

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

ANDREY LUIZ LOPES CORDEIRO

**INFLUÊNCIA DE ALTAS TEMPERATURAS AMBIENTAIS NA TAXA DE
GESTAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES NELORE
PRODUZIDOS *IN VITRO* NO ESTADO DO ACRE**

**RIO BRANCO
ACRE-BRASIL
FEVEREIRO-201**

ANDREY LUIZ LOPES CORDEIRO

INFLUÊNCIA DE ALTAS TEMPERATURAS AMBIENTAIS NA TAXA
DE GESTAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES
NELORE PRODUZIDOS *IN VITRO* NO ESTADO DO ACRE

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Acre, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

RIO BRANCO
ACRE-BRASIL
FEVEREIRO-2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

- C794i Cordeiro, Andrey Luiz Lopes, 1991-
Influencia de altas temperaturas ambientais na taxa de gestação e no desenvolvimento inicial de embriões nelore produzidos em *in vitro* no estado do Acre / Andrey Luiz Lopes Cordeiro. – 2017.
44 f.: il.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, 2017.
Incluem referências bibliográficas.
Orientador: Prof. Dr. Rafael Augusto Satrapa.
1. Embriões. 2. Produção in vitro. 3. Produção animal. I. Título.

CDD: 636.20824

Bibliotecária: Maria do Socorro de Oliveira Cordeiro CRB-11/667

ANDREY LUIZ LOPES CORDEIRO

INFLUÊNCIA DE ALTAS TEMPERATURAS AMBIENTAIS NA TAXA
DE GESTAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES
PRODUZIDOS *IN VITRO* NO ESTADO DO ACRE

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Acre, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA: 24 de março de 2017

Prof. Dr. Rodolpho Satrapa
EMDGA – SEAP

Prof. Dr. Fernando, de Andrade Souza
UFAC

Prof. Dr. Rafael Augusto Satrapa
UFAC
(Orientador)

Aos meus pais, Danúbia Maria Lopes Cordeiro e
Rodilson Alves Cordeiro.
À minha companheira Adriane de Souza Belfort.
Aos meus avós, Berenice Rocha da Silva e
Joselito Paulino Cordeiro (*in memoriam*).

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rodilson e Danúbia, irmão Darlyn, e a toda minha família, pelo amor e apoio incondicionais. Tudo que sou e serei, devo a vocês.

Aos meus avós Berenice da Silva e Joselito Cordeiro (*in memoriam*), que me mostraram com exemplos que tipo de pessoa quero ser.

À minha namorada, Adriane Belfort, que esteve comigo durante toda essa caminhada, oferecendo suporte, amor e companheirismo sempre que precisei. Pessoa que eu divido tudo que possuo, penso e sinto.

A todos meus amigos, com quem sempre encontrei muita alegria, mesmo durante os piores momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Satrapa, que mais que orientação, me ofereceu parceria e amizade. Obrigado pelos conselhos e broncas (nem tantas).

A todos do grupo de orientados do Prof. Rafael, sempre dispostos a ajudar uns aos outros.

À Universidade Federal do Acre (UFAC) e ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental (PPGESPA) pelas oportunidades oferecidas.

A todos os docentes do PPGESPA que me passaram conhecimentos e experiências que levarei para toda vida.

À InVitro Acre, representada pelos excelentes profissionais Helton Gregianini e Jennifer Gregianini. Obrigado pela parceria que dura desde a graduação, com estágios, até a presente pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de estudo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFAC

Título do projeto: Influência do estresse térmico calórico na taxa de gestação e no desenvolvimento inicial de embriões Nelore produzidos *in vitro* no Estado do Acre.

Processo número: 23107.010591/2015-25

Protocolo número: 65/2015

Responsável: Prof. Dr. Rafael Augusto Satrapa

Data aprovação: 05/04/2017

RESUMO

CORDEIRO, Andrey Luiz Lopes. Universidade Federal do Acre, fevereiro 2017. **Influência de altas temperaturas ambientais na taxa de gestação e no desenvolvimento inicial de embriões nelore produzidos *in vitro* no estado do Acre.** Orientador: Rafael Augusto Satrapa. Considerando as altas temperaturas que o clima tropical proporciona à maioria do território brasileiro e os efeitos do estresse térmico nos processos reprodutivos, o objetivo do presente estudo foi analisar, nos meses mais quentes dos anos de 2014 a 2016, as taxas de gestação (TG) e de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos Nelore no Estado do Acre. Para tanto, oócitos foram aspirados (aspiração folicular guiada por ultrassonografia), maturados, fertilizados com sêmen de touros da raça Nelore, cultivados por 6 dias e, posteriormente inovulados em receptoras mestiças. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 e 60 dias após a inovulação. Os dados meteorológicos obtidos e as taxas de PIV foram analisadas por ANOVA as TG por Qui-quadrado. As taxas de PIV não diferiram significativamente entre os meses mais quentes dos anos estudados, porém a taxa de gestação foi estatisticamente inferior nos meses mais quentes de 2014 a 2016 em relação aos outros meses do ano. Além disso, as temperaturas aumentaram notadamente no decorrer dos anos. Dessa forma, estratégias para melhorar o conforto térmico terão cada vez mais importância na produção animal.

Palavras-chave: PIV, blastocisto, oócito

ABSTRACT

CORDEIRO, Andrey Luiz Lopes. Universidade Federal do Acre, February 2017. **Influence of a high temperature environment on pregnancy rate and initial development of nelore embryos produced *in vitro* in Acre state.** Advisor: Rafael Augusto Satrapa. Considering high temperatures that the tropical climate provides to most of Brazilian territory and the effects of thermal stress in reproductive processes, the objective of the present study was to analyze, in the hottest months of 2014 to 2016, *in vitro* production (PIV) of Nelore bovine embryos in Acre State. For this purpose, oocytes were aspirated (ultrasound guided follicular aspiration), matured, fertilized with Nelore bulls semen, cultured for 6 days, and after that embryos were transferred to crossbred recipients. The pregnancy diagnosis was performed 30 and 60 days after the insemination. The meteorological data obtained and IVP rates were analyzed by ANOVA. Conception rates were analyzed by chi-square. Rates of IVP did not differ significantly between the hottest months of the studied years, a fact that was not observed with conception rate, which was statistically lower in the warmer months of 2014 to 2016. In addition, temperatures increased notably in course of years. Thus, strategies to improve thermal comfort will be increasingly important in animal production.

