta algum desconforto e impedir movimentos peristálticos exacerbados, evitando assim que, tanto o profissional, quanto o animal se machuquem (MARIANO et al., 2015).

Figura 1 - Procedimento da OPU



Fonte: Imagens cedidas pela Múltipla Embriões.

O procedimento é realizado com a utilização de um aparelho de ultrassonografia com o transdutor dentro de uma guia transvaginal e com agulha e sistema de aspiração acoplados a um tubo de 50 ml (tubo Falcon), e uma bomba de vácuo acoplada a todo esse sistema. A guia, com o transdutor, é inserida no canal vaginal do animal até o fundo de saco vaginal. Os ovários são posicionados de forma que o profissional os visualize no ultrassom, bem como os folículos. A bomba de vácuos é ativada por meio de um pedal; e com a mão que está segurando a guia, o profissional faz os movimentos necessários para que seja feita a perfuração e punção do líquido folicular. O líquido entra a partir da agulha, segue pelo sistema até o tubo em que está acoplado o sistema. A pressão na bomba de vácuo deve ser de 80 mmHg (milímetros de mercúrio). O médico veterinário responsável pelo procedimento deve repetir o processo de perfuração em todos os folículos até que não restem mais folículos em ambos os ovários (SOUZA, 2020; MARIANO et al., 2015).

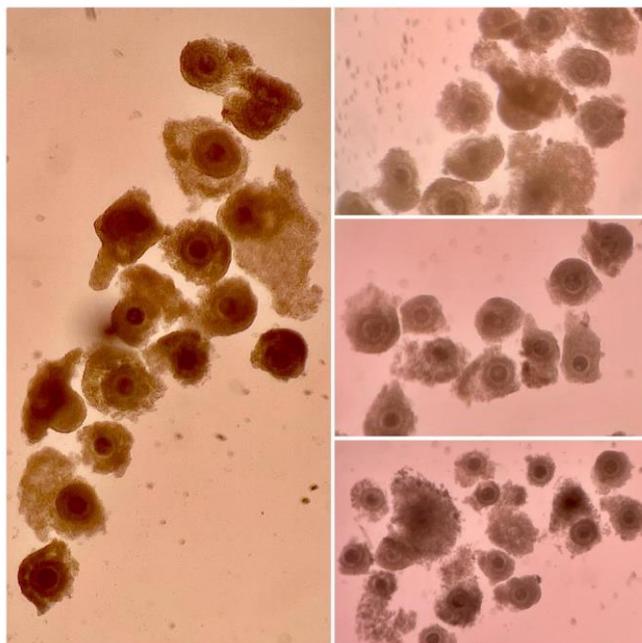
O conteúdo aspirado deve ser transportado ao laboratório para posterior processamento. Seu processamento consiste na lavagem com meio PBS (ou solução fisiológica) acrescido de heparina sódica, antibiótico e soro fetal bovino (SFB), até que esse líquido se torne translúcido. A lavagem é feita em um filtro de colheita de embriões, e o sedimento que sobra no fundo do filtro é depositado em placas de Petri de 90 mm para que posteriormente seja feita a procura e seleção dos

CCOs. Os CCOs selecionados são colocados em criotubos, com meio específico para maturação, cobertos com óleo mineral, para se evitar evaporação do meio, e mudanças bruscas de PH. Esses criotubos são armazenados e transportados até o laboratório, onde será realizado, posteriormente, fecundação e cultivo (SOUZA, 2020; MARIANO et al.,2015).

2.1.1.2 Maturação *In Vitro* (MIV)

Após a coleta, os oócitos ainda não são capazes de passar pelo processo de fertilização e clivagem, pois ainda se encontram em seu estado imaturo (GALLI et al., 2003), na figura 2 são demonstrados complexo cumulus oócitos imaturos. Sendo assim, o gameta feminino ainda precisará passar por várias transformações, tanto em seu núcleo (maturação nuclear), quanto em seu citoplasma (maturação citoplasmática). Após essas transformações, o oócito adquire a capacidade de ser fecundado. Todas essas etapas são denominadas de maturação oócitaria (LOIOLA, 2013). Pode-se dizer que, a maturação oócitaria é a sequência de eventos que ocorrem, desde o estágio de vesícula germinativa até o término da segunda divisão meiótica, formando assim o segundo corpúsculo polar (Blanco et al, 2011 apud Araujo, 2014).

Figura 2 - Complexo cumulus-oócitos imaturos.



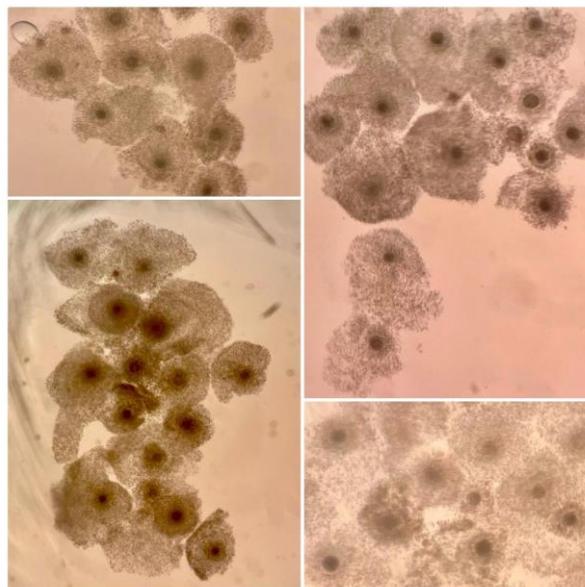
Fonte: Imagens cedidas pela Múltipla Embriões.

Na fêmea bovina, mesmo antes do nascimento, os oócitos que estão presentes nos folículos primordiais, tem a sua fase de divisão meiótica bloqueada e esse bloqueio ocorre na fase de diplóteno da prófase I (ARAUJO, 2014; PFEIFER e FERREIRA, 2015). O que faz que seja inibida a continuação da meiose são fatores inibitórios da meiose como, por exemplo, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Esses fatores inibitórios são produzidos pelas células da granulosa, e agindo juntamente com seus transportadores, são responsáveis pela interrupção da divisão meiótica do oócito. O fator que irá definir a retomada da divisão meiótica do gameta é o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH), que ocorre após a puberdade do animal, em oócitos presentes nos folículos próximos a ovulação. A estimulação desse hormônio (LH) promove a ruptura das junções comunicantes entre as células (KAWAMURA et al., 2004; HURK e ZHAO, 2005; SANCHEZ e SMITZ, 2012).

