

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**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**

NATIELI ANDRADE DA SILVA

VILA VELHA
AGOSTO / 2019

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**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**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, sob a orientação do professor Dr. Mauricio Gomes Favoreto, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

NATIELI ANDRADE DA SILVA

VILA VELHA
AGOSTO / 2019

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S586i 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 / Natieli Andrade da Silva.
– 2019.
47 f.; il.

Orientador: Mauricio Gomes Favoreto.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Vila
Velha, 2019.
Inclui bibliografias.

1. Bovinos - fatores climáticos. 2. Bovinos de leite. 3.
Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. 3. Embriologia. 4. Gado -
reprodução. I. Favoreto, Mauricio Gomes. II. Universidade Vila
Velha. III. Título.

CDD 637.125

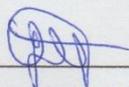
NATIELI ANDRADE DA SILVA

**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**

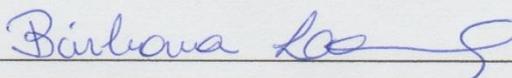
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciência
Animal, para a obtenção do grau de Mestra
em Ciência Animal.

Aprovada em 28 de agosto de 2019,

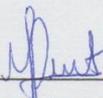
Banca Examinadora:



Profa. Dr. Otavio Luiz Fidelis Junior (IES)



Prof. Dra. Bárbara Loureiro (UVV)



Profa. Dr. Mauricio Gomes Favoreto (UVV)

Orientador

“Aceite com sabedoria o fato de que o caminho está cheio de contradições. Há momentos de alegria e desespero, confiança e falta de fé, mas vale a pena seguir adiante.”

(Paulo Coelho)

Dedicatória: À minha família que
sempre me ensinou a correr atrás dos meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por sempre me guiar e manter de pé, mesmo quando eu não me sentia capaz. Aos meus pais, Aparecida e Silvio, ao meu irmão Gustavo e minha avó Therezinha por sempre estarem me incentivando e apoiando, colocando meus sonhos sempre em primeiro lugar. Ao meu grande amor Adilson, por não só está presente em todos os momentos, mas por tolerar todos os momentos ao meu lado, mesmo os ruins, e por sempre me incentivar em buscar sempre mais. Meu amor por vocês não tem medida, minha vida só faz sentido com vocês.

Em especial a minha “eterna princesa” Avó Laurita, a quem eu sempre me dediquei e retornava ansiosa ao seu encontro “Eu te Amo”.

Aos meus amigos Eduarda, Geovane e Fernanda, que foram fundamentais nessa etapa.

Ao meu orientador Dr. Mauricio Gomes Favoreto, pela paciência e dedicação comigo durante todo esse tempo, agradeço imensamente por seus conhecimentos.

Agradeço a toda a equipe da Fiore® pela disposição em especial ao Marcos Corteletti pela contribuição.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) por conceder a bolsa de mestrado, pois sem ela seria impossível a realização da pesquisa. Edital FAPES/CAPES nº 07/2017-PROCAP-Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
1.INTRODUÇÃO.....	2
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES.....	4
2.1.1 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	4
2.1.2 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i>	4
2.2 RAÇAS.....	5
2.3 FATORES QUE AFETAM A TAXA DE CONCEPÇÃO NA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES ...	6
2.3.1 ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	6
2.3.2 ESTRESSE TÉRMICO.....	10
2.3.3 CRIOPRESERVAÇÃO.....	13
2.3.4 RECEPTORAS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GRANJAS LEITEIRAS.....	14
3.2 CARACTERIZAÇÃO CLIMÁTICA.....	14
3.3 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	14
3.4 SINCRONIZAÇÃO DAS RECEPTORAS E INOVULAÇÃO DOS EMBRIÕES.....	15
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5. CONCLUSÃO.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mórula inicial (dia 4-5) -13 a mais de 32 blastômeros -até 16 células consegue-se boa separação mecânica - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.....	7
Figura 2 - Mórula (dia 6) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.....	7
Figura 3 - Blastocisto inicial (dia 7) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.....	8
Figura 4 - Blastocisto (dia -7-8) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.....	8
Figura 5 - Blastocisto expandido (dia 8-9) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007....	9
Figura 6 - Blastocisto eclodido (dia 9) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.....	9
Figura 7 - Blastocisto eclodido/expandido (dia 9-10) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.....	10
Figura 8 - Taxa de concepção dos embriões inovulados em vacas leiteiras em lactação nos períodos quente e frio durante os anos de 2014 a 2018.	18
Figura 9 - Taxa de concepção dos embriões que foram inovulados criopreservados ou frescos em vacas leiteiras em lactação nos períodos quente e frio durante os anos de 2014 a 2018.....	18
Figura 10 - Taxa de concepção dos embriões inovulados nos estágios de mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido em vacas leiteiras em lactação no período frio.....	20
Figura 11 - Taxa de concepção dos embriões inovulados nos estágios de mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido em vacas leiteiras em lactação no período quente.	21
Figura 12 – Taxa de concepção dos embriões inovulados em vacas leiteiras com embriões de diferentes graus de sangue.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Variáveis fisiológicas e dos níveis de estresse térmico (PIRES & CAMPOS, 2004).....	11
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

MO	Mórula
BI	Blastocisto inicial
BL	Blastocisto
BX	Blastocisto expandido
BE	Blastocisto eclodido
TETF	Transferência de embrião em tempo fixo
D0	Dia zero
D9	Dia nove
D18	Dia dezoito
PIVE	Produção in vitro de embriões
TE	Transferência de embriões
MC	Mórula compacta
SFB	Soro fetal bovino
MCI	Massa celular interna
MIV	Maturação in vitro
CIV	Cultivo in vitro
FIV	Fecundação in vitro
ET	Estresse térmico

RESUMO

SILVA, NATIELI ANDRADE, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, agosto de 2019. **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.** Orientador: Prof. Dr. Mauricio Gomes Favoreto.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estágio de desenvolvimento embrionário, a raça do embrião e a criopreservação na taxa de concepção de embriões produzidos *in vitro* em vacas leiteiras nos períodos quente e frio do ano. Os dados das transferências dos embriões foram coletados no período de 2014 a 2018 de três granjas leiteiras com 900 vacas em lactação com produção média de 26 Kg de leite das raças girolando; holandesa; 1/2 holandesa; 3/4 holandesa; 5/8 holandesa; 7/8 holandesa. Para caracterização climática dos períodos quente e frio foram observadas as temperaturas médias mensais durante os anos de 2008 a 2015 das cidades em que estavam localizadas as granjas leiteiras através dos dados encontrados no site do INCAPER (Assistência Técnica e Extensão Rural). Para o período frio foram considerados os meses de maio, junho, julho e agosto e para o período quente foram considerados os meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro. No período de avaliação foram inovulados um total de 1636 embriões nos estágios de mórula (MO), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE), sendo que 1098 embriões foram inovulados no período frio e 538 no período quente. Do total de embriões inovulados, 1134 foram transferidos à fresco e 502 foram transferidos embriões que passaram pelo processo de criopreservação. Todas as receptoras foram sincronizadas para a transferência de embrião em tempo fixo (TETF), com o seguinte protocolo: No dia 0 (D0) - implante de progesterona (1g ou 500 mg) aplicação de 2 mg benzoato de estradiol intramuscular (IM). Após 9 dias no dia 9 (D9) o implante foi retirado, e então administrado 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) IM e 1,0 mg cipionato de estradiol IM e 0,3 mg de d-cloprostenol (análogo de prostaglandina F2 α) IM. A inovulação dos embriões foi realizada no dia 18, mediante a avaliação das receptoras sendo considerados aptos os animais com presença do corpo lúteo. Os dados obtidos na pesquisa foram analisados por regressão logística pelo procedimento LOGISTIC do SAS (SAS para Windows, Versão 9.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A taxa

de concepção dos embriões inovulados no período frio foi maior quando comparado ao período quente (41,3 % vs. 24,2 %; $P = 0,02$). Em relação á criopreservação, embriões que passaram por criopreservação, apresentaram taxa de concepção menor quando comparados a embriões inovulados à fresco (30,1 % vs. 38,7 %; $P = 0,02$). Em relação ao estágio de desenvolvimento embrionário, não houve diferença significativa entre a taxa de concepção no período frio, mas no período quente os estágios de BL e BX foram maiores ($P < 0,05$) quando comparados aos estágios de mórula, blastocisto inicial e blastocisto eclodido. É possível verificar que tanto o período quente do ano quanto a criopreservação de embriões diminuem a taxa de concepção em vacas leiteiras de alta produção. Além disso, os estágios de BL e BX apresentaram melhores taxa de concepção no período quente. Isso pode ser utilizado como estratégia de melhorar os índices reprodutivos em períodos mais quentes do ano em que o animal pode estar sob estresse térmico.

Palavras-chave: estresse térmico, criopreservação, taxa de concepção.

ABSTRACT

SILVA, NATIELI ANDRADE, M.Sc, University Vila Velha – ES, agosto 2019. **INFLUENCE OF THE YEAR SEASON, EMBRYONIC DEVELOPMENT AND EMBRYO BREED ON CONCEPTION RATE OF IN VITRO EMBRYO OF HIGH PRODUCTION DAIRY COWS.**

Orientador: Mauricio Gomes Favoreto.