Keywords: PIV, oocyte, blastocyst, conception rate

SUMÁRIO

	págs.
RESUMO	
ABSTRACT	
1 ARTIGO	1
1.1 Artigo 1	1

1 ARTIGO

1.1 Artigo 1

Taxa de gestação e de produção embrionária de vacas Nelore sob altas temperaturas no Acre

Andrey Luiz Lopes Cordeiro, Fernando de Andrade Souza, Helton Aparecido Garcia Gregianini, Jennifer Teodoro Ferreira Gregianini, Rafael Augusto Satrapa.

Submetido à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira em março de 2017.

1 **Introdução**

2 O conhecimento sobre o impacto do estresse térmico calórico (ETC) na
3 produção animal já é bastante difundido na sociedade científica. Porém, devido à
4 intensificação incessante na produção, esse assunto atrai cada vez mais a atenção dos
5 pesquisadores. Além disso, vive-se hoje em um planeta que sofre o processo de
6 aquecimento global, que fatalmente prejudica ainda mais o desempenho dos animais
7 (Segnalini et al., 2013). De acordo com Lee (1965), o ETC pode ser definido como a
8 soma de forças externas que modificam a temperatura corporal acima do seu estado de
9 repouso.

10 Entre os vários danos causados pelo estresse térmico, chama a atenção o
11 prejuízo que esse processo leva ao sistema produtivo do animal, sendo um dos
12 principais motivos para quedas de fertilidade em algumas épocas do ano. Além de agir
13 de forma direta na queda de rendimento reprodutivo, reações indiretas também
14 influenciam, como, redistribuição do fluxo sanguíneo entre os órgãos, redução na
15 ingestão de alimentos e alcalose respiratória (Wolfenson et al., 2000).

16 Outro fato agravante no processo de ETC é a variedade dos seus efeitos, que
17 podem agir simultaneamente ao aumento da temperatura corpórea, ou podem agir a
18 longo-prazo, onde os sinais só serão percebidos após alguns meses, dificultando sua
19 ligação com o ETC (Garcia-Ispierto et al., 2007).

20 Entre os vários processos reprodutivos que podem ser influenciados pelo ETC,
21 um dos mais sensíveis é o desenvolvimento oocitário. Em experimentos *in vitro*, altas
22 temperaturas aceleraram a maturação oocitária em vacas (Andreu-Vásquez et al.,
23 2010).

24 Em seu experimento, Pavani et al. (2015) mimetizaram situações de estresse
25 térmico durante o desenvolvimento dos oócitos *in vitro*. Para cada grau de temperatura

50 guiada por ultrassonografia (OPU) nos meses de Junho a Dezembro, entre os anos de
51 2014 a 2016.

52

53 **Produção *in vitro* de embriões (PIV)**

54

55 **Meios e Reagentes**

56 Todos os reagentes e meios foram provenientes da Sigma-Aldrich (St. Louis,
57 MO, USA), Gibco (Langley, OK, USA; soro fetal bovino), Vivimed (Ribeirão Preto,
58 SP, Brasil; Choriomon®) e Hertape Calier (Juatuba, MG, Brasil; Pluset®). O processo
59 de produção *in vitro* de embriões foi realizado com base em Satrapa et al. (2011).

60 **Recuperação e classificação dos oócitos**

61 A aspiração folicular guiada por ultrassom (“ovum pick-up”- OPU; ultrassom
62 equipado com transdutor setorial intravaginal de 7,5 MHz e um dispositivo guia para
63 punção folicular) foi realizada em dia aleatório do ciclo estral, quando os folículos
64 foram identificados, e puncionados, utilizando-se agulhas 19G e uma pressão de vácuo
65 de 80 mmHg, correspondendo a um fluxo de 14ml de água/minuto. O líquido folicular
66 foi recuperado em tubos cônicos plásticos de 50ml, contendo DPBS ou PBS acrescido
67 de 1 % de soro fetal bovino (SFB) e 100 UI/ml de heparina sódica.

68 Posteriormente, os oócitos foram separados em um filtro de coleta de embriões
69 com malha de 80 µm (Millipore), depositados em um placa de petri e classificados de
70 acordo com as suas características celulares em quatro categorias: I) oócitos com
71 citoplasma homogêneo, circundados por três ou mais camadas compactas de células
72 do cumulus; II) oócitos com menos de três camadas de células do cumulus ou
73 parcialmente desnudos, porém com granulação homogênea no citoplasma; III) oócitos
74 circundados apenas por células da corona radiata; IV) oócitos desnudos.

75 **Maturação *in vitro***

76 Os complexos cumulus-oophorus (COCs) classificados como categoria I, II e
77 III foram lavados três vezes em meio TCM 199 com HEPES contendo 10% de soro
78 fetal bovino (SFB), 2 µg/ml de piruvato e 75 µg/ml de gentamicina. Posteriormente,
79 os oócitos foram lavados duas a três vezes no meio de maturação e distribuídos em 4
80 gotas contendo 90 µL de meio de maturação, com uma média de 25 oócitos por gota,
81 cobertas com 3,5ml de óleo mineral em placas de Petri (Corning®) de 35 x 10 mm. O
82 meio de maturação utilizado foi o TCM 199 com bicarbonato contendo 10% de SFB,
83 2 µg/ml de piruvato, 75 µg/ml de gentamicina, 20 µg/ml de FSH (Pluset®) e 10 UI/ml
84 de LH (Choriomon®). Os meios, preparados com 2 horas de antecedência, foram
85 mantidos a 39 °C em incubadora. A maturação do COCs foi realizada em incubadora
86 a 39 °C (5 % de CO₂ em ar), durante 22 - 24 horas.