A maturação do oócito condiz com uma série de mudanças no núcleo e citoplasma do gameta, para que esse adquira sua capacidade fecundante, e assim, se desenvolver até o estágio de blastocisto. A remoção do oócito de dentro do folículo, e a conseqüente retirada do contato com células foliculares, são os principais fatores para que se inicie ao processo de maturação nuclear, então, este sairá da fase de diplóteno da prófase e avançará até a fase de metáfase na meiose II (CROCOMO, 2011; MELLO et al., 2016). Outra importante etapa para que o oócito se torne competente é a maturação citoplasmática, que envolve processos como migração das mitocôndrias para posição perinuclear, acúmulo de grânulos ao longo do oolema e redistribuição das organelas, sendo necessário que todas essas etapas se completem para que ocorra de fato a maturação e o oócito seja capaz de bloquear a polispermia, e com isso o gameta terá competência em ser fertilizado e produzir um embrião saudável (SANCHEZ e SMITZ, 2012; ARAUJO, 2014; MELLO, 2016).

A MIV é um processo que visa mimetizar condições intrafoliculares, de forma mais fidedigna possível, isso é feito com meio de cultivo de tecidos 199 (TCM 199), assim como demonstrado na figura 3. A maturação *in vitro* deve ser realizada em uma atmosfera controlada, que contenha 5% de CO₂, temperatura de 38,5°C por um período de aproximadamente 24 horas após o início da OPU (VARAGO, 2008; MELLO, 2016).

Figura 3 - Complexo cumulus-oócitos maturados.



Fonte: Imagens cedidas pela Múltipla Embriões.

2.1.1.3 Fecundação *In Vitro* (FIV)

A FIV compreende a etapa em que se cultiva os oócitos maturados com espermatozoides, com intuito que esses se fecundem, gerando um zigoto que evoluirá até o estágio de blastocisto (MELLO et al., 2016).

Durante essa etapa é que ocorre a fusão do material genético materno com material genético paterno, e consequente a isso, a formação do zigoto (LANDIM-ALVARENGA, 2017). Para realização da FIV são descongeladas palhetas de sêmen, uma ou mais, a uma temperatura de 36°C, e os espermatozoides viáveis são separados dos mortos, do plasma seminal e dos crioprotetores, principalmente quando se utiliza a técnica de gradiente de concentração com Percoll® (VARAGO et al., 2008). A utilização do gradiente de concentração do Percoll® para capacitação e seleção espermática é um dos métodos mais antigos utilizados para esse fim. Nesse método, o sêmen é depositado sobre duas camadas de densidade diferentes, uma com concentração de 90% e a outra com 45%, sendo que o Percoll® 45% é depositado sobre o Percoll® 90%, e sêmen sobre o Percoll 45%. Esse conteúdo é submetido à centrifugação, assim, os espermatozoides viáveis se depositarão no fundo do tubo formando o pellet. Esse pellet é separado e novamente centrifugado com meio SP-TALP, contudo o objetivo agora é remover o máximo possível do meio Percoll® (GARCÍA-HERREROS, 2014; WRENZYCKI, 2016). Esse método tem sido um dos mais utilizados em rotinas laboratoriais, uma vez que proporciona uma maior

recuperação de espermatozoides móveis e com melhor qualidade, além de ser mais eficaz na remoção de plasma seminal e dos diluentes, presente na palheta de sêmen criopreservado (LEE, 2009). Essa etapa, além de ser essencial para selecionar os espermatozoides, também é importante para a capacitação espermática. A capacitação espermática tem como finalidade, retirar componentes que estão presente no plasma seminal de contato com os espermatozoides, para que estes não sofram incorporações e modificações que os tornam incapazes de fecundar (GONÇALVES et al., 2008; LEEAMANS et al., 2019).

Após o processo de capacitação espermática, os espermatozoides já são capazes de se ligar as glicoproteínas ZP3 presentes na zona pelúcida do oócito e sofrer a reação acrossômica. A reação acrossômica permite a liberação de enzimas que digerem a matriz da zona pelúcida do oócito fazendo com que o espermatozoide sofra um processo de exocitose e se funda com o oócito (LANDIM- ALVARENGA, 2017; GONÇALVEZ et al., 2008).

O período em que se realiza a FIV é de 18 a 22 horas, em temperatura de 38,5°C, atmosfera gasosa com concentração de 5% de CO₂ e umidade saturada a 95%. O meio mais utilizado para o cultivo de oócitos e espermatozoides é o FERT-TALP suplementado com heparina e albumina sérica bovina (BSA) (CORRÊA, 2006; MELLO et al., 2016; SANTOS, 2017).

2.1.1.4 Cultivo *In Vitro* (CIV)

Após a etapa de fecundação origina-se uma estrutura chamada de zigoto, sendo que esse já tem um arranjo citoplasmático diferente das células das quais teve origem. A principal diferença é o fato de ser uma célula diploide, e esse zigoto passará por sucessivas divisões celulares ou clivagens até a formação do blastocisto (MELLO et al., 2016; GONÇALVES, 2008). A etapa de CIV é a última etapa na PIVE e dura aproximadamente 6 dias de cultura, a partir do estágio de zigoto. O principal objetivo dessa etapa é mimetizar, o máximo possível, condições que seriam encontradas *in vivo*. Alguns autores defendem que o período de cultivo pode variar de 7 a 9 dias, sendo que a taxa de blastocisto é avaliada no sétimo dia de cultivo (MELLO et al., 2016; WRENZYCKI, 2016; SANTOS, 2020).

2.1.1.5 Receptoras

Avaliação e seleção das receptoras dos embriões é um dos diversos fatores que estão envolvidos no sucesso de um programa de PIVE. A receptora, para ser considerada apta a receber o embrião, deve passar por algumas avaliações realizadas por um médico veterinário treinado e experiente. Uma das primeiras etapas da avaliação é o exame visual da fêmea que irá receber o embrião, onde se observam condição de escore corporal (ECC), presença de ectoparasitas ou quaisquer outros problemas que podem ser observados na inspeção (DANTAS, 2018), receptoras demonstradas na figura 4. A próxima etapa é a avaliação clínica geral, em que se avalia se os animais não apresentam alterações em sistema locomotor, sistema digestório ou sistema respiratório. Sendo evidenciadas quaisquer alterações em algum desses sistemas, o exame deve ser mais detalhado para que se possa concluir se essa fêmea será incluída ou excluída da lista. O sistema mamário da receptora também deve ser analisado, pois esta deverá oferecer condições de nutrir o futuro bezerro. Fêmeas que possuem tetos muito grandes e pouco parênquima mamário devem ser excluídas da lista. A fase seguinte da avaliação é a realização de exame ultrassonográfico do aparelho reprodutivo, esse procedimento é realizado através da palpação retal, por meio da palpação o profissional poderá obter informações sobre posição da cérvix e a sua conformação, sendo que, cérvix muito tortuosa, com excesso de fibrose, mal posicionada pode dificultar na inovulação do embrião. O tamanho dos ovários e do útero também devem ser observados, do mesmo modo que a qualidade destes. As fêmeas que forem aprovadas para o grupo das receptoras devem estar com os manejos nutricionais e sanitários adequados. O conhecimento da classe de receptoras também deve ser levado em consideração, já que algumas classes necessitam de alguma avaliação específica como é o exemplo de novilhas (núliparas) que só devem ser consideradas aptas quando já estiverem em ciclo estral regular, que pode ser evidenciado pela presença de corpo lúteo na ultrassonografia (FERREIRA, 2019).