This study aimed to evaluate the effects of the embryonic development stage, the embryo breed and cryopreservation on the conception rate of embryos produced *in vitro* in dairy cows in the warm and cold periods of the year. Embryo transfer data were collected from 2014 to 2018 from three dairy farms with 900 lactating cows with an average production of 26 kg of milk from the Girolando Breed; 1/2 Holstein; 3/4 Holstein; 5/8 Holstein; 7/8 Holstein. For climatic characterization of the warm and cold periods, the average monthly temperatures were observed during the years 2008 to 2015 in the cities where the dairy farms were located through the data found on the INCAPER website (Capixaba Institute of Research, Technical Assistance, and Rural Extension). For the cold period were considered the months of May, June, July, and August and for the warm period were considered the months of November, December, January, and February. In the evaluation period, a total of 1636 embryos were inoculated in the stages of morula (MO), initial blastocyst (BI), blastocyst (BL), expanded blastocyst (BX) and hatched blastocyst (BE), with 1098 embryos being inoculated in the cold period and 538 in the warm period. Of the total of inoculated embryos, 1134 were transferred fresh and 502 were transferred embryos that went through the cryopreservation process. All recipients were synchronized for fixed-time embryo transfer (FTET), with the following protocol: On day 0 (D0) - progesterone implant (1g or 500 mg) application of 2 mg intramuscular estradiol benzoate (IMA) After 9 days on day 9 (D9), the implant was removed and then, it was administered 300 IU equine chorionic gonadotropin (eCG) and 1.0 mg of estradiol cypionate IM and 0.3 mg of d-cloprostenol (prostaglandin analog F2 α). The embryo inoculation was performed on the 18th day, through an evaluation of the recipients, considering the animals with the corpus luteum. The data obtained in the survey were analyzed by logistic regression by the SAS procedure LOGISTIC (SAS for Windows, version 9.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Regarding cryopreservation, embryos that underwent

cryopreservation, presented a lower conception rate when compared to embryos freshly inoculated (30.1% vs. 38.7%; $P = 0.02$). Regarding the embryonic development stage, there was no significant difference between the conception rate in the cold period, but in the warm period the BL and BX stages were higher ($P < 0.05$) when compared to the morula, initial blastocyst and hatched blastocyst. It was found that the warm period of the year and the cryopreservation of embryos decrease the conception rate in high-producing dairy cows. In addition, the BL and BX stages showed better conception rates in the hot period. This can be used as a strategy to improve reproductive rates in warmer periods of the year when the animal may be under thermal stress.

Keywords: heat stress, cryopreservation, conception rate.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da produção da pecuária brasileira nos últimos anos está diretamente relacionado com o uso de biotecnologias reprodutivas, as quais vem sendo aprimoradas com o principal objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos, e com isso, aumentar o número de descendentes de maior valor genético. Dentre várias biotecnologias reprodutivas, atualmente se destaca a produção *in vitro* de embriões (PIVE) que consiste em manipular os gametas masculino e feminino em laboratório, para a formação de um novo indivíduo, de forma semelhante ao que ocorre naturalmente (SCANAVEZ et al., 2013), sendo então os embriões usados para transferência de embriões (TE) (MELLO et al., 2016).

O país passou de referência regional nos anos de 1990, para maior produtor mundial entre os anos de 2012 e 2013, tornando-se líder no uso da PIVE e definindo tendências que seriam observadas nos anos subsequentes em diversos países (VIANA e GONÇALVES., 2019). A popularidade da PIVE no Brasil se deve principalmente a utilização em sua grande maioria em animais zebuínos, principalmente animais da raça Nelore, e conseqüente maior número de oócitos coletados e embriões produzidos por aspiração/doadora (PONTES et al., 2010; VIANA et al., 2012; VIANA e GONÇALVES., 2019). Isso contribuiu decisivamente para reduzir o custo das gestações produzidas por PIVE, compensando a baixa eficiência da técnica no passado (FABER et al., 2003; WATANABE et al., 2017; VIANA e GONÇALVES., 2019) e viabilizando seu uso por um número crescente de produtores.

Apesar da popularidade crescente desta técnica, alguns fatores alteram o resultado no desempenho, entre eles os fisiológicos e nutricionais (LUCY, 2001), bem como o estresse térmico (HANSEN, 2009).

A alta temperatura da maioria dos ambientes tropicais, assim como no Brasil, pode afetar os processos reprodutivos diretamente e indiretamente. Nas fêmeas o estresse térmico gera retardamento da maturidade sexual, interferência na fertilidade do oócito e na implantação do embrião no útero, interrupção da concepção, entre outros (MEDEIROS e VIEIRA, 1997). O estresse térmico altera o perfil de secreção dos hormônios, bem como os constituintes do sangue provocando mudanças em todos os sistemas. (INGRAHAM et al., 1979).

No desenvolvimento folicular, o estresse térmico altera a dinâmica do crescimento folicular aumentando a duração da dominância do folículo pré-ovulatório, diminuição da capacidade esteroidegênica do folículo por menor atividade da aromatase nas células da granulosa com menor produção do estrógeno (LEW et al., 2006). Essa alteração da dinâmica folicular resulta em produção de oócitos com menor capacidade de fertilização, e caso haja a fertilização, os embriões passam a ter desenvolvimento anormal (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 estágio de desenvolvimento embrionário tem influência direta na taxa de concepção, pois ele permite saber se existe ou não chance de sobrevivência embrionária (SAHA et al., 1996; GEORGE et al., 2008). Os estágios de desenvolvimento avançado como os blastocistos são considerados ideais para obtenção de maiores taxas de concepção (SENGER, 2003; SCANAVEZ et al., 2013; VELOSO NETO et al., 2014), enquanto os estágios poucos desenvolvidos como mórulas e blastocistos iniciais tendem a apresentar menores taxas de concepção (FONSECA et al., 2001).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estágio de desenvolvimento embrionário, a raça do embrião e a criopreservação na taxa de concepção de embriões produzidos *in vitro* em vacas leiteiras de diversos graus de sangue nos períodos quente e frio do ano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de embriões

São diversas às biotécnicas utilizadas na reprodução de bovinos, dentre elas estão a inseminação artificial; transferência de embriões; criopreservação de gametas e de embriões; sexagem espermática; superovulação; produção e fertilização *in vitro* de embriões, entre outras. Com os avanço das tecnologias no decorrer das décadas a criação e colheita dos embriões para melhor aproveitamento do desempenho genético das raças cresceram, a fim de, determinar o aumento do potencial que se deseja para leite ou corte (VIEIRA, 2012).

2.1.1 Transferência de embriões

A transferência de embriões (TE) é uma técnica amplamente utilizada em todo o mundo, com uma produção média de 500.000 embriões bovinos transferidos por ano (HASLER, 2003). A TE se concentra em sua grande parte em desenvolver protocolos para indução de múltiplas ovulações através das informações sobre foliculogênese e a partir de novas gerações de hormônios purificados (CACCIA, et al., 2000). A TE possibilita o aumento do desempenho reprodutivo de fêmeas doadoras com carga genética superior, principalmente quando a demanda dos animais é alta (LEHLOENYA et al., 2008).

A TE permite o melhor aproveitamento das matrizes com mérito genético elevado, possibilitando o aumento no número de crias superior a 10 vezes o número que seria obtido anualmente (WAGTENDONK-DELEEW et al., 2000). Em bovinos isso permite que a seleção aumente de forma intensa, e reduz o intervalo de geração das fêmeas, que por consequência ocasiona em aumento do ganho genético (BILHASSI, 2010). Porém para que a técnica seja aplicável de forma comercial, é necessário que se tenha embriões de qualidade durante todo o ano, mas alguns fatores como a idade, raça, condição climática, estado reprodutivo e nutricional afetam o seu resultado (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004).

2.1.2 Produção de embriões *in vitro*

A PIVE é uma biotécnica de extrema importância, cuja finalidade é explorar o potencial genético das fêmeas bovinas melhorando os indicadores de produtividade (MELLO et al., 2016). A PIVE se tornou comercial no Brasil em 1998, através de um projeto de inovação tecnológica do qual a FAPESP, a Beabisa Agricultura Ltda e a Gertec Tecnologia de Embriões financiaram o projeto (GALLI et al., 2003). Já no ano

de 2017 a produção mundial de embriões *in vitro* (992.289) superou a *in vivo* (495.054), destacando o Brasil em segundo lugar como maior produtor mundial de embriões *in vitro* com um número de 345.528 embriões, ficando atrás apenas dos Estados Unidos que obteve 454.550 embriões (VIANA., 2018).

A expansão da PIVE se deve principalmente ao mercado das raças zebuínas de corte, em especial a Nelore (VIANA., 2018), e pela grande escala de doadoras e receptoras zebuínas utilizadas, além de se obter uma média superior de oócitos aspirados em vacas desta raça em relação as taurinas (SENEDA et al., 2005).

A PIVE possibilita a interação entre oócito e espermatozoide fora do trato reprodutivo da fêmea, a fim de formar um novo indivíduo (GONÇALVES et al., 2008). Esse processo possui três etapas, sendo elas a MIV; FIV e a CIV, que foram descobertas em 1965 por Roberts Edwards, e passou a ser utilizada como meios de estudo para desenvolver oócitos e embriões (SUTTON-MCDOWALL e THOMPSON., 2015).