87 **Preparo do sêmen e fertilização *in vitro***

88 Foi utilizado sêmen de touros da raça Nelore previamente testados de acordo
89 com suas taxas de produção *in vitro*. Para reduzir o efeito individual do touro, foram
90 selecionados 17 animais diferentes, porém com taxas de produção *in vitro*
91 homogêneas.

92 O descongelamento do sêmen foi realizado em água a 37 °C por 30 segundos.
93 Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a superfície do gradiente de Percoll com
94 densidade descontínua (2ml a 45% sobre 2ml a 90%) em tubo cônico de 15ml e
95 centrifugado a 900Xg por 30 minutos. Durante a centrifugação do sêmen, os oócitos
96 já maturados foram lavados três vezes no meio TCM 199 com HEPES e uma vez no
97 meio de fertilização, antes de serem transferidos para gotas do mesmo meio
98 (fertilização) cobertas com 3,5ml de óleo mineral em placas de Petri de 35 mm x 10
99 mm.

100 Após a centrifugação, os espermatozoides viáveis obtidos do sedimento foram
101 submetidos à avaliação de motilidade e concentração (câmara de Neubauer) e diluídos
102 em volume apropriado do meio de fertilização para se obter uma concentração de $1 \times$
103 10^6 espermatozoides/ml. Em seguida, foi realizada a fertilização dos oócitos utilizando
104 $10 \mu\text{L}$ de sêmen diluído por gota. O processo de fertilização foi realizado por um
105 período de 10 a 12 horas a 39°C em 5% de CO_2 em ar. O meio de fertilização era
106 composto por TALP-FIV suplementados com 6 mg/ml BSA livre de ácidos graxos, 2
107 $\mu\text{l/ml}$ de piruvato, 75 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 11 $\mu\text{g/ml}$ de heparina e 44 $\mu\text{l/ml}$ de
108 solução de Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina (PHE).

109 **Cultivo *in vitro*, inovulação dos embriões e diagnóstico de gestação**

110 De 10 a 12 horas após a fertilização, os prováveis zigotos foram lavados em
111 meio TCM 199 com HEPES e por último, em meio de cultivo, sendo então transferidos
112 para gotas de meio de cultivo de $90 \mu\text{L}$ (20 a 25 estruturas por gota), cobertas com
113 óleo mineral, em placas de Petri de 35 mm. Utilizou-se o meio de cultivo SOF
114 (“synthetic oviduct fluid”), SFB, acrescidos de BSA (5%) e piruvato de sódio (0,2%).

115 Os embriões foram cultivados em incubadora a 39°C (5 % de CO_2 em ar),
116 durante 6 dias e posteriormente envazados em palhetas e imediatamente inovulados,
117 sempre pelo mesmo técnico, em receptoras mestiças previamente selecionadas e
118 sincronizadas. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 e 60 dias após a inovulação
119 dos embriões (DP2200VET e transdutor retal de 5,0 MHz, Mindray®).

120 **Dados meteorológicos e análise estatística**

121 Os dados meteorológicos dos anos 2014, 2015 e 2016 nos municípios de Rio
122 Branco-AC e Bujari-AC foram obtidos no site do Instituto Nacional de Meteorologia
123 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (www.inmet.org.br).

124 As análises estatísticas dos dados meteorológicos e das taxas de produção de
125 blastocisto e gestação foram realizadas de forma comparativa entre os meses de cada
126 ano, e não entre os parâmetros meteorológicos ou reprodutivos. As médias das
127 temperatura máxima, precipitação pluvial e umidade relativa do ar, além da taxa de
128 produção de blastocisto foram analisadas e comparadas por ANOVA (programa
129 Minitab for Mac; Copyright 2016, Minitab), sendo as diferenças consideradas
130 significativas quando o $p < 0,05$. Para análise estatística das taxas de gestação, os dados
131 foram arranjados em tabelas de contingências e analisados pelo teste de Qui-quadrado,
132 a 95% de probabilidade.

133

134

Resultados e Discussão

135 No ano de 2014 (Figura 1), entre junho a agosto foram registrados os menores
136 índices de precipitação ($1,17 \pm 0,6$ mm; $0,40 \pm 0,2$ mm; $2,55 \pm 1,3$ mm, respectivamente;
137 $p < 0,05$), quando comparados aos outros meses do ano. Além disso, quando as médias
138 das temperaturas máximas foram comparadas, verificou-se que os meses de agosto,
139 setembro e outubro apresentaram os maiores valores de 2014 ($33,3 \pm 0,6$ °C; $34,3 \pm 0,5$
140 °C e $33,1 \pm 0,6$ °C, respectivamente; $p < 0,05$). Entretanto, mesmo a PIV sendo realizada
141 no período mais quente do ano, as taxas de blastocisto ($44,5 \pm 3,2\%$, $50,8 \pm 3,4\%$,
142 $40,5 \pm 4,0\%$, $41,6 \pm 4,3\%$ e $42 \pm 1,4\%$, respectivamente) não diferiram significativamente
143 entre os meses analisados, fato que não foi observado com a taxa de gestação, a qual
144 foi estatisticamente superior em agosto ($55,7\%$), quando comparada aos demais meses
145 estudados ($43,2\%$; 43% ; $47,9\%$ e $32,5\%$, respectivamente) (Tabela 1). Estes resultados
146 observados em 2014 indicam uma possível influência do estresse térmico calórico
147 (ETC) no desempenho reprodutivo, evidenciada pela queda na taxa de gestação dos
148 animais nos meses subsequentes a agosto.