Figura 4 - Receptoras de embriões.



Fonte: Imagens cedidas pela Múltipla Embriões.

2.1.2 Homeostase

O processo de homeostase é realizado pelo organismo dos animais na busca de manter o funcionamento normal de todas suas estruturas e tecidos, garantindo assim sua sobrevivência, pois todo organismo recebe grandes influências do meio externo, que acabam, muitas vezes, interferindo no meio interno e fazendo alterações em hormônios e órgãos. Para que a homeostase seja atingida, o organismo utiliza meios como, controle de água, cloreto de sódio, gordura, glicose, entre outros fatores, como por exemplo, controle da pressão arterial, controle da ventilação mecânica e manutenção da temperatura corpórea (DE SOUZA, 2015; BRITO, 2017).

Os bovinos, como todos os dos mamíferos, são homeotérmicos, ou seja, buscam um equilíbrio entre o ganho de calor, pelo processo de termogênese, que se refere à formação metabólica de calor e absorção de calor do ambiente, e a perda de calor pelo processo de termólise, entendida como a forma que o organismo perde calor para o ambiente. Quando atingido o equilíbrio entre termogênese e termólise, e suas funções fisiológicas, metabólicas e comportamentais se encontrarem em pleno funcionamento o animal se encontrara em homeostase orgânica (OLIVEIRA et al., 2012). A temperatura interna que é considerada normal para bovinos varia de 38,0° a 39,5° (DU PREEZ, 2000; FERREIRA et al., 2006).

A homeotermia nos bovinos pode apresentar dois tipos de desequilíbrios, a hipotermia e a hipertermia. Sendo que quando o organismo se encontra em quadro de hipotermia a temperatura corporal se encontra baixa, tendo dificuldade de perda de calor, enquanto, se o animal apresenta quadro de hipertermia, a temperatura corporal se encontra excessivamente elevada, apresentando dificuldade de perda de calor (FERREIRA et al.,2006; DE SOUZA, 2015; ROCHA, 2017).

2.1.2.1 Condições de conforto térmico

A produtividade de um animal se encontra intimamente ligada ao seu estado de homeostasia, com isso, será possível, que o animal converta o alimento em produção quando esse se encontra em conforto e bem-estar, seja o produto carne ou leite, de maneira mais eficiente.

O conforto animal é uma preocupação crescente no Brasil, em virtude do clima predominantemente tropical, com altas temperaturas na maior parte do ano, o que pode favorecer o estresse térmico (BERTONCELLI et al., 2013). SOUZA et al. (2010), sugeriram que, a temperatura é um dos fatores ambientais que interferem expressivamente na produtividade. Alguns autores ainda relatam sobre a existência de uma zona de termoneutralidade, que é uma faixa de temperatura em que os animais não sofrem de estresse, nem pelo frio e nem pelo calor. Sendo assim, nessa situação, o custo fisiológico é mínimo, o aproveitamento de energia proveniente da dieta é excelente e a temperatura corporal se encontra equilibrada (FRIZZO, 2014).

2.1.2.2 Estresse térmico

Estresse térmico calórico é a soma de forças externas que modificam a temperatura corporal, mesmo com o organismo em repouso (LEE, 1965). Pode-se dizer que um animal está em estresse, a partir do momento que ele começa a utilizar uma soma de mecanismos biológicos para se defender de estímulos deletérios a sua integridade, sejam esses estímulos externos ou internos, buscando assim manter sua homeostase. O meio ambiente naturalmente é composto por diversos fatores estressantes, como a temperatura do ambiente (FERREIRA, 2006; OLIVEIRA, 2012).

O estresse térmico ocorre a partir do momento que o animal se encontra em uma situação que a temperatura ultrapassa os limites da termotolerância e o

organismo lança mão de mecanismos termorregulatórios para atingir a homeostase. Estes mecanismos trazem prejuízos ao animal como, por exemplo, ingestão reduzida de alimento, consumo de água mais frequente e em maior quantidade, o período de descanso também se torna maior (FRIZZO, 2014; LIMIRO, 2020).

2.1.2.2.1 Efeitos do estresse térmico no animal

Quando o limite da zona de conforto térmico é ultrapassado ocorre à ativação do aparelho de termorregulação (eixo hipotálamo-hipófise-adrenal) e os processos de perda de calor reduzem sua eficiência se o animal entra em quadro de estresse pelo calor, sendo necessário maior gasto energético para controle da temperatura e manutenção da homeostase (MASTELARO, 2016; OLIVEIRA 2012). Ao entender que estão em uma situação de calor excessivo, células termorreceptoras localizadas na pele, emitem estímulos que são encaminhados a receptores de calor do hipotálamo anterior e a partir disso uma série de eventos ocorrerá na tentativa de regular a temperatura corpórea (DE SOUZA, 2015a). Uma vez que o organismo se percebe em meio a um desconforto térmico, algumas respostas fisiológicas são geradas, e isso culmina em gasto de energia, e respostas como, aumento da frequência respiratória, sudorese aumentada, redistribuição do fluxo sanguíneo (MATARAZZO, 2004; MORAIS, 2008). A ativação do eixo hipotalâmico – hipofisário – adrenal (HHA) ocorre após um estímulo estressante, no caso do estresse térmico essa ativação ocorre como uma forma de regulação térmica, uma vez que os hormônios liberados com a ativação desse eixo contribuem para regulação térmica (ROCHA, 2012). Ao receber o estímulo estressante, o hipotálamo irá liberar um hormônio conhecido como hormônio liberador de corticotrofina (CRH), esse, por sua vez, vai atuar sobre a adenohipófise, fazendo com que essa produza o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e o libere na corrente sanguínea para que no córtex da adrenal estimule a secreção de glicocorticóides, sendo secretado em maior proporção o cortisol na corrente sanguínea (SANTOS, 2013).