Durante a produção *in vitro* é realizada a coleta dos oócitos por punção folicular guiada por ultrassom (OPU) (MELLOa et al., 2016). A PIVE associada com OPU, possibilita utilizar animais jovens para obtenção de um número superior de embriões por vaca, diminuindo o intervalo de geração e permitindo ter acesso a animais com genética superior (MELLO et al., 2016).

Com a PIVE é possível aproveitar fêmeas não aptas pelas técnicas tradicionais para fornecerem embriões de qualidade para as doadoras, assim como, se pode utilizar as fêmeas que não possuem qualidade embrionária por conta de algum distúrbio de fertilidade ou patológicos no aparelho reprodutor, para serem receptoras, utilizando ambas para obter maior número de descendentes em um curto intervalo de geração, com elevado potencial genético (VARAGO et al., 2008). Com a PIVE é possível utilizar fêmeas com idade igual ou superior a 6 meses e gestantes com até três meses de gestação, ou que esteja no pós-parto para usá-las como doadoras de oócitos (BUENO E BELTRAN, 2008).

2.2 Raças

Os animais da raça taurina são relativamente mais produtivos que as zebuínas, no corte e leite por conta da elevada seleção genética, porém em relação a adaptação climática em climas quentes com pastagens pobres infestadas de parasitas, as zebuínas ganham destaque na predileção dos produtores (PONTES et al., 2010). Assim como em relação a função ovariana e hormonal é possível ver

diferença em ambas as raças quando submetidas a mesma condição nutricional e ambiental (SARTORI et al., 2016). Porém utilizando doadoras da raça Senepol e Nelore é possível notar que os fatores como o genótipo do embrião e sua qualidade não interferem na taxa de concepção (ANDRADE et al., 2012).

Quando se precisa obter maior número de oócitos viáveis e com qualidade as vacas da raça *Bos indicus* são superiores em comparação com a *Bos taurus* (SALES et al., 2015). Assim como utilizando a técnica de OPU para recuperar oócitos as fêmeas zebuínas obteve maior número em relação as taurinas, isso porque vacas Senepol no outono e inverno tem a taxa de blastocistos reduzidas, o que pode ter relação com a qualidade e disponibilidade de alimento nestes períodos do ano, porém as Holandesas apresentaram a mesma redução na taxa no verão sendo atribuído esse fator devido ao ET no período quente (WATANABE et al., 2017).

Por outro lado, fêmeas mestiças geradas do cruzamento de *Bos indicus* com *Bos taurus* estão sendo muito utilizadas na PIVE, pois apresentam desempenho superior das holandesas e semelhantes ao girolando (GRÁZIA et al., 2016).

2.3 Fatores que afetam a taxa de concepção na transferência de embriões

2.3.1 Estágio de desenvolvimento embrionário

Os estágios de desenvolvimento embrionário começam pela primeira etapa a MIV onde é colhido diretamente dos ovários da fêmea doadora os oócitos no estágio de vesícula germinativa, na segunda etapa a FIV é realizada a fecundação in vitro através do co-cultivo dos oócitos que passaram pela MIV com espermatozoides selecionados e capacitados in vitro, chegando na terceira etapa que é a CIV, onde os zigotos são cultivados até o estágio de desenvolvimento em que podem ser transferidos para as receptoras (BERTOLINI e BERTOLINI., 2009).

A mórula inicial (Figura 1) e quando chega o estágio de 32 blastômeros, deixando a célula semelhante a uma amora, sua massa ocupa o espaço perivitelínico quase que por inteiro (PALMA, 2001).

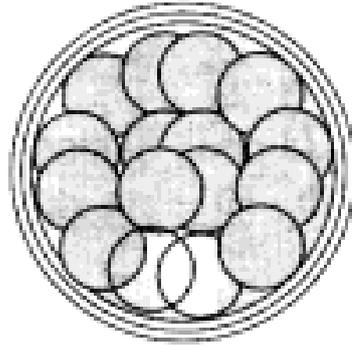


Figura 1 - Mórula inicial (dia 4-5) -13 a mais de 32 blastômeros -até 16 células consegue-se boa separação mecânica - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.

O estágio de mórula compacta (MC) possui aproximadamente de 32 a 64 blastômeros, uma massa compacta se forma ocupando em torno de 60 % a 70 % do espaço perivitelínico (Figura 2), esta compactação é considerada como sinal de diferenciação embrionária, e mesmo compactado os blastômeros continuam com capacidade totipotente (SENGER, 2003).

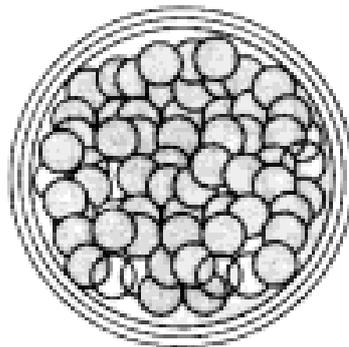


Figura 2 - Mórula (dia 6) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.

No estágio de blastocisto inicial (BI) o embrião possui aproximadamente 100 a 200 células (Figura 3), que se caracterizam pelo início do transporte de fluido nas células trofo ectodérmicas e pela formação da cavidade blastocele localizada no interior do embrião. O BI e o estágio que ocupa cerca de 70 % a 80 % do espaço perivitelínico tornando possível diferenciar o trofoectodérma da massa celular interna (SENGER, 2003). O trofoectoderma é conhecido como o primeiro tipo celular que se diferencia, ele é formado pela camada mais externa, e uma das suas funções de maior importância é dar início ao contato com endométrio materno, facilitando a implantação. Nos embriões em estágio pré implantacional ela é considerada como normal é importante, porque seu papel durante a fase de desenvolvimento e

funcionamento embrionário, pode indicar a qualidade final do embrião (BYRNE et al., 1999).

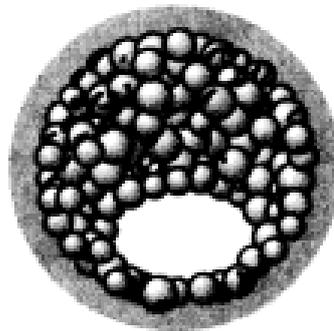


Figura 3 - Blastocisto inicial (dia 7) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.

O estágio de blastocistos (BL) possui número de células semelhantes ao BI, porém a blastocele é bem vista em uma diferenciação entre as células trofoblásticas (Figura 4), assim forma uma camada aderida na zona pelúcida e na massa interna da célula (SENGER, 2003).

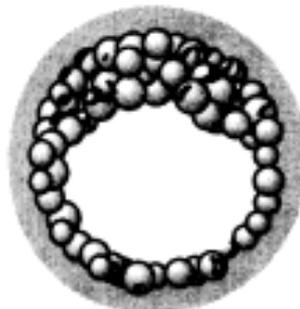


Figura 4 - Blastocisto (dia -7-8) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.

Apresentando-se com mais de 200 células o blastocisto expandido (BX), possui diâmetro que vai aumentando de forma considerável de 1,2 até 1,5 vezes, a zona pelúcida possui espessura menor com cerca de 1/3 da inicial (Figura 5). Essa pressão em seu desenvolvimento ocasiona na ruptura da zona pelúcida, sendo esse o início da eclosão, os embriões que são recuperados durante este estágio podem temporariamente se colabar por conta da perda parcial e/ou total do blastocele (PALMA, 2001). Saha et al., (1996) e George et al., (2008) indicam que o blastocisto é o estágio que tem maior chance de sobrevivência embrionária, pois se desenvolve de forma rápida e eficiente, possuindo qualidade e diâmetro superiores.

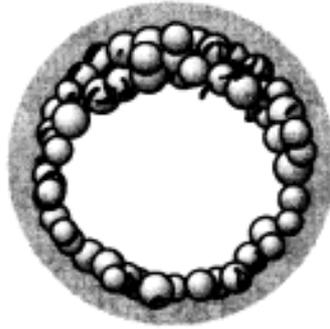


Figura 5 - Blastocisto expandido (dia 8-9) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.

O blastocisto eclodido (Be) é o estágio no qual o número de células variam de 200/800 (Figura 6) e os embriões encontram-se fora da zona pelúcida com a blastocela de forma definida ou mesmo colabada (SENGER, 2003).

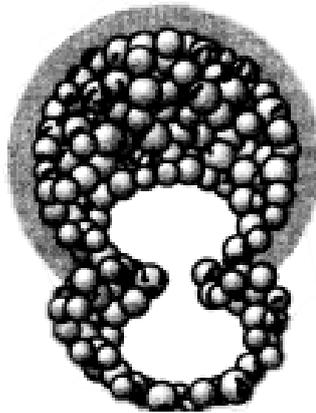


Figura 6 - Blastocisto eclodido (dia 9) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.

Quando o embrião tem a capacidade de eclodir, não significa que esteja pronto para implantar (Figura 7), caso o número de células MCI não seja o suficiente para um completo desenvolvimento. Embriões que possuem vesículas trofoblásticas podem ser avaliados como eclodidos, quando na verdade é uma pequena MCI ou mesmo ausente, possuindo capacidade de eclosão, mas não prontos para implantação (SENGER, 2003).



Figura 7 - Blastocisto eclodido/expandido (dia 9-10) - (IETS, 1998). Fonte: Abadia,2007.