Blastocistos/Estruturas cultivadas			
Mês	2014	2015	2016
Junho	-----	-----	126/282 (45,5%)
Julho	-----	-----	348/685 (56,2%)
Agosto	331/763 (44,5%)	412/1092 (44,5%)	194/464 (41,3%)
Setembro	273/473 (50,8%)	226/495 (49,6)	63/122 (44,8%)
Outubro	186/450 (40,5%)	194/439 (41,7%)	69/125 (52,1%)
Novembro	178/392 (41,6%)	203/396 (51,8%)	-----
Dezembro	80/182 (42%)	-----	-----

149

150 **Tabela 1.** Valores absolutos de blastocistos e estruturas cultivadas entre os meses de junho e
151 dezembro nos anos 2014, 2015 e 2016.

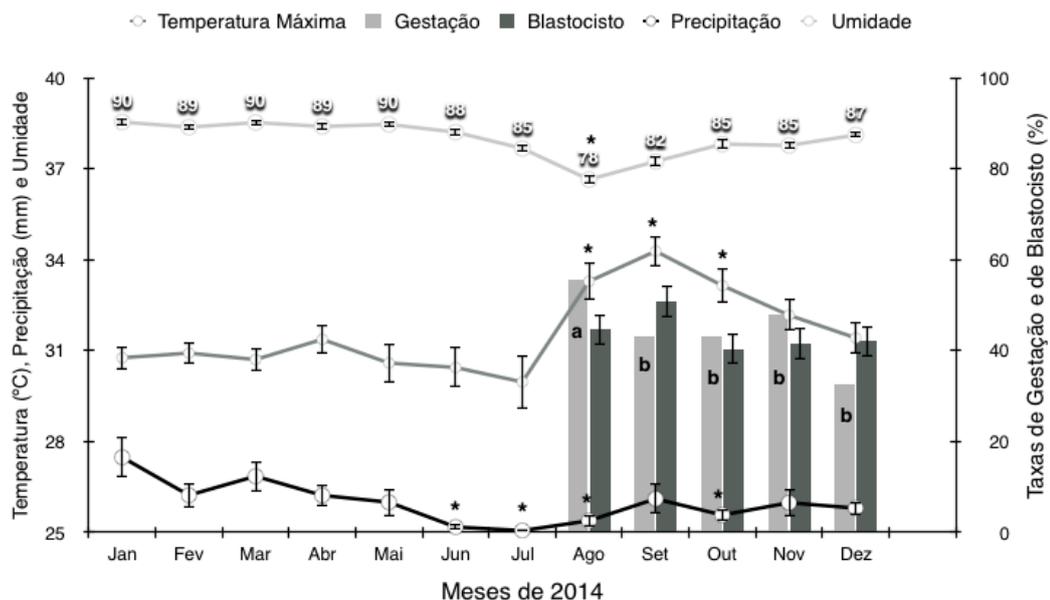
152

Prenhez/Transferências			
Mês	2014	2015	2016
Junho	-----	-----	54/96 (56,2%)
Julho	-----	-----	82/175 (48,9%)
Agosto	93/167 (55,7%)	143/300 (47,6%)	27/63 (42,9%)
Setembro	73/169 (43,2%)	65/127 (51,2%)	12/36 (33,4%)
Outubro	43/100 (43%)	50/121 (41,3%)	11/18 (61,1%)
Novembro	45/94 (47,9%)	72/125 (57,6%)	-----
Dezembro	13/40 (32,5%)	-----	-----

153

154 **Tabela 2.** Valores absolutos de prenhez e transferências embrionárias entre os meses de
155 junho e dezembro nos anos 2014, 2015 e 2016.

156



157

158 **Figura 1.** Temperatura máxima (°C), precipitação (mm), umidade (%), taxas de gestação e de
 159 blastocisto (média ± EPM) produzidos *in vitro*, oriundos de oócitos de vacas da raça Nelore
 160 criadas no estado do Acre no ano de 2014. Letras diferentes, $p < 0,05$; * $p < 0,05$.

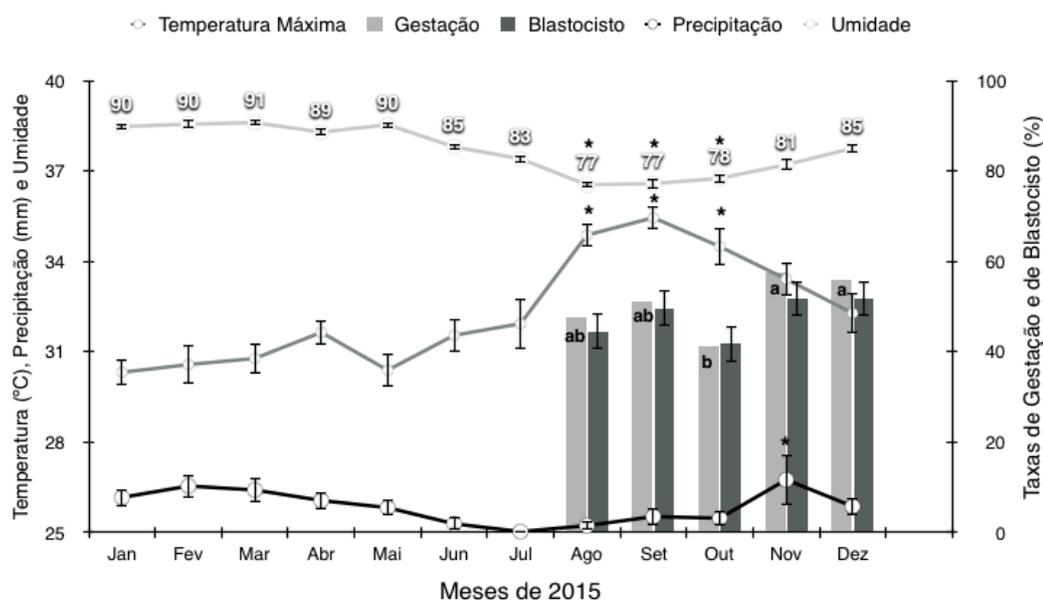
161

162 Mesmo sendo um dos meses mais quente do ano, em agosto de 2014 foi
 163 registrada a maior taxa de gestação. Levando-se em consideração a influência da
 164 umidade relativa do ar no conforto térmico animal, este registro se deve,
 165 provavelmente, ao fato da média da umidade relativa do ar neste mês ter sido a menor,
 166 (78±0,9%) quando comparada com as dos meses subsequentes (82±1,1%, 85±1,1%,
 167 85±0,8% e 87±0,6%, respectivamente; $p < 0,05$). Além disso, as menores temperaturas
 168 nos meses imediatamente anteriores também podem ter propiciado um maior conforto
 169 térmico e influenciado positivamente a taxa de gestação no mês de agosto.