2.1.2.2.2 Efeito do estresse térmico sobre a reprodução da fêmea

O ambiente influencia diretamente na reprodução, sendo que a temperatura é um dos principais fatores que determinam ou não sucesso na atividade reprodutiva (LEE et al., 1974). A reprodução é totalmente dependente de controle hormonal que

são sintetizados e secretados pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Para que a reprodução ocorra de forma adequada e dentro do tempo adequado, níveis séricos de hormônios compatíveis devem estar presentes na corrente sanguínea (HAFEZ, 2004; DUKE, 2018). O aumento na atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), devido a condições de estresse, faz com que ocorra uma diminuição na atividade reprodutiva, mostrando que deve haver uma relação com os hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG). Isso porque os hormônios que são sintetizados e liberados em condições de estresse pode afetar a função reprodutiva em três etapas do eixo HHG, no hipotálamo, liberando CRH, inibindo assim a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), conseqüentemente também afetando a hipófise anterior, diminuindo a liberação de hormônios como, FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante), alterando o efeito estimulatório das gonadotrofinas nas gônadas, e prejudicando o desempenho reprodutivo desse animal. A produção de estrógenos é conseqüentemente afetada com a diminuição na liberação de gonadotrofinas (LH e FSH), acarretando em vários transtornos reprodutivos, sendo esses: falhas na detecção de cio devido ao cio silencioso, o desenvolvimento oocitário também estará comprometido, fertilização e implantação do embrião também serão afetadas, uma vez que o útero não estará bem preparado para isso, pois não houve a formação de um corpo lúteo de boa qualidade, e em casos mais extremos, podendo levar ao anestro da fêmea (ROCHA et al., 2012; SANTOS, 2013; DE SOUZA et al., 2015 b).

OLIVEIRA et al. (2012) relataram que a causa da ineficiência reprodutiva ocasionada pelo estresse térmico se dá pelo fato da má formação do corpo lúteo, sendo que, esse não tendo formação adequada, acarretará morte embrionária, pois a principal função do corpo lúteo é a produção e liberação de progesterona para manutenção de tecidos endometriais e manutenção do embrião. Portanto, sua diminuição possibilitará a secreção de hormônios como, a prostaglandina, resultando na lise do corpo lúteo e perda do embrião.

2.2 METODOLOGIA UTILIZADA PELO LABORATÓRIO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Recuperação dos oócitos complexos cumulus-oócitos (CCOs)

Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram obtidos através da aspiração dos folículos ovarianos. A aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick-up* - OPU; aparelho de ultrassonografia equipado com transdutor setorial intravaginal e um dispositivo guia para punção folicular) foi realizada em dia aleatório do ciclo estral. Os folículos foram identificados e puncionados, utilizando agulhas 20 G e uma pressão de vácuo de 80 mmHg. O líquido folicular foi recuperado em tubos cônicos plásticos de 50 mL, contendo solução fisiológica, soro fetal bovino (SFB), heparina sódica e sulfato de amicacina.

Em seguida, os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram separados em um filtro de coleta de embriões, colocados em uma placa de petri e, com o auxílio de um estereomicroscópio, foram selecionados e classificados como viáveis ou não viáveis.

Maturação in vitro

Os CCOs classificados como viáveis foram lavados três vezes em meio TCM 199 com HEPES contendo soro fetal bovino (SFB), piruvato e sulfato de amicacina. Posteriormente, os CCOs foram lavados no meio de maturação e colocados em criotubos contendo meio de maturação coberto com óleo mineral. A maturação do CCOs foi realizada em incubadora portátil a 38,5 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂, e alta umidade, durante 20 a 24 horas.

Preparo de sêmen e Fecundação in vitro

Na etapa de FIV, os CCOs maturados foram transferidos para placas de cultivo celular contendo gotas de meio específico para FIV sob óleo mineral. Em as produções foram utilizados sêmen congelado para a fecundação. As palhetas de sêmen foram descongeladas em água aquecida a 36°C por 30 segundos, e os espermatozoides vivos foram separados dos mortos, do plasma seminal e dos diluentes por meio da técnica de separação espermática por gradiente de densidade. O sêmen depositado por cima do gradiente (45-90%) foi centrifugado a 4.000 rotações por minuto (RPM) durante cinco minutos. Após a centrifugação, o

sobrenadante foi descartado e o “pellet”, formado por espermatozoides viáveis, foi recuperado e diluído em meio de FIV, e centrifugado por 3 minutos a 2.000 RPM.

Após o procedimento de separação espermática, os espermatozoides foram diluídos em meio de FIV até que se atingisse uma concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL, sendo necessário o prévio conhecimento da quantidade de espermatozoides por meio da contagem em câmara de Neubauer e a avaliação de sua motilidade para a realização desse procedimento. Um volume de 5 μ L de espermatozoides diluídos, foi adicionado a cada gota de FIV contendo os CCOs. Os oócitos, bem como as células do *cumulus* expandidas e os espermatozoides foram cultivados por um período de 18 a 22 horas, permitindo que ocorra a fecundação para que se inicie a próxima etapa da PIVE.

Cultivo in vitro

Após a FIV, os prováveis zigotos, juntamente com uma fina camada de células do *cumulus*, foram transferidos para gotas contendo meio de cultivo *in vitro* (CIV) sob óleo mineral. No terceiro dia foi avaliada a taxa de clivagem dos oócitos fecundados.

No terceiro e quinto dia após a FIV, 50% do meio das gotas de cultivo foi renovado (*feeding*).

Depois de sete dias de cultivo após a FIV foi verificada a quantidade de embriões produzidos (blastocistos), sendo estes, classificados de acordo com a Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS). Também foi avaliada a taxa de embriões quando comparados com a quantidade de CCOs submetidos à PIVE.

Envase e transferência dos embriões

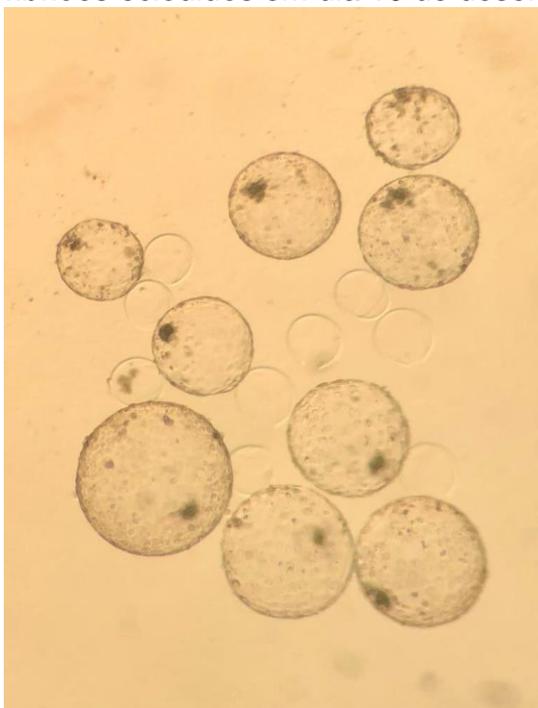
Os embriões foram classificados e envasados em palhetas contendo meio de ENVASE e transportados em um transportador de embriões a 36°C.