2.3.2 Estresse térmico

A temperatura considerada ideal para um ruminante em estado normal é entre 13 a 18 °C, alterando para 4 a 24 °C (NÄÄS, 1989).

O estresse térmico atua por dois mecanismos (HANSEN, 2009), sendo eles por mudança homeocinéticas (WEST, 2002) ou pela falha dela (KADOKAWA et al., 2012), sendo que o gerenciamento da temperatura corporal é regulado pelo calor produzido e perdido (SAILO et al., 2015) O primeiro mecanismo ativado em ET é a vasodilatação, seguido de sudorese e aumento da frequência respiratória, sendo que a FR depende da duração e da intensidade do ET (Tabela 1) em que os animais estão submetidos para diminuir ou se elevar (MARTELLO, 2006), estes sinais ocorrem, a fim de, eliminar o excesso de calor (MORAIS et al., 2008).

Tabela 1- Variáveis fisiológicas e dos níveis de estresse térmico (PIRES & CAMPOS, 2004).

FR	TR	Níveis de estresse
23/min	38,3°C	Não há estresse nenhum.
45 a 65/min	38,4 A 38,6°C	O estresse está sob controle; o apetite, a reprodução e a produção estão normais.
70 a 75/min	39,1°C	Início do estresse térmico; menor apetite, mas a reprodução e a produção estão estáveis.
90/min	40,1°C	Estresse acentuado; cai o apetite, a produção diminui, os sinais de cio diminuem.
100 a 120/min	40,9°C	Estresse sério; grandes perdas na produção, a ingestão diminui 50% e a fertilidade pode cair para 12%.
> 120/min	> 41°C	Estresse mortal; as vacas expõem a língua e babam muito, não conseguem beber água e se alimentarem.

2.3.2.1 Estresse térmico na vaca

Um vaca leiteira tem temperatura corporal interna na faixa de 38,5 °C, com 60 a 80 de frequência cardíaca e frequência respiratória de 10 a 30 movimentos por minuto, sendo que durante o dia pode sofrer uma pequena variação, que tende a aumentar no fim da tarde até o anoitecer, variando durante as estações do ano e do ciclo estral (HEAD, 1995). Em fêmeas lactantes, a temperatura é reduzida para o máximo de 7 a 21 °C em relação da radiação solar e da umidade relativa, reagindo ao estresse térmico através das mudanças comportamentais e fisiológicas (NÄÄS, 1989).

O ET influencia diretamente nas funções reprodutivas, principalmente quando combinado com o aumento de calor metabólico durante a lactação (SARTORI et al., 2002). Dentre as alterações fisiológicas o aumento da frequência cardíaca e respiratória, juntamente com o aumento da ingestão de água e diminuição de alimentos, sabendo que a diminuição do mesmo afeta de forma direta na redução da produção de leite em animais sob ET (NÄÄS E ARCARO, 2001).

A fêmea exposta ao ET tem a redução do comportamento sexual, sendo visível em seu estro, que no período frio dura em torno de 14 a 18 horas, e de 8 a 10 horas no período quente, sendo difícil a detecção de cio (BARBOSA E DAMASCENO, 2002), sendo em vacas de leite maior, chegando a cerca de 80%, pelo fato de ter a redução de cio e monta no calor, reduzindo assim a taxa de concepção (HANSEN, 2007).

Silva et al., (2013) relata que o estresse térmico afeta a cadeia de expressão gênica, ocasionando alterações maiores em algumas raças, como na porcentagem embrionária; na diminuição da sobrevivência e da taxa de concepção; e aumentando o número de blastômeros apoptóticos, em especial nos taurinos, mas os embriões que sobrevivem após implantação o estresse térmico não os afeta.

Vasconcelos et al., (2006) relatou que a taxa de concepção e sua manutenção vão de acordo com a capacidade da retenção de calor corporal, é vacas com seleção para leite tendem a diminuir a capacidade de termorregulação, e por consequência as deixam mais susceptíveis ao ET, diminuindo no calor sua eficiência reprodutiva e lactação (BERMAN et al., 1985; VASCONCELOS E DEMETRIO., 2011).

2.3.2.2 Estresse térmico no embrião

Rocha et al (2012) relatou que o ambiente em que o oócito se encontra tem relação direta com a sua qualidade. O Estresse térmico afeta o embrião de forma objetiva, começando pelo os efeitos que provoca no ovócito, assim como na fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial (HANSEN E ARECHIGA, 1999), Nos dias próximos da ovulação até o terceiro dia de desenvolvimento embrionário as fêmeas são mais susceptíveis ao ET e altas temperaturas, reduzindo o número de embriões que continuam a se desenvolver (EALY et al., 1993). Além disso ele pode afetar e reduzir o crescimento embrionário que ocorre até no dia 17, momento em que a produção embrionária do interferon-tau que bloqueia a regressão do corpo lúteo (VASCONCELOS E DEMETRIO, 2011), ou seja o ET ocasiona diversas consequências na função celular da fêmea, comprometendo a qualidade (HANSEN, 2009).

O ET materno está associado com a perda embrionária, sendo fator de grande importância na queda da fertilidade, ela se inicia por conta da disfunção no desenvolvimento inicial do embrião, que pode ocorrer por conta das ações do próprio embrião ou do ambiente do oviduto e/ou do útero onde o embrião reside (ROCHA et al., 2012), outro fator que pode levar a morte embrionária é a expor o embrião á altas

temperaturas tornando-o hipertérmico, com tudo, a vaca sob ET no dia posterior a concepção, tem a capacidade de impedir o desenvolvimento embrionário deste período até o dia sete após a concepção, se tornando responsável pela taxa de menor sobrevivência embrionária (HANSEN, 2007).

2.3.3 Criopreservação

A criopreservação é uma técnica que preserva o material genético dos embriões conseguindo estabelecer bancos de material genético de animais de grande potencial, permitindo aproveitar os gametas das fêmeas que foram descartadas de forma natural pelo organismo, uma das vantagens e a realização da técnica na *in vitro* e *in vivo* (ABE et al., 2002b; MUCCI et al., 2006). Os embriões da PIVE têm menor resistência quanto a criopreservação (ABE et al., 2002b) e possuem grande quantidade de lipídeos no meio intracelular, diminuindo a densidade nas mitocôndrias maduras (CROSIER et al., 2001; FARIN et al., 2004).

A criopreservação permite a conservação o armazenamento de tecidos biológicos vivos em baixas temperaturas, conservando as linhagens celulares, os fragmentos de tecidos e espermatozoides, por conta disso é possível o transporte e comercialização dos embriões congelados em doses (VIEIRA, 2012).

2.3.4 Receptoras

Entre os aspectos mais importantes em um programa de TE, estão o estágio de desenvolvimento do embrião; a qualidade do corpo lúteo e a sincronia dos embriões entre as doadoras e receptoras, (VELOSO NETO et al.,2014); e pôr fim a condição nutricional da receptora que é extremamente importante na PIVE (PEIXOTO et al., 2004), influenciando de forma direta em sua taxa de concepção (VELOSO NETO et al.,2014). Para escolher a receptora alguns aspectos são analisados como: a condição do escore corporal; se há presença de ectoparasitas; além de ser exigido exames ginecológicos e sanitários como brucelose. (SCANAVEZ et al.,2013).

A melhor taxa se dá quando se tem uma receptora em boas condições de manejo, ou seja, quando ela está em bom estado nutricional e sanitário, possuindo boa procedência embrionária, e de preferência quando se usa receptora com graus de assincronia entre +1 a -1 (PEIXOTO et al., 2004). O resultado da concepção ou perda se dá ao número de inovulação que a receptora realiza, detectando se emprenhou ou se será realizado o descarte (SCANAVEZ et al.,2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização das granjas leiteiras.

Os dados das transferências foram coletados de três granjas leiteiras localizadas nos municípios de Venda Nova do Imigrante, Serra e Santa Tereza no estado do ES. As granjas leiteiras possuem cerca de 900 vacas em lactação e seu rebanho é composto por animais das raças Holandesa, Jersey, Gir e Girolando com diferentes graus de sangue. Todas as granjas possuem ordenha mecânica, sendo que, em duas delas a ordenha é realizada três vezes ao dia, e em uma fazenda os animais são ordenhados duas vezes ao dia. A produção média das granjas leiteiras é em torno de 26 Kg de leite por dia. O sistema adotado por duas fazendas é o de confinamento total e uma adota o sistema de semi-confinamento. A alimentação é composta de dieta total para os animais em confinamento e dieta total associado com pastejo de Mombaça (*Panicum maximum*) na fazenda com semi-confinamento. A dieta total é composta por silagem de milho, feno de tífton 85 e ração concentrada (farelo de seja, farelo de milho, caroço de algodão, polpa cítrica e núcleo mineral), água e sal mineral *ad libitum*.

3.2 Caracterização climática.

Para caracterização climática dos períodos quente e frio foram observadas as temperaturas médias mensais durante os anos de 2008 a 2015 das cidades em que estavam localizadas as granjas leiteiras. Os dados foram coletados das estações meteorológicas do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER (<https://meteorologia.incaper.es.gov.br/>). Para o período frio foram considerados os meses de maio, junho, julho e agosto e para o período quente foram considerados os meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro. Considerando as temperaturas de 13°C a 18°C no período frio e 21°C a 39°C no período quente.