170

171 No que se refere a 2015 (Figura 2), os meses de agosto, setembro e outubro
 172 também foram os mais quentes (38,9±0,36 °C; 35,4±0,37 °C; 34,5±0,61 °C,
 173 respectivamente; $p < 0,05$) e os menos úmidos (77±0,7%, 77±1,1% e 81±0,94%,
 174 respectivamente; $p < 0,05$) do ano. As taxas de gestações de novembro foram
 estatisticamente superiores (57,6%), quando comparadas com as de outubro (41,3%).

175 Entretanto, as taxas de gestação dos meses de agosto e setembro (47,6% e 51,2%,
 176 respectivamente) foram semelhantes às observadas nos meses de outubro, novembro
 177 e dezembro ($p>0,05$). Além disso, não houve diferença significativa entre os valores
 178 da PIV nos meses analisados ($44,5\pm 4,8\%$; $49,6\pm 4,7\%$; $41,7\pm 3,2\%$; $51,8\pm 3,9\%$,
 179 respectivamente).



180

181 **Figura 2.** Temperatura máxima (°C), precipitação (mm), umidade (%), taxas de
 182 gestação e de blastocisto (média \pm EPM) produzidos *in vitro*, oriundos de oócitos de
 183 vacas da raça Nelore criadas no estado do Acre no ano de 2015. Letras diferentes,
 184 $p<0,05$; * $p<0,05$.

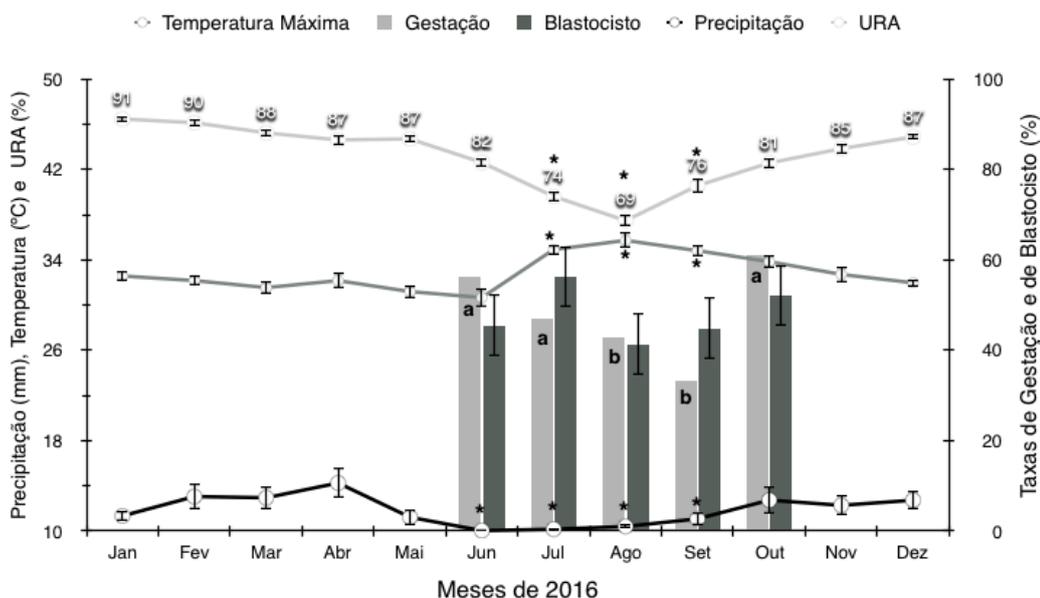
185

186 Diferentemente de 2014, no ano de 2015 a possível influência do ETC sobre a
 187 taxa de gestação só foi evidenciada no mês de outubro, quando comparada às dos
 188 meses de novembro e dezembro. Uma provável explicação para este resultado se deve
 189 ao fato de que o período de maior precipitação do ano de 2015 ocorreu exatamente no
 190 mês de novembro ($11,7\pm 5,5$ mm; $p<0,05$). Acredita-se que o aumento no volume de
 191 chuvas levou a uma maior oferta e melhor qualidade de alimento (pastagem,
 192 principalmente) para as receptoras de embriões utilizadas que, em balanço energético

193 positivo, apresentaram melhores condições para o desenvolvimento embrionário
194 intrauterino, culminando com melhores taxas de gestação (Robinson et al., 1999).

195 Já em 2016 (figura 3), de junho a setembro, foram registrados os menores índices
196 de precipitação de chuva ($0,06 \pm 0,05$ mm; $0,37 \pm 0,3$ mm; $0,98 \pm 0,5$ mm e $2,67 \pm 1,4$ mm,
197 respectivamente; $p < 0,05$), quando comparados aos outros meses do ano. Por sua vez,
198 quando os meses de julho, agosto e setembro foram analisados e comparados com os
199 demais, verificou-se que estes apresentaram as maiores temperaturas máximas médias
200 ($34,9 \pm 0,4$ °C; $35,7 \pm 0,7$ °C e $34,8 \pm 0,6$ °C, respectivamente; $p < 0,05$) e os menores
201 valores de umidades relativas do ar ($74 \pm 1,4\%$, $69 \pm 1,6\%$ e $76 \pm 1,1\%$, respectivamente;
202 $p < 0,05$).