Os embriões envasados foram inovulados (transferidos) em receptoras previamente selecionadas e sincronizadas.

Eclosão

No dia 10 do desenvolvimento embrionário, foram verificadas as taxas de eclosão dos embriões remanescentes, assim como demonstrado na figura 5.

Figura 5 - Embriões eclodidos em dia 10 de desenvolvimentos.



Fonte: Imagens cedidas pela Múltipla Embriões.

Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado através de palpação retal com auxílio de aparelho ultrassonográfico, assim como demonstrado na figura 6, entre 30 e 60 dias após a inovulação dos embriões.

Figura 6 - Diagnóstico de gestação.



Fonte: Imagens cedidas pela Múltipla Embriões.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os dados utilizados para este estudo foram obtidos de resultados das produções de quatro propriedades clientes do laboratório comercial de produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos (Múltipla Embriões Ltda.), localizado no município de Ji-Paraná, estado de Rondônia, durante o período de janeiro de 2018 até janeiro de 2021.

Uma vez que, os resultados discutidos pelo presente estudo, são provenientes de dados comerciais obtidos da rotina de um laboratório privado de PIVE bovinos, não foi necessária a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais para a elaboração deste.

Para minimizar as variáveis que poderiam interferir nos resultados, os dados utilizados para a realização deste, foram selecionados de tal forma para que pudesse ficar o mais homogêneo possível. Foram analisados apenas os resultados das PIVEs nas quais foram utilizados apenas a raça Nelore.

Dados meteorológicos

Os dados de temperatura dos dias das OPUs nos municípios de Ji-Paraná-RO, Parecis-RO, Pimenteiras do Oeste-RO e Alta Floresta d'Oeste-RO foram

obtidos no site do Sistema de Monitoramento Agrometeorológico (www.agritempo.gov.br).

Análise estatística

As proporções de produção de embriões e taxa de prenhez foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado.

Para determinação do ponto de corte de temperatura utilizada para determinar os grupos de Maior e Menor temperatura foi utilizada análise de curva ROC (*radio operator receiver*) onde foi calculado a especificidade e sensibilidade do teste em relação à prenhez das receptoras. Para tanto, as receptoras foram categorizadas como de boa resposta (com prenhez maior ou igual a 40%) e como de resposta ruim (com prenhez menor que 40%). Dessa forma foi obtido a temperatura de 33,3°C como ponto ótimo de corte que influencia a prenhez de receptoras, sendo classificadas essas temperaturas como alta (superior a 33,3°C) e baixa (inferior a 33,3°C).

Número de embriões produzidos foi analisado por análise de variância e as médias foram comparadas entre os grupos pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas entre os grupos quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

Foram utilizados dados de quatro propriedades localizadas no estado de Rondônia, entre o período de janeiro de 2018 a janeiro de 2021. Os dados de produção e temperatura máxima no dia da aspiração folicular, e os resultados numéricos das PIVes estão descritos nas tabelas 1, 2, 3 e 4 [ano da OPU, mês da OPU, temperatura máxima no dia da OPU, número de CCOs viáveis recuperados, número de embriões viáveis no dia 7 do desenvolvimento, número de embriões viáveis no dia 10 do desenvolvimento, porcentagem (%) de embriões viáveis no dia 7 do desenvolvimento em relação ao número de CCOs viáveis, porcentagem (%) de embriões viáveis no dia 10 do desenvolvimento em relação ao número de CCOs viáveis, número de embriões inovulados (transferidos - TE), número de prenhezes confirmadas, porcentagem de prenhezes (número de gestações confirmadas em relação ao número de embriões inovulados)].

Tabela 1 - Dados das PIVEs realizadas na propriedade no município de Ji-Paraná – RO.

ano	mês	temp	CCOs	emb	emb	%	%	emb	DG	%
OPU	OPU	máx	viáveis	D10	D7	emb	emb	TE		prenhez
		°C				D7	D10			
2018	1	29,63	198	108	96	48%	55%	-	-	-
2018	9	33,86	278	170	158	57%	61%	78	45	58%
2018	11	29,35	374	222	183	49%	59%	110	57	52%
2019	11	28,91	265	142	142	54%	54%	70	35	50%
2020	1	31,13	292	145	133	46%	50%	59	30	51%
2020	2	28,36	-	-	-	-	-	75	39	52%
TOTAL			1407	787	712	51%	56%	317	167	53%

Tabela 2 - Dados das PIVEs realizadas na propriedade no município de Parecis – RO.

ano	mês	temp	CCOs	emb	emb	%	%	emb	DG	%
OPU	OPU	máx	viáveis	D10	D7	emb	emb	TE		prenhez
		°C				D7	D10			
2018	10	31,89	191	122	121	63%	64%	-	-	-
2018	11	26,11	242	134	120	50%	55%	64	31	48%
2019	10	33,25	277	117	109	39%	42%	74	34	46%
2019	11	30,67	80	30	23	29%	38%	23	9	39%
2020	10	34,09	483	182	163	34%	38%	101	35	35%
2020	11	32,76	284	154	144	51%	54%	75	37	49%
2020	12	30,44	528	259	216	41%	49%	70	35	50%
TOTAL			2085	998	896	43%	48%	407	181	44%

Tabela 3 - Dados das PIVEs realizadas na propriedade no município de Pimenteiras do Oeste – RO.

ano	mês	temp	CCOs	emb	emb	%	%	emb	DG	%
OPU	OPU	máx	viáveis	D10	D7	emb	emb	TE		prenhez
		°C				D7	D10			
2018	1	30,06	142	57	57	40%	40%	44	17	39%
2018	9	29,12	262	144	131	50%	55%	68	37	54%
2018	11	29,29	185	93	86	46%	50%	57	23	40%
2019	11	31,09	232	99	91	39%	43%	52	28	54%

2020	1	27,76	182	137	118	65%	75%	-	-	-
2020	9	34,60	251	99	99	39%	39%	75	32	43%
2020	10	37,86	332	150	139	42%	45%	91	38	42%
2020	10	37,30	383	206	177	46%	54%	72	31	43%
TOTAL			1969	985	898	46%	50%	459	206	45%

Tabela 4 - Dados das PIVEs realizadas na propriedade no município de Alta Floresta d'Oeste – RO.

ano	mês	temp	CCOs	emb	emb	%	%	emb	DG	%
OPU	OPU	máx	viáveis	D10	D7	emb	emb	TE		preñez
		°C				D7	D10			
2020	10	34,82	479	167	124	26%	35%	104	57	55%
2020	12	31,19	489	374	276	56%	76%	94	55	59%
2021	1	26,42	374	180	144	39%	48%	91	54	59%
TOTAL			1342	721	544	41%	54%	289	166	57%

De acordo com as tabelas 5 e 6, e os gráficos 1 e 2, foi possível verificar que houve diferenças estatísticas nas taxas de embriões nos dias 7 e 10 do desenvolvimento, em que as aspirações foram realizadas em dias em que as temperaturas máximas eram baixas (< 33,3°C) ou altas (> 33,3°C).