3.3 Produção in vitro de embriões.

Os oócitos utilizados para produção *in vitro* de embriões foram coletados de animais doadores das raças holandês, gir e girolando de diferentes graus de sangue e foram obtidos através da técnica de aspiração folicular intravaginal guiada com ultrassom (GALLI et al., 2001). Os oócitos foram classificados quanto a sua qualidade nos graus 1, 2, 3 e 4 (STRINGFELLOW, 1998) e somente os oócitos de qualidade 1 e 2 foram usados para a PIVE. Após a obtenção, os oócitos foram armazenados em incubadora convencional para seguirem para o laboratório e assim realizar a

maturação *in vitro* (VARAGO et al., 2008) a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂ em ar, por 24h com variações 22-26h no tempo de incubação.

Para o preparo do sêmen e fertilização *in vitro* foram utilizados apenas sêmen sexado para nascimento de fêmeas. 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 em meios específicos e colocados nas placas de fecundação. 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 para a fertilização.

Após o processo de fecundação *in vitro* (VARAGO et al., 2008) os oócitos fecundados foram encaminhados para o cultivo *in vitro* (VARAGO et al., 2008) utilizando meio específico em estufa de cultivo celular, com 5% de CO₂ a 38,5 °C. Vinte quatro horas após a fecundação, foi avaliado a clivagem dos embriões e as estruturas que não clivaram foram retiradas do meio de cultivo. Após seis dias de cultivo fez-se uma avaliação das estruturas e apenas os embriões classificados segundo Fonseca et al., (2001) como grau I e II foram transferidos para as fêmeas receptoras á fresco ou criopreservados para posterior inovulação.

Os embriões encaminhados para o processo de inovulação estavam em estágio de : Mórula (MO), Blastocisto inicial (BI), Blastocisto (BL), Blastocisto expandido (BX), e Blastocisto eclodido (BE) e para análise foram selecionados os embriões da raça holandês, gir e girolando com graus de sangue variado (1/2 sangue holandês, 3/4 holandês e 5/8 holandês).

3.4 Sincronização das receptoras e inovulação dos embriões.

Foram inovulados um total de 1636 embriões, sendo que 1098 nos meses de maio, junho, julho e agosto (período frio) e 538 nos meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro (período quente) nos anos de 2014 a 2018. Do total de embriões inovulados, 1134 foram transferidos á fresco e 502 foram criopreservados.

Para inovulação dos embriões nas receptoras foram utilizados animais em lactação das raças holandês, gir e girolando com diferentes graus de sangue. O protocolo para sincronização das receptoras foi o de transferência de embriões em tempo fixo (TETF), sendo que no dia 0 (D0) foi colocado implante de progesterona

contendo 1g ou 500mg de progesterona mais aplicação de 2mg benzoato de estradiol IM. No dia 9 (D9) o implante foi retirado, foi administrado 300 UI eCG IM e 1,0 mg cipionato de estradiol intramuscular e 0,3 de d-cloprostenol (análogo de prostaglandina F2 α) IM. A inovulação dos embriões foi realizada 18 dias (D18) após o início da sincronização dos animais, mediante a avaliação das receptoras sendo considerados aptos os animais com a presença do corpo lúteo. A inovulação era realizada no corno ipsilateral ao corpo lúteo. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia 30 dias após a data da fertilização *in vitro*. A concepção foi caracterizada pela presença da vesícula embrionária com um embrião viável (presença de batimentos cardíacos).

3.5 Análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do pacote computacional do SAS (SAS para Windows, Versão 9.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A variável-resposta do diagnóstico de gestação foi assumida por apresentar distribuição binomial (P = prenhe; V = vazia), sendo analisada com base na metodologia de regressão logística pelo procedimento LOGISTIC do SAS. Foram avaliados os efeitos da raça do embrião, estágio de desenvolvimento e da criopreservação sobre a porcentagem de vacas que se tornaram gestantes após a transferência de embriões nos períodos frio e quente do ano.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Animais em estresse térmico sofrem alterações comportamentais e fisiológicas na tentativa de manter a temperatura corporal neutra, reduzindo o efeito provocando pelo calor e/ou frio (FERRO, 2011), pois o ambiente influencia diretamente o desempenho do animal, tanto de forma positiva quanto negativa, de acordo com o nível de conforto e/ou estresse (SILVA et al., 2000), o animal está em zona de conforto quando a temperatura se encontra entre 5 a 25°C (ROENFELD, 1998). O crescimento folicular nos bovinos é afetado quando estes são expostos ao estresse térmico, isso afeta diretamente a qualidade do oócito (FERREIRA et al., 2010).

Além disso, de acordo com Wolfenson e Roth, (2018) o estresse térmico altera o perfil de secreção dos hormônios, bem como os constituintes do sangue provocando mudanças em todos os sistemas. Dentre as alterações hormonais, as principais são o aumento do cortisol (SILVA et al., 2000) e a diminuição do estradiol (WOLFENSON & ROTH, 2018). Segundo Garcia et al., (2015) o aumento do cortisol, faz com que o animal diminua o consumo de alimento e água, intensificando a sudorese e consequentemente perda de nutrientes essenciais, provocando queda na qualidade dos oócitos. Em relação ao estradiol, sua diminuição faz com que ocorra a redução dos sinais e tempo de manifestação do estro (SILVA et al., 2000). Isso ocasiona queda na taxa de concepção, se agravando ainda mais quando se trata de animais de alta lactação (WOLFENSON & ROTH, 2018).

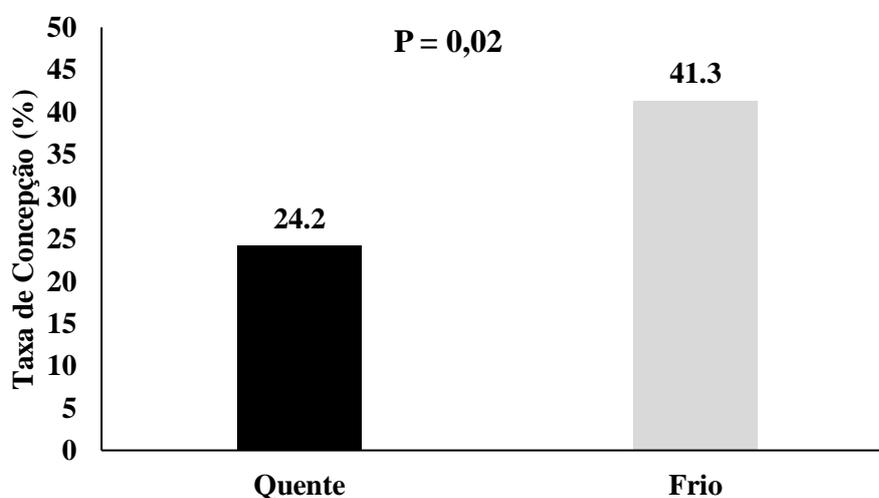


Figura 8 - Taxa de concepção dos embriões inovulados em vacas leiteiras em lactação nos períodos quente e frio durante os anos de 2014 a 2018.

Elevadas temperaturas fazem com que o animal necessite de mudanças fisiológicas é comportamental, para manter-se na temperatura ideal, o que faz com que ocasione em épocas como o verão uma perda excessiva de calor, e o corpo a fim de se manter acaba tirando energia da produção é da reprodução (Figura 8), isso faz com que o animal seja mais produtivo no período frio, onde a mínima pode ser favorável, já que o mesmo suporta até 5°C (ROENFELD, 1998; FERRO, 2011).

O resultado (Figura 8) é semelhante ao obtido por Barbosa et al., (2011) no qual verificaram menor taxa no período quente (25%) enquanto no período frio o aumento foi significativo (42,55). No estudo realizado por Pires et al., (2002) ele observou que vacas holandesas apresentam maior taxa de concepção no período frio (71,2%) em relação ao período quente que é menor (45,7%).

A taxa de concepção dos embriões inovulados á fresco foi maior quando comparado com os embriões que sofreram o processo de criopreservação (Figura 9). A PIVE pode ocasionar modificações no embrião, dentre elas o excesso de lipídeos intracelular (DO et al., 2016), que forma uma barreira, que após o descongelamento do embrião provoca queda das taxas de sobrevivência embrionária (PEREIRA et al., 2005).

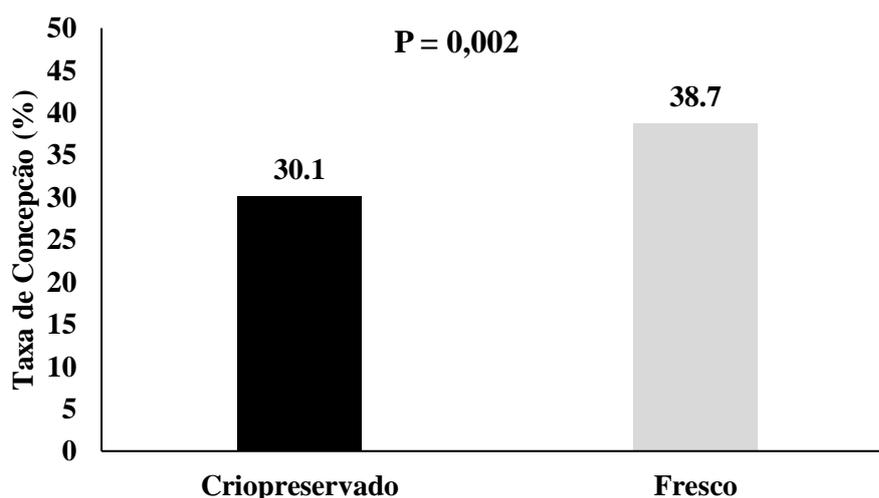


Figura 9 - Taxa de concepção dos embriões que foram inovulados criopreservados ou frescos em vacas leiteiras em lactação nos períodos quente e frio durante os anos de 2014 a 2018.