203 De forma semelhante ao que ocorrera em 2014 e 2015, as taxas de blastocisto
204 ($45,5 \pm 9,4\%$; $56,2 \pm 2,9\%$; $41,3 \pm 3,8\%$; $44,8 \pm 7,4\%$ e $52,1 \pm 6,8\%$, respectivamente) não
205 diferiram significativamente entre os meses analisados no ano de 2016. Porém, as taxas
206 de gestação observadas nos meses de agosto e setembro ($42,9\%$ e $33,4\%$,
207 respectivamente) foram estatisticamente inferiores as dos meses de junho, julho e
208 outubro ($56,2\%$; $48,9$ e $61,1\%$, respectivamente). Com exceção de julho, os meses
209 mais quentes foram os mesmos meses que os animais apresentaram baixo desempenho
210 reprodutivo, evidenciando a relação inversamente proporcional entre a temperatura
211 ambiente e a eficiência na concepção embrionária e gestacional, fato semelhante ao
212 ocorrido em 2014.



213

214 **Figura 3.** Temperatura máxima (°C), precipitação (mm), umidade (%), taxas de
 215 gestação e de blastocisto (média ± EPM) produzidos *in vitro*, oriundos de oócitos de
 216 vacas da raça Nelore criadas no estado do Acre no ano de 2016. Letras diferentes,
 217 $p < 0,05$; * $p < 0,05$.

218

219 Uma das diferenças mais notáveis entre os animais *Bos taurus* e *Bos indicus*
 220 são as adaptações que cada espécie desenvolveu para sobreviverem em suas
 221 respectivas regiões. O gado zebuino, predominante em regiões tropicais, apresentam
 222 um melhor desempenho em situações de estresse térmico (Eberhardt et al., 2009;
 223 Satrapa et al., 2011; Nabhan et al., 2011).

224 Nabhan et al. (2011) observaram maior adaptabilidade de animais zebuínos no
 225 que se refere ao ETC. Em seu experimento, os embriões puros Nelore apresentaram
 226 melhor desempenho na PIV que embriões mestiços das raças Holandesa, Brahman e
 227 Angus, corroborando os resultados do presente estudo, em que embriões da raça
 228 Nelore não sofreram reduções no desenvolvimento embrionário *in vitro*, mesmo nos
 229 meses mais quentes do ano.

230 De forma semelhante, Eberhardt et al. (2009), analisando o desempenho de
 231 embriões Nelore, Holandês e mestiços expostos ao ETC em estufa (42 °C por 12

232 horas), observaram que a redução nas taxas de PIV foi mais evidentes em embriões
233 que tinham genótipo predominantemente taurino. De acordo com Hansen et al. (2004),
234 isso se deve a genes presentes nos animais zebuínos que promovem a proteção de suas
235 células contra os efeitos deletérios do ETC.

236 Apesar deste experimento ter utilizado somente vacas *Bos indicus* (Nelore), ou
237 seja, animais adaptados às temperaturas tropicais, outros autores observaram
238 influência do ETC nas taxas de desenvolvimento *in vitro* embrionário. Pavani et al.
239 (2015) relatam uma variação nas taxas de PIV em vacas Holandesas de $53,8\% \pm 5.8$ nos
240 meses mais frios para $36.3\% \pm 3.3$ nos meses quentes do ano. Além disso, Rocha et al.,
241 (1998), utilizando animais Brahman e Holandês, observaram taxas de produção de
242 blastocisto e mórula superiores na estação fria (29% e 34,2%, respectivamente) quando
243 comparadas às da estação quente, no qual o desempenho foi de 0% em ambas as raças.

244 O ETC age na cinética das divisões meióticas, prejudicando diretamente os
245 processos de clivagem. Dessa forma, a maioria dos efeitos são observados no estágio
246 de zigoto, com menor intensidade na mórula e no blastocisto (Gendelman et al., 2012).
247 No embrião, o ETC age de diferentes formas, a maioria causando sua morte: interfere
248 na síntese de proteínas, apoptose generalizada e danos celulares oxidativos (Paula-
249 Lopes & Hansen, 2002; Wolfenson et al., 2000;).

250 Estudos relatam que oócitos recuperados em períodos mais quentes possuem
251 menor habilidade para se desenvolverem em embriões, quando comparados com
252 oócitos aspirados em períodos com temperaturas mais agradáveis para o animal
253 (Ferreira et al., 2011; Pavani et al., 2015; Macedo et al., 2014). Esses resultados são
254 conflitantes aos do presente experimento, no qual as taxas de PIV não diferiram entre
255 os meses estudados de 2014 a 2016. Entretanto, foi observada influência do ETC nas
256 taxas de gestação dos embriões produzidos *in vitro*. O ETC pode comprometer o

257 crescimento embrionário até o dia 17 de vida do embrião (Biggers et al., 1987), que é
258 um momento chave em seu desenvolvimento devido à produção do interferon-tau
259 (Spencer et al., 2007). Essa substância evita o processo de luteólise, mantendo a
260 produção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo (Spencer et al., 2007).

261 Em seu experimento na Espanha, Garcia-Ispuerto et al. (2007) observaram
262 quedas na taxa de gestação a partir de 31 °C no dia da inseminação artificial (IA), ou
263 até 3 dias antes. Estes resultados vão de encontro com os do presente experimento,
264 onde a taxa de gestação foi significativamente menor nos meses mais quentes dos anos
265 analisados. De acordo com o mesmo autor, esta hipertermia pode ter prejudicado tanto
266 os espermatozoides, como os oócitos e embriões.

267 Pires et al. (2002), em um estudo feito no Brasil, observaram uma diminuição
268 nas taxas de gestação de vacas Holandesas nos meses mais quentes. Mantidas em um
269 sistema “free stall” durante todo o experimento, 71,2% das vacas emprenharam no
270 inverno, enquanto que no verão, esse valor caiu para 45,7%.