Tabela 5 - Taxas de embriões em porcentagem (%) no dia 7 do desenvolvimento (D7) em relação à temperatura máxima no dia da OPU.

Temperatura máxima no dia da OPU	Número de CCOs viáveis	Número de embriões no D7	% embriões D7 (emb. D7 / CCOs viáveis)	Valor de P
Baixa (< 33,3°C)	4320	2081	48,17%	<0.001
Alta (> 33,3°C)	2483	969	39,03%	

Tabela 6 - Taxas de embriões em porcentagem (%) no dia 10 do desenvolvimento (D10) em relação à temperatura máxima no dia da OPU.

Temperatura máxima no dia da OPU	Número de CCOs viáveis	Número de embriões no D10	% embriões D10 (emb. D10 / CCOs viáveis)	Valor de P
Baixa (< 33,3°C)	4320	2400	55,56%	<0.001
Alta (> 33,3°C)	2483	1091	43,94%	

Da mesma forma, também foram observadas diferenças significativas nas taxas de prenhez, nas quais as aspirações foram efetuadas em dias em que as temperaturas máximas eram baixas ($< 33,3^{\circ}\text{C}$) ou altas ($> 33,3^{\circ}\text{C}$) (tabela 7 e gráficos 1 e 2).

Tabela 7 - Taxas de prenhez (número de gestações em relação ao número de inovulações) em relação à temperatura máxima no dia da OPU.

Temperatura máxima no dia da OPU	Número Embriões inovulados - TE	Número Prenhez confirmadas	% Prenhez (prenhez / TE)	Valor de P
Baixa ($< 33,3^{\circ}\text{C}$)	952	487	51,16%	0,01
Alta ($> 33,3^{\circ}\text{C}$)	595	272	45,71%	

Gráfico 1 - Números de embriões nos dias 7 e 10 do desenvolvimento e de prenhez (gestações), em relação à temperatura máxima (baixa ou alta) no dia da OPU

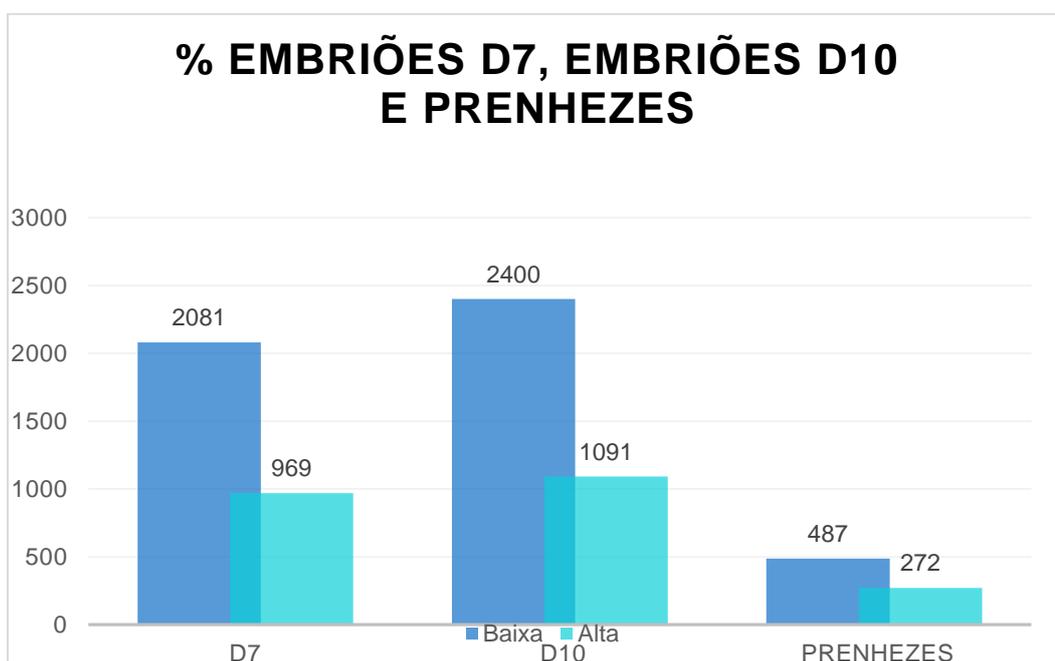
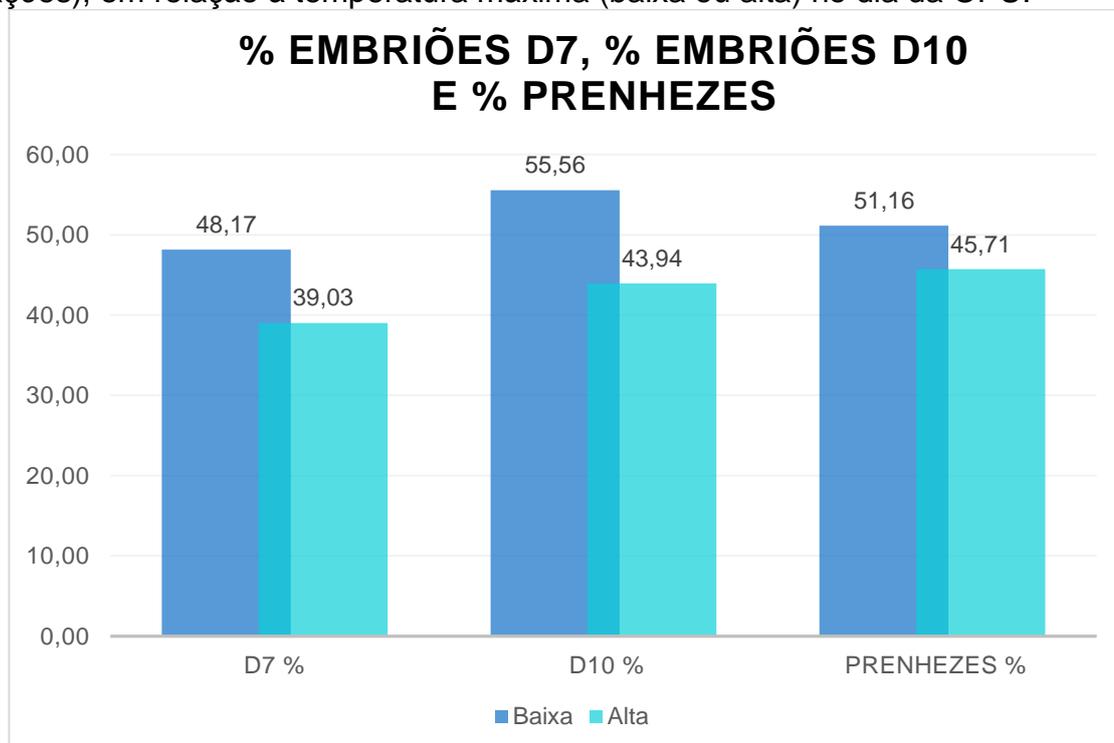


Gráfico 2 - Taxas de embriões nos dias 7 e 10 do desenvolvimento e de prenhez (gestações), em relação à temperatura máxima (baixa ou alta) no dia da OPU.