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos encontrados por Caamano et al., (2015) que observaram a diminuição das taxas de concepção com embriões criopreservados.

Os mecanismos que alteram a qualidade do embrião na criopreservação é o aumento da pressão hidrostática e do estresse oxidativo (DODE et al., 2013), a ineficiência do metabolismo das mitocôndrias embrionárias (FARIN et al., 2004) e alguns danos irreversíveis provocados pela cristalização da água intracelular (CARVALHO et al., 2011). Segundo Wolfe e Bryant, (1999) a combinação destas alterações com a fase de transição lipídica, podem ocasionar em danos físicos na membrana, com perda de fluidez e/ou ruptura.

Em relação estágio de desenvolvimento embrionário, no período frio não houve diferença entre a taxa de concepção (Figura 10) no período quente os estágios de blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX) foram maiores quando comparados aos estágios de mórula (MO), blastocisto inicial (BI) e blastocisto eclodido (BE) (Figura 11). Podemos explicar esse resultado devido ao estresse que o embrião sofre por conta da estresse que a vaca sofre durante o desenvolvimento inicial do embrião, de acordo com os resultados obtidos (Figura 10) no período frio em relação ao desenvolvimento embrionário, o número de embriões viáveis foram de 40% no estágio de MO (45/18); 30,1% de BI (115/50); 40,1% de BL (331/ 134); 42% de BX (581/244) e 38,5% de BE (26/10). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por alguns autores como Sartori et al., (2002) e Vieira (2012), que concluíram que o período frio é favorável para reprodução.

O estágio de mórula é sensível aos crioprotetores (CAMPOS-CHILLON et al., 2006), não possui o estabelecimento das concentrações dos crioprotetores, do tempo e a temperatura em que pode ficar exposto. O estágio de mórula também apresenta menores taxas de compactação na PIVE (PEREIRA et al., 2005).

Os estágios avançados são os que alcançam as melhores taxas de concepção, Fonseca et al., (2001) aponta os estágios de BL, BX e BE como os avançados. É possível atribuir a queda da taxa de concepção (Figura 11), associando ao nível de P4, que age de forma direta no desenvolvimento embrionário, mas também age indiretamente no desenvolvimento inicial (MO, BI) dos embriões (CRUZ et al, 2011; GREEN et al., 2005). Isso ocorre em vacas de alta lactação que tem uma maior predileção em metabolizar P4 (SANGSRITAVONG et al., 2002). Além disso, altas temperaturas influenciam de forma negativa nos estágios iniciais (MO e BI)

(DEMÉTRIO, 2006). É para se obter oócitos de qualidade é necessário possuir eficiência técnica na maturação, utilizando meios nos quais ele receba o ambiente e a nutrição necessária para o seu desenvolvimento (SEKHAR et al., 2010).

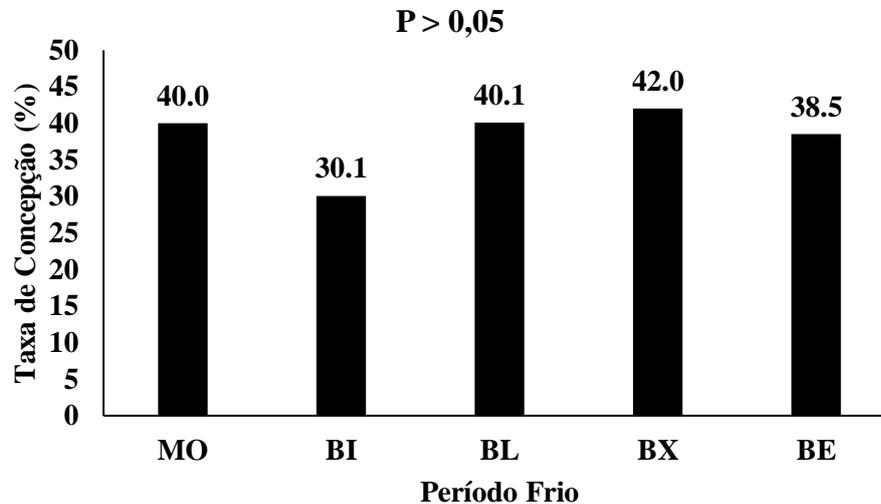


Figura 10 - Taxa de concepção dos embriões inovulados nos estágios de mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido em vacas leiteiras em lactação no período frio.

No período frio ambos os estágios possuem capacidade similar na taxa de concepção, ou seja, favorece a reprodução. Sartori et al., (2002). Em vacas lactantes esse período é favorável porque ela possui um melhor desempenho no frio, tanto na produção de corpo lúteo como na de embriões viáveis. Porém nesse mesmo período as novilhas têm desempenho duas a três vezes superior as vacas lactantes, possuindo maior número de embriões viáveis e taxa de concepção superior (VIEIRA, 2012).

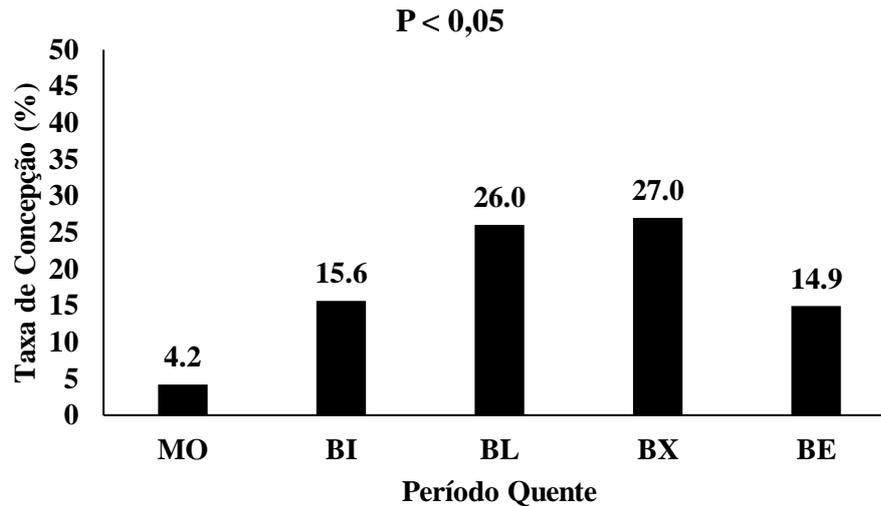


Figura 11 - Taxa de concepção dos embriões involuados nos estágios de mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido em vacas leiteiras em lactação no período quente.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 10) no período quente em relação ao desenvolvimento embrionário, o número de embriões viáveis foi de 4,2% no estágio de MO (24/1); 15,6% de BI (64/10); 26% de BL (131/34); 27% de BX (312/84) e 14,9% de BE (7/1). Deixando visível que o período quente afeta de forma direta ou indireta, em todas as etapas reprodutivas, mas dependendo do grau de estresse térmico é idade da doadora e receptora algumas são mais tolerantes a esse período, assim como relato por Vieira (2012) no qual ele observou que quando se usa novilhas com doadoras, é possível obter um melhor resultando em número de embriões viáveis no período quente, o que em vacas lactantes costumam cair gradativamente neste período, mas quanto a taxa de fertilização foi observado que ambas se desenvolvem não havendo alteração de vacas lactantes para novilhas (MAILLO et al., 2012; VIEIRA, 2012).

Costuma-se obter na *in vitro* uma maior taxa de concepção com embriões de BX, mas no período frio essa diferença não foi notada (Figura 10), no entanto esta característica é notada no período quente (Figura 11). Looney et al, (2006) constataram tal diferença em embriões de estágios iniciais e avançados, assim como Botigelli et al, (2018) identificou que os blastocistos são o que possuem maior grau de sobrevivência.

Silva et al., (2013) chegaram à conclusão de que o período quente é o mais afetado pelo estresse térmico, afetando assim da maturação oocitária até o período que há desenvolvimento pré-implantacional. Em relação a raça não se obteve

resultados relevantes (Figura 12), ou seja, não houve diferença em ambas as épocas do ano. Podemos atribuir isso ao ambiente (BARUSELLI et al., 2008; MIYAUCHI, 2011) e a todas as mudanças fisiológicas provocadas em ambos os períodos pelo estresse térmico.