271 Em contrapartida, Silva et al. (2013) relataram que o ETC não afetou a
272 porcentagem de embriões que sobreviveram após a transferência, tanto em vacas
273 Nelore quanto em vacas Angus. Apesar disso, foi observada uma tendência para a
274 redução das taxas de gestação dos embriões provenientes das doadoras Angus.

275 Na Ilha Terceira, norte do oceano Atlântico, Pavani et al. (2015) relataram
276 taxas de gestação superiores ($63,8\% \pm 0,4$) no inverno e na primavera, quando
277 comparadas às observadas no verão e outono ($40,2\% \pm 1,5$), corroborando os resultados
278 do presente experimento, no qual se observou queda nas taxas de gestação nos meses
279 mais quentes dos anos de 2014 a 2016.

280 Embora os efeitos deletérios do ETC tenham ocorrido de forma quase imediata
281 nos animais do presente estudo, em um experimento com vacas da raça Gir (*Bos*

282 indicus), Torres-Júnior et al. (2008) não observaram efeitos imediatos do ETC nos
283 animais. Porém, efeitos como má competência oocitária, problemas no
284 desenvolvimento folicular e queda nas taxas de P4 prejudicaram o rebanho a longo-
285 prazo.

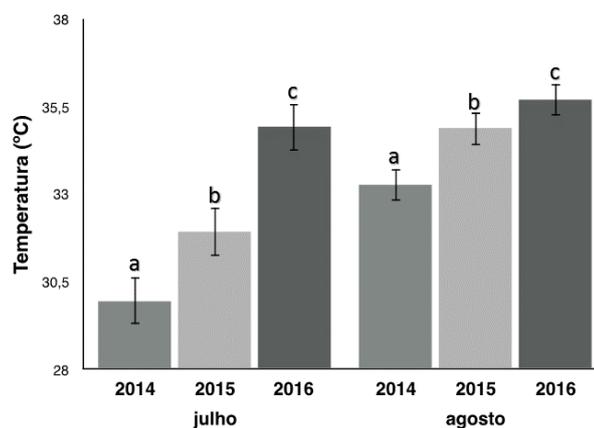
286 Em seu estudo, Roth et al. (2000), observaram uma diminuição na
287 concentração sanguínea de inibina em vacas com ETC e modificações na dinâmica
288 folicular. Essas alterações provocaram uma diminuição na dominância folicular,
289 levando a um tamanho elevado de folículos subordinados e ondas foliculares
290 alongadas. Ainda segundo o mesmo autor, esses animais, em condições de estresse
291 térmico, tendem a ovular o folículo dominante da segunda onda, que produz um oócito
292 envelhecido para a fertilização. Adicionalmente, mais de um folículo dominante
293 poderia se desenvolver no período pré-ovulatório, resultando em dupla ovulação
294 (Kornmatitsuk et al., 2008).

295 O ETC também pode prejudicar o crescimento dos folículos reduzindo a síntese
296 de estradiol (E2) e LH no pico pré-ovulatório (Hansen, 2007). Essa queda interfere na
297 maturação, ovulação dos folículos dominantes e dificulta a posterior luteinização
298 (Wolfenson et al., 2000).

299 Outro dado interessante observado no estudo foi o significativo aumento na
300 temperatura máxima média dos meses julho e agosto, entre os anos de 2014 e 2016
301 (Figura 4). Apesar de ser um tema ainda pouco discutido, o aumento da temperatura
302 global está acontecendo e produz efeitos diversos no cotidiano da população mundial
303 (Segnalini et al., 2013). Independente dos mecanismos e causas desse fenômeno, o
304 ETC tende a ser ainda mais impactante na produção animal.

305 A preocupação com a temperatura global aumentou na Europa, principalmente
306 nas propriedades que trabalham com vacas Holandesas de alta produção. Não obstante,

307 Hollweg et al. (2008) analisaram a dinâmica sazonal do Índice de Temperatura e
308 Umidade (ITU) e relataram que o aquecimento do continente europeu resultará no
309 aumento das temperaturas máxima, ao invés de uma diminuição de temperaturas
310 mínimas, indo de encontro com os resultados do presente estudo. Além disso, o
311 número de dias com capacidade de promover estresse térmico aos animais aumentou
312 4,1% de 1973 a 2008 (Solymosi et al., 2010). Por sua vez, esse aumento nas
313 temperaturas atingirá não só a qualidade e competência oocitária e embrionária, mas
314 também a qualidade dos pastos, que terão sua composição e crescimento alterados,
315 afetando sua digestibilidade pelos ruminantes (Perring et al., 2010), influenciando
316 diretamente os eventos reprodutivos nesta espécie.



317

318 **Figura 4.** Temperaturas máximas (média ± EPM) dos meses de julho e agosto nos
319 anos de 2014 a 2016 no estado do Acre. Letras diferentes entre os anos, $p < 0,05$.

320

321 O presente experimento, mostrou a relação entre o ETC e o desempenho
322 reprodutivo dos animais, quando inovulações embrionárias realizadas nos meses mais
323 quentes do ano tiveram suas taxas de êxito comprometidas. A técnica de OPU, bem

324 como a qualidade dos meios utilizados na PIV, se mostraram eficientes em manter as
325 taxas de desenvolvimento embrionário inicial de forma homogênia durante toda a
326 estação de monta, mesmo os oócitos sendo aspirados de vacas sob um possível
327 influência do ETC. Apesar do Brasil contar com animais rústicos e adaptados, cabe ao
328 produtor rural adotar estratégias que incrementem o conforto térmico animal,
329 minimizando os efeitos deletérios do ETC. Há várias formas de reduzir o impacto do
330 ETC na produção animal, entre elas estão a criação de sombreamento, seja artificial
331 ou natural, e a adoção de sistemas de resfriamento utilizando vaporização de água
332 (Dash et al., 2016).