5 DISCUSSÃO

Animais que se encontram em estresse térmico sofrem consideráveis alterações comportamentais e fisiológicas na tentativa de manter a homeostase corpórea (WOLFENSON & ROTH, 2018). Segundo FERREIRA et al. (2010), o estresse térmico afeta diretamente o crescimento folicular e isso tem influência sobre a qualidade do oócito. O estresse térmico contribuiu para alteração na secreção dos hormônios na corrente sanguínea, aumentando a secreção de cortisol e a diminuindo de estradiol (WOLFENSON & ROTH, 2018).

GARCIA et al. (2015) relatam que o aumento sérico do cortisol tem impactos no consumo de alimento e ingestão de água, diminuindo a quantidade consumida e ingerida, além disso, há um aumento considerável na sudorese e em consequência disso perda de nutrientes essenciais, levando a uma queda na qualidade oocitária e consequentemente na capacidade desses oócitos se desenvolverem até embriões. Isso ficou evidenciado no gráfico 2 e nas tabelas 5 e 6, onde a porcentagem de

embriões em D7 e D10 mostraram diferenças significativas em dias que as OPUs foram realizadas em temperaturas mais altas ($> 33,3^{\circ}\text{C}$).

O estresse calórico é um fator prejudicial para desenvolvimento embrionário, acarretando baixas taxas de sobrevivência de embriões bovinos (SILVA et al., 2013). AMARAL et al (2019) descreveram que o número de embriões procedentes de oócitos que passaram por estresse térmico foi menor que aqueles que não sofreram essa variação, deixando em evidência que oócitos que passaram por estresse térmico têm uma menor capacidade de se desenvolverem até embrião, corroborando com os resultados do gráfico 2 e das tabelas 5 e 6.

Entretanto, CORDEIRO (2017) não observou em seu estudo no estado do Acre durante os anos de 2014 a 2016, diferenças relevantes nas taxas de embriões *in vitro* da raça Nelore nos meses mais quentes.

O estresse térmico prejudica diversos processos reprodutivos, incluindo competência oocitária, crescimento embrionário, secreção de gonadotrofina, esteroidogênese do crescimento folicular ovariano, desenvolvimento do corpo lúteo e respostas endometriais uterinas (WOLFENSON & ROTH, 2019).

HANSEN et al (2019), em suas pesquisas, também tiveram resultados semelhantes aos desse estudo, mostrando que em dias mais frios, a taxa de prenhez foi maior que em dias mais quentes, principalmente quando se utilizava embriões proveniente de PIVE, e quando esses embriões haviam passado por um processo de vitrificação, esses resultados eram ainda mais expressivos.

Na tabela 7 e no gráfico 2, foi observada a influência que a alta temperatura tem sobre a taxa de prenhez (%), uma vez que em temperaturas mais altas, as porcentagens foram expressivamente mais baixas. CORDEIRO et al (2019) também obtiveram resultados de prenhez mais baixos em períodos mais quentes do ano no estado do Acre. ANDRADE (2019) também constatou que a taxa de concepção dos embriões bovinos de leite inovulados nos períodos frios foi maior quando comparada aos períodos quentes.

6 CONCLUSÃO

Foi observado que temperaturas diárias máximas altas ($> 33,3^{\circ}\text{C}$) influenciaram nos resultados, causando uma diminuição da produção de embriões *in vitro*, o que conseqüentemente, afetou a porcentagem de prenhez de bovinos da raça Nelore.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, Carolina S. et al. Heat stress on oocyte or zygote compromises embryo development, impairs interferon tau production and increases reactive oxygen species and oxidative stress in bovine embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 8, p. 899-909, 2020.

ARAUJO, Michelle et al. Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese à maturação in vitro. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, 2014.

BERTONCELLI, P.; Martin, T. Conforto térmico alterando a produção leiteira. Santa maria: Universidade Federal de Santa Maria, escola de Agronomia; 2013.

BRITO, Ivana; HADDAD, Hamilton. A formulação do conceito de homeostase por Walter Cannon. **Filosofia e História da Biologia**, v. 12, n. 1, p. 99-113, 2017.

C.F. Silva, E.S. Sartorelli, A.C.S. Castilho, R.A. Satrapa, R.Z. Puelker, E.M. Razza, J.S. Ticianelli, H.P. Eduardo, B. Loureiro, C.M. Barros. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology* 79, 351–357, 2013.

CORDEIRO, A. L. L. et al. Influence of temperature-humidity index on conception rate of Nelore embryos produced in vitro in northern Brazil. **Tropical animal health and production**, p. 1-6, 2019.

CORDEIRO, Andrey Luiz Lopes. **INFLUÊNCIA DE ALTAS TEMPERATURAS AMBIENTAIS NA TAXA DE GESTAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES NELORE PRODUZIDOS IN VITRO NO ESTADO DO ACRE**. 2017. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Acre, Acre, 2017.

CORRÊA, G. A. **Tensão de oxigênio durante o cultivo in vitro de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo**. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) –Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2006.

CROCOMO, Leticia Ferrari et al. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, p. 542-552, 2011.

Dantas, Kolowyskys Silva de Alencar, et al. "Seleção de receptoras em um programa de transferência de embriões (PIVE) em bovinos no nordeste do Brasil." **Ciência Animal**. (2018): 3-16.

David Wolfenson and Zvi Roth. Impact of heat stress on cow reproduction and Fertility. *Animal Frontiers*, Volume 9, Issue 1, January 2019, Pages 32-38.

DE SOUZA, Bonifácio Benicio et al. Termorregulação em ruminantes. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 2, p. 39-46, 2015a.

DE SOUZA, Bonifácio Benicio. INFLUÊNCIA DO ESTRESSE CALÓRICO NA FISILOGIA HORMONAL DE BOVINOS. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, v. 11, n. 2, p. 34-38, 2015.

DE SOUZA, Bonifácio Benicio. INFLUÊNCIA DO ESTRESSE CALÓRICO NA FISILOGIA HORMONAL DE BOVINOS. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, v. 11, n. 2, p. 34-38, 2015b.