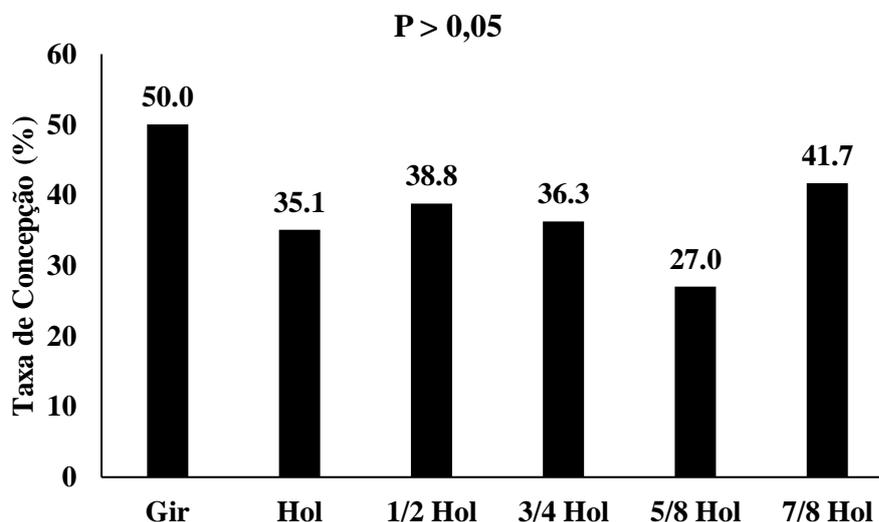


Figura 12 – Taxa de concepção dos embriões inovulados em vacas leiteiras com embriões de diferentes graus de sangue.

De acordo com Vieira (2012), quando o embrião tem origem de vaca holandesa em lactação ou que foram produzidos durante o período quente a taxa de concepção é menor, assim como os de novilhas no período quente.

Penitente Filho et al (2014) indagaram que animais jovens, que possuem boa herdabilidade materna tornam os resultados favoráveis. A ausência de diferença da taxa de concepção em relação a raça, provavelmente não depende da raça do embrião, mas sim da qualidade (ANDRADE et al., 2012). Em um estudo realizado por Ferreira et al., (2013), com embrião das raças Nelore, Simental e Red Angus, eles concluíam que a raça não tem influência sobre a taxa de concepção, e sim o estado nutricional da receptora para segurar a gestação. Já vacas da raça Holandesa em lactação tem a taxa de concepção reduzida por conta da temperatura ambiente e da umidade relativa do ar que provocam alterações fisiológicas provocadas pelo estresse térmico (PIRES et al., 2002).

5. CONCLUSÃO

O período quente do ano assim como a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* afeta negativamente a taxa de concepção quando inovulados em vacas leiteiras de alta produção. Além disso, os estágios de BL e BX apresentaram melhores taxa de concepção no período quente. Isso pode ser utilizado como estratégia de melhorar os índices reprodutivos em períodos mais quentes do ano, nos quais o animal pode estar sobre o efeito de estresse térmico.

6. REFERÊNCIAS

ABADIA, M. E. N. C. *Transferência de embriões em bovinos: revisão de literatura. 2006. 45f. Monografia* – Universidade Castelo Branco, Goiânia, 2006.

ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 1273-1283, 2002b.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 57-66, 2002a.

ANDRADE, G.A.; FERNANDES, M.A.; KNYCHALA, R.M.; PEREIRA JUNIOR, M.V.; OLIVEIRA, A.J.; NUNES, D.P.; BONATO, G.I.; SANTOS, R.M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p.66-69, 2012.

BARBOSA, C.F.; JACOMINI, J. O.; DINIZ, E. G.; SANTOS, R. M.; TAVARES, M. Inseminação artificial em tempo fixo e diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras mestiças. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.40, n.1, p.79-84, 2001.

BARBOSA, O.R. e DAMASCENO, J.C. Bioclimatologia e bem-estar animal aplicados a bovinocultura de leite. Universidade de Maringá, Maringá, Paraná, 2002.

BARUSELLI, P. S.; JACOMINI, J. O.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3 ,2008, Londrina. **Anais...** Londrina, 2008. P. 146-167.

BERMAN, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; MAMEN, M.; HERZ, Z.; WOLFENSON, D.; ARIELI, A.; GRABER, Y. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical environment. **Journal of Dairy Science**, Fairfield, v.68, n.3, p.488-95, 1985.

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L. R. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**. Bogotá, v. 53, n. 3, p. 184-194, 2009.

BILHASSI, T.B.; ARAÚJO NETO, F.R.; DIAZ, I. D. P.; PESSOA, M. C.; OLIVEIRA, H. N.; MARQUES, L. F. A. Efeito da inclusão de animais provindos de transferência de embriões na avaliação genética de medidas ponderais na raça Simental. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010. Maringá-PR. **Anais...** Maringá – PR, 2010.

BOTIGELLI, R.C., RAZZA, E.M., PIOLTINE, E.M., FONTES, P.K., SCHWARZ, K.R.L., LEAL, C.V.L., NOGUEIRA, M.F.G., Supplementing in vitro embryo production media by NPPC and sildenafil affect the cytoplasmic lipid content and gene expression of bovine cumulus-oocyte complexes and embryos. **J.repbio**. 18, 66-75,2018.

BUENO AP, BELTRAN MP. Produção in vitro de embriões bovinos. **Rev Elet Med Vet**, n.11, p.1-7, 2008.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 117, p.97–105, 1999.

CAAMANO, J. N.; GÓMEZ, E.; TRIGAL, B.; MUNÓZ, M.; CARROCERA, S.; MARTÍN, D.; DíEZ, C. Survival of vitrified in vitro–produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. **Theriogenology**, v. 83, n. 5, p. 881-890, 2015.

CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H. *et al.* Effect of pretreatment with ECG on superovulatoru response in CIDR-B treated beef cattle. **Theriogenology**, v.53, p. 495, 2000.

CAMPOS-CHILLON, L.F.; WALKER, D.J.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F.; SEIDEL JR, G. E. in vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1200-1214, 2006.

CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A.P.R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Vet Bras**, v.5, n.3, p.236-248, 2011.

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biol Reprod**, v.64, p.1375-1385, 2001.

CRUZ, L.V.; ANGRIMANI, D. S. R.; RUI, B. R.; SILVA, M. A. Efeitos do estresse térmico na produção leiteira: revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Garça, Ano IX, número 16, periódicos semestrais, janeiro de 2011. ISSN: 1679-7353.

DEMÉTRIO, C. G. B.; CHIARI, J.R.; VASCONCELOS, I. L. M. Fatores que afetam a taxa de concepções após inseminação artificial ou transferência de embriões em vacas holandesas em lactação. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, Supl. 1, p. 293, 2006.

DO, V. H.; WALTON, S.; CATT, S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. Requirements for cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos by a standard method of vitrification. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 4, 2016.

DODE MAN, LEME LO, SPRICIGO JFW. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Rev Bras Reprod Anim*, 37:145-150, 2013.
EALY A.D, DROST. M., ROBINSON O. W.,; BRITT, J. H . Alterações no desenvolvimento da resistência embrionária a efeitos adversos do estresse térmico materno em vacas. *J. Dairy Sci.*, 76. 1993, pp. 2899 – 2905.

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*. 55:209-223,2001.

FABER DC, MOLINA JA, OHLRICH CL, VANDER ZWAAG DF, FERRÉ LB. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*, v.59, p.125-138, 2003.

FARIN, C. E; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from in vitro - produced and cloned bovine embryos. *Journal of Animal Science*, v. 82, p. 53-62, 2004.

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.

FERRO, D. A. C. Efeitos dos elementos climáticos na produção e reprodução de vacas leiteiras. Dissertação, Universidade Federal de Goiás,2011.

FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; PINTO NETO, A.; PALHARES. M.S. Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, n.6, p.671-676, 2001.

GALLI, C.; CROTTI, L.; NOTARI, C.; TURNINI, P.; DUKES, R.; LAZZARI, L. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1341-57, Apr, 2001.

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

GARCIA, A. B.; ANGELI, N.; MACHADO, L.; CARDOSO, F. C.; GONZALEZ, F. Relationships between heat stress and metabolic and milk parameters in dairy cows in Southern Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 47, p. 889-894, 2015.

GEORGE F, DANIAUX C, GENICOT G, VERHAEGHE B, LAMBERT P, DONNAY I. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. **Theriogenology**, v.69, p.612-623, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo, Roca: 2008. p. 57-82.

GONZALES-BULNES A, BAIRD DT, CAMPBELL BK, COCERO MJ, GARCIA-GARCIA RM, INSKEEP EK, LOPEZSEBASTIAN A, MCNEILLY AS, SANTIAGO-MORENO J, SOUZA CJ, VEIGA-LOPEZ A. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reprod Fertil Dev**, v.16, p.421-435, 2004.

GRÁZIA, J. G. V.; SILVEIRA, R. O.; PEREIRA, E. C. M.; SANTOS, G. M. Desempenho de doadoras leiteiras mestiças F1 (Gir x Holandês) no sistema de produção in vitro de embriões. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 3, p. 605-610, 2016.

GREEN MP, HUNTER MG, MANN GE. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.** 2005; 88:179-189.

HANSEN, P. J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. **Theriogenology**, n.68, p.242-249, 2007.

HANSEN, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, **Biological Sciences**. V.364, p. 3341–3350, 2009.

HANSEN, P.J.; ARECHIGA, C.F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, v.77, suppl. 2, p.36-50, 1999.

HASLER JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Anim Reprod Sci**, v.79, p.245- 264, 2003.

HEAD, H.H. Management of dairy cattle in tropical and subtropical environments. In: Congresso Brasileiro de Biometeorologia, 2, **Anais...**, Jaboticabal, 1995, p.26-68.

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.

KADOKAWA, H.; SAKATANI, M.; HANSEN, P.J. Perspectives on improvement of reproduction in cattle during heat stress in a future Japan. **Animal Science Journal**. V. 83(6), p. 439–445. 2012.

LEHLOENYA, KC, GREYLING, JPC E GROBLER, S., Efeito da estação na resposta superovulatória em cabras Boer. **Small Ruminant Research**, v. 78, 74–79. 2008.

LEW B, MEIDAN R, WOLFENSON D. Concentrações hormonais e desenvolvimento folicular de vacas leiteiras em hipertermia sazonal e aguda. **Arq Bras Med Vet Zootec** .v.58. 816–22. 2006

LOONEY, C.R.; NELSON, J.S.; SCHNEIDER, H.J. et al. Improving fertility in beef cow recipients. **Theriogenology**, v.65, p.201-209, 2006.

LUCY MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end. **J. Dairy Sci.**; v. 84:1277-1293, 2001.

MAILLO V., BESENFELDER U., HAVLICEK V., GARRETT M., KELLY AK, RIZOS D., LONERGAN P. Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. **J Dairy Sci**. V. 95: 3865-3876, 2012.

MARTELLO, L.S. **Interação animal-ambiente: efeito do ambiente climático sobre as respostas fisiológicas e produtivas de vacas Holandesas em free-stall**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006. 113p. Tese Doutorado em Qualidade e Produtividade Animal

MEDEIROS, L.F.D.; VIEIRA, D.H. Bioclimatologia Animal. Rio de Janeiro,.126p. 1997.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; DE SOUSA, S. L. G.; DE MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016.

MELLOa, R. R. C.; MORAIS, M. E.; FERREIRA, J. E.O.; MELLO, M. R. B. Taxa de prenhez em receptoras bovinas com diferentes graus de assincronia embrião-útero. **Boletim de Indústria Animal (BIA)**., Nova Odessa, v.73, n.1, p.88-93, 2016.

MIYAUCHI, T. M. **Protocolos hormonais de preparação de doadoras bovinas para a produção de embriões in vitro.**, Alfenas: UNIFENAS, 2011. 64p. Dissertação de Mestrado, Ciência Animal.

MORAIS, D.A.E.F.; MAIA, A.S.; SILVA, R.G. et al. Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. **Rev. Bras. Zootec.**, v.37, p.538-545, 2008.

MUCCI N, ALLER J, KAISER GG, HOZBOR F, CABODEVILA J, ALBERIO RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.65, p.1551-1562, 2006.

NÄÄS, I. de A. Princípios de conforto térmico na produção animal. 1 ed. São Paulo: Icone Editora Ltda., 1989, 183p.

NÄÄS, I.A.; ARCARO JR., I. Influência de ventilação e aspersão em sistemas de sombreamento artificial para vacas em lactação em condições de calor. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.1, p.139-142, 2001.

PALMA, G.A. Biotecnologia de la Reproducion, 1ª ed, Ediciones. **Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA)**, P. 149-97, 2001.

PAULA-LOPES F.F. & HANSEN, P.J. Heat-shock induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biol. Reprod.** 66:1169- 1177. 2002

PEIXOTO, M.G.C.D.; BERGMANN, J.A.G.; ALVIM, M.T.T.; PENNA, V.M. Fatores que influenciaram a prenhez de embriões zebuínos em receptoras mestiças. In:

SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: 2004. 4p.

PENITENTE FILHO, J. M.; TORRES, C. A. A.; OLIVEIRA, F. A. Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro. **Revista CFMV.**, Brasília- DF, ano XX, n. 61, p. 73- 84, jan/ abr., 2014.

PEREIRA DC, DODE MAN, RUMPF R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.63, p.1131-1141, 2005.

PIRES, M. F. A.; CAMPOS, A. T. Modificações ambientais para reduzir o estresse calórico em gado de leite, **EMBRAPA**, Juiz de Fora, MG, p. 1-6. Dez 2004.

PIRES, M. F. A; FERREIRA, A. M.; SATURNINO, H. M.; TEODORO, R. L. Taxa de Gestação de Fêmeas da Raça Holandesa confinadas em free-stall no verão e no inverno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n. 1, 2002.

PONTES J. H.; SILVA, K. C.; BASSO, A. C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J.P.; VIEIRA, P. H.; FAIFER F. S.; STERZA, F. A.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1349-1355, 2010.

SARTORI,R.;GIMENES,L.U.;MONTEIRO JR, P. L.J.; MELO.L.F .;BARUSELLI, P.S.; BASTOS, M.R.Diferenças metabólicas e endócrinas entre as fêmeas de *Bos taurus* e *Bos indicus* que afetam a interação da nutrição com a reprodução **Theriogenology** , v.86 , pp. 32 – 40. 2016.

ROCHA, D. R.; SALLES, M. G. F.; MOURA, A. A. A. N.; ARAÚJO, A. A. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 18- 24, 2012.

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

SAHA S, RAJAMAHENDRAN R, BOEDIONO A, SUMANTRI C, SUZUKI T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step rehydration. **Theriogenology**, v.46, p.331- 343, 1996.

SAILO, L.; GUPTA, I.D.; VERMA, A.; SINGH, A.; CHAUDHARI, M.V.; DAS, R.; UPADHYAY, R.C.; GOSWAMI, J. Single Nucleotide Polymorphism in HSP90AB1 Gene and its Association with Thermo-tolerance in Jersey Crossbred Cows. **Animal Science Reporter**. V. 9 (2), p.43-49, 2015.

SALES, J. N. S.; IOGUMA, L. T.; BATISTA, R. I. T. P; QUINTÃO, C. C. R; GAMA, M. A. S.; et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3086-3099, 2015.

SANGSRITAVONG S, COMBS DK, SARTORI R, ARMENTANO LE, WILTBANK MC. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **J. Dairy Sci**. 2002; 85:2831-2842.

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.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.3, p.722-728, 2013.

SEKHAR, K., PRIYANKA, B., REDDY, V. D., & RAO, K. V. Isolation and characterization of a pigeonpea cyclophilin (CcCYP) gene, and its over-expression in *Arabidopsis* confers multiple abiotic stress tolerance. **Plant, Cell & Environment**, v.33, 1324-1338, 2010.

SENEDA MM, BLASCHI W, RUBIN KCP, LISBOA LA. Aspiração folicular in vivo: metodologias, eficiência e sequelas. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2005.

SENGER, P. L. Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conceptions, Inc. 2^ae, p. 284-96, 2003.

SILVA, C.F.; SARTORELLI, E. S.; CASTILHO, A. C. S.; SATRAPA, R. A.; PUELKER, R. Z.; RAZZA, E. M.; TICIANELLI, J. S.; EDUARDO, H.P.; LOUREIRO, B.; BARROS, C.M. Efeito do estresse térmico no desenvolvimento, qualidade e sobrevivência de embriões *Bos indicus* e *Bos taurus* produzidos in vitro. **Theriogenology**, 79, pp. 351 – 357, 2013.

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

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **IETS**, p. 112-113, 1998.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; THOMPSON, J. G. Metabolism in the pre-implantation oocyte and embryo. **Anim. Reprod.** v.12, n.3, 408 – 417, Jul./Set. 2015.

VARAGO FC, MENDONÇA LF, LAGARES MA. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, p.100-109, 2008.

VASCONCELOS, J.L.M.; DEMÉTRIO, D.G.B.; SANTOS, R.M.; CHIARI, J.R.; RODRIGUES, C.; SÁ FILHO, O.G. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. **Theriogenology**. V. 65, p.192–200, 2006.

VASCONCELOS, J.L.M; DEMÉTRIO, D.G.B. Manejo reprodutivo de vacas sob estresse calórico. **Revista brasileira de zootecnia**, v.40, p.396-401, 2011.

VELOSO NETO, H. F.; PEREIRA, L. C.; ANDRADE, J. C. O et al. Parâmetros que afetam a taxa de prenhes de receptoras bovinas de embriões produzidos in vitro. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 8, n. 3, p. 31-35, 2014.

VIANA JH, SIQUEIRA LG, PALHAO M, CAMARGO LS. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Anim Reprod**, v.9, p.12-18, 2012.

VIANA JHM. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer NewsI**, v.36(4), p.8-25, 2018.

VIANA, J. H.; GONÇALVES, R. L. R. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.43, n.2, p.156-159, abr./jun. 2019.

VIEIRA, R. J. Biotechnical applied to the bovine reproduction: generalities. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 55-65, 2012.

WAGTENDONK-DELEEUW, A.M.; MULAART, E.; DE ROOS, J.S. et al. Effects of different reproduction techniques: al, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v.53, n.2, p.575-597, 2000.

WATANABE YF, DE SOUZA AH, MINGOTI RD, FERREIRA RM, BATISTA EOS, DAYAN A, WATANABE O, MEIRELLES FV, NOGUEIRA MFG, FERRAZ JBS, BARUSELLI PS. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. **Anim Reprod**, v.14, p.635-644, 2017.

WEST, J.W. Physiological Effects of Heat Stress on Production and Reproduction. **Tri-State Dairy Nutrition Conference**. P.1-10, 2002.

WOLFE, J, BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solutewater systems. **Cryobiology**, v. 39, p. 103- 129, 1999.

WOLFENSON, D., AND ROTH, Z. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. **Anim. Front.** 9, 32–38. 2018.