DE SOUZA, Natielly Sampaio; ABADE, Cristiane Caroline. Produção in vitro de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**, v. 1, n. 3, p. 95-108, 2019.

DU PREEZ, J. H. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. 2000.

FERREIRA, F. et al. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 732-738, 2006.

FERREIRA, Lucas da Costa. Seleção de receptoras de embriões nas espécies bovina e equina: **revisão de literatura**. 2019.

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. In: REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), XXIV, 2010, Porto de Galinhas, PE. **Anais...** 2010. P.49-58.

FRIZZO, Aline Cristina. **Semiconfinamento com a utilização de sombreamento e sua influência no conforto térmico de bovinos de corte**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

GALLI, C., DUCHI, R., CROTIL, G. Et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GARCIA, Alejandra Barrera et al. Relationships between heat stress and metabolic and milk parameters in dairy cows in southern Brazil. **Tropical animal health and production**, v. 47, n. 5, p. 889-894, 2015.

GARCÍA-HERREROS, Manuel; LEAL, Claudia LV. Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 60, n. 6, p. 338-347, 2014.

GONÇALVES, Paulo Bayard Dias. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

HANSEN, Peter J. Genetic variation in resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 1, p. 22-30, 2015.

HONORATO, Marília Torres et al. Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos. **PUBVET**, v. 7, p. 1870-1980, 2013.

HURK, V. D. R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 06, p. 1717-1751, 2005.

KAWAMURA, K.; KUMAGAI, J.; SUDO, S.; CHUN, S. Y.; PISARSKA, M.; MORITA, H.; TOPPARI, J.; FU, P.; WADE, J. D.; BATHGATE, R. A. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 19, p. 7323-7328, 2004.

LANDIM-ALVARENGA, F. C. Fecundação e Clivagem. IN: PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 01-16.

Lee JA, Roussel JD, Beatty JF. Effect of temperature season on bovine adrenal cortical function, blood cell profile, and milk production. *J Dairy Sci*, v.59, p.104-108, 1974.

LEE, D. H. K. Climatic stress indices for domestic animals. **International Journal of Biometeorology**, v. 9, n. 1, p. 29-35, 1965.

LEE, Hae-Lee et al. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal of veterinary science**, v. 10, n. 3, p. 249, 2009.

LEEMANS, Bart et al. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species?. **Reproduction**, v. 157, n. 5, p. R181-R197, 2019.

LIMIRO, Wiviane Borges. Influência do estresse térmico na reprodução de bovinos. 2020.

LOIOLA, Marcus Vinícius Galvão et al. Validação de um programa de produção in vitro de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 93-101, 2014.

MARIANO, MV MSc Renata Sitta Gomes et al. ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM RUMINANTES–REVISÃO DE LITERATURA. 2015

MASTELARO, Ariadne Pegoraro et al. Parâmetros fisiológicos e tricológicos na avaliação do conforto térmico em bovinos de corte. 2016.

MATARAZZO, S. V. Eficiência do sistema de resfriamento adiabático evaporativo em confinamento do tipo freestall para vacas em lactação. Tese de Doutorado. São Paulo, 2004.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte-MG, v.40, n.2, p.58-64, 2016

MORAIS, Débora Andréa Evangelista Façanha et al. Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 538-545, 2008.

NAVES, André Coelho et al. Influência do ambiente na qualidade de oócitos, produção in vitro de embriões e na taxa de prenhez em taurinos, zebuínos e adaptados. 2020.

OLIVEIRA, Marivaldo da Silva; TIBURCIO, Mateus; FERREIRA, Solange Gomes Colhado. **INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE A REPRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE**. 2012.

PENITENTE FILHO, Jurandy Mauro. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS IN VIVO E IN VITRO. 2011. 22 f. Monografia (Especialização) - Curso de Medicina Veterinária, UFV, Viçosa, 2011.

PFEIFER, L. F. M.; FERREIRA, R. **Ginecologia e ultrassonografia reprodutiva em bovinos**. Brasília: Embrapa, 2015. 167 f.

ROCHA, D. R. et al. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 18-24, 2012.

ROCHA, D. R. et al. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 18-24, 2012.

ROCHA, N. C. Termorregulação nos animais. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense, 2017.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, n. 12, p.1896-1912, 2012.

SANTOS, C. A. **Avanços da produção in vitro de embriões bovinos**. 2017. 39 f. Monografia (Graduação em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha. 2017.

SANTOS, C. A. **Avanços da produção in vitro de embriões bovinos**. 2017. 39 f. Monografia (Graduação em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha. 2017.

SANTOS, K. J. G.; SANTOS, A. P. P.; COSTA, M. A.; SILVA, L. S.; FERRO, D. A. D.; DIB, R. T. Efeito do estresse sobre os processos reprodutivos em fêmeas bovinas. Londrina: Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia; 2013.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.

SEGNALINI, Maria et al. Temperature humidity index scenarios in the Mediterranean basin. *International journal of biometeorology*, v. 57, n. 3, p. 451-458, 2013.

SENEDA, M. M. et al. Aspiração folicular in vivo: metodologias, eficiência e seqüelas. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. 2005. p. 1-9.

SILVA, Natieli Andrade da. **Influência da estação do ano, do desenvolvimento embrionário e raça do embrião na taxa de concepção de embriões produzidos in vitro em vacas leiteiras de alta produção**. 2019. Tese de Doutorado. Brasil.

SOUZA, Lázara Caroliny. PIVE E IATF APLICADAS À REPRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE. 2020.

SOUZA, R.; SANTOS, G. T.; VALLOTO, A. A.; et al. Produção e qualidade do leite de vacas da raça Holandesa em função da estação do ano e ordem de parto. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**. v.11, n.2, p.484-495, 2010.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev. Bras. Reprod. Anim, Belo Horizonte**, v. 36, p. 100-109, 2008.

VIANA, João Henrique Moreira; FIGUEIREDO, Ana Cristina Silva; SIQUEIRA, Luiz Gustavo Bruno. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction (AR)**, v. 14, n. 3, p. 476-481, 2018.

VIGNERON, C.; NUTTINCK, F.; PERREAU, C.; REINAUD, P.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P. Effect of roscovitine, a cdk1 inhibitor, and of the presence of oocyte on bovine *cumulus* cell expansion and cyclooxygenase-2 expression. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, n. 01, p. 114-21, 2003.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 535-547, 2000.

WOLFENSON, David; ROTH, Zvi. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 32-38, 2019.

WRENZYCKI, C. Sistemas de cultivo *in vitro*: Quão longe estamos das condições ideais? **Anais...** 30, 2016., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016, p. 155-159.