333 **Conclusões**

334 Mesmo a PIV sendo realizada nos períodos mais quente dos anos de 2014 e
335 2016, as taxas de blastocisto não variaram entre os meses analisados, fato que não foi
336 observado com as taxas de gestação, as quais foram possivelmente influenciadas pelo
337 estresse térmico calórico. Além disso, houve um significativo aumento da temperatura
338 máxima média nos meses de julho e agosto, nos anos de 2014 a 2016.

339 Desta forma, mesmo em animais considerados adaptados e resistentes ao ETC
340 (*ex. Bos indicus*), o melhor entendimento dos efeitos deletérios deste estresse se mostra
341 fundamental e importantes para que seus impactos na produção e reprodução sejam
342 minimizados.

343

- 346 ANDREU-VÁZQUEZ, C.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; MAYA-
347 SORIANO, M.J.; HUNTER, R.H.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Does heat stress provoke the
348 loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during
349 oocyte maturation? **Zygote**, v.18, p.293–299, 2010.
- 350 BIGGERS, B.G.; GEISERT, R.D.; WETTEMAN, R.P.; BUCHANAN, D.S. Effect of
351 heat stress on early embryonic development in the beef cow. **Journal of Animal**
352 **Science**, v.64, p.1512–1518, 1987.
- 353 DASH, S.; CHAKRAVARTY, A.K.; SINGH, A.; UPADHYAY, A.; SINGH, M.;
354 YOUSUF, S. Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and
355 buffaloes: A review. **Veterinary World**, v.9, n.3, p.235-244, 2016.
- 356 EBERHARDT, B.G.; SATRAPA, R.A.; CAPINZAIKI, C.R.; TRINCA, L.A.;
357 BARROS, C.M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus*
358 *taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on
359 the resistance of bovine embryos to heat. **Animal Reproduction Science**, v.114, n.1,
360 p.54-61, 2009.
- 361 FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M.R.; FERRAZ, M.L.; ARAÚJO,
362 A.B.; RODRIGUES, C.A.; WATANABE, Y.F.; VIREQUE, A.A.; JOAQUIM, D.C.;
363 SMITH, L.C.; MEIRELLES, F.V.; BARUSELLI, P.S. The low fertility of repeat-
364 breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to
365 develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.2383-2392, 2011.
- 366 GARCIA-ISPIERTO, I.; LOPEZ-GATIUS, F.; BECH-SABAT, G.; SANTOLARIA,
367 P.; YANIZ, J.L.; NOGAREDA, C.; DE RENSIS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Climate
368 factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain.
369 **Theriogenology**, v.67, p.1379–1385, 2007.
- 370 GENDELMAN, M.; ROTH, Z. In vivo vs. *in vitro* models for studying the effects of
371 elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence
372 and gene expression. **Animal Reproduction Science**, v.134, p.125-134, 2012.
- 373 HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress.
374 **Animal Reproduction and Science**, v.82– 83, p.349–60, 2004.
- 375 HANSEN, P.J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic
376 resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during
377 heat stress. **Theriogenology**, v.68, n.1, p.242-249, 2007.
- 378 HOLLWEG, H.D.; BOHM, U.; FAST, I.; HENNEMUTH, B.; KEULER, K.; KEUP-
379 THIEL E.; LAUTENSCHLAGER, M.; LEGUTKE, S.; RATKE, K.; ROCKEL, B.;
380 SCHUBERT, M.; WOLDT, M.; WUNRAM, C. Ensemble simulations over Europe
381 with the regional climate model CLM forced with IPCC AR4 global scenarios. **M &**
382 **D Technical Report**, v.3, p.2008, 2008.

- 383 KORNMATITSUK, B.; CHANTARAPRATEEP, P.; KORNMATITSUK, S.;
384 KINDAHL, H. Different Types of postpartum luteal activity affected by the exposure
385 of heat stress and subsequent reproductive performance in holstein lactating cows.
386 *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, p.515-519, 2008.
- 387 LEE, D.H. Climatic stress indices for domestic animals. **International Journal of**
388 **Biometeorology**, v.9, p.29–35, 1965.
- 389 MACEDO G.G.; COSTA E SILVA E.V.; PINHO R.O.; ASSUMPÇÃO T.I.;
390 JACOMINI J.O.; SANTOS R. M.; MARTINS L. F. O estresse por calor diminui a
391 fertilidade de fêmeas bovinas por afetar o desenvolvimento oocitário e embrionário.
392 *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.38, n.2, p.80-85, 2014.
- 393 NABHAN, T.; SATRAPA, R.A.; SIMOES, R.A.L.; SILVA, C.F.; RAZZA, E.M.;
394 PUELKER, R.Z.; TRINCA, L.; BARROS, C.M. Influência da raça do touro (*Bos*
395 *indicus* x *Bos taurus*) na tolerância ao estresse térmico calórico de embriões bovinos
396 produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**,
397 v.48, n.4, p.336-343, 2011.
- 398 PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine
399 preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and**
400 **Biophysical Research Communications**, v.295, p.37-42, 2002.
- 401 PAVANI, K.; CARVALHAIS, I.; FAHEEM, M.; CHAVEIRO, A.; REIS, F.V.; DA
402 SILVA, F.M. Reproductive performance of Holstein dairy cows grazing in dry-
403 summer subtropical climatic conditions: effect of heat stress and heat shock on meiotic
404 competence and *in vitro* fertilization. **Asian-Australasian journal of animal**
405 **sciences**, v. 28, n. 3, p. 334, 2015.
- 406 PERRING, M.; CULLEN, B.R.; JOHNSON, I.R.; HOVENDEN, M.J. Modelled
407 effects of rising CO2 concentration and climate change on native perennial grass and
408 sown grass-legume pastures. **Climate Research**, v.42, n.1, p.65-78, 2010.
- 409 PIRES, M.F.; FERREIRA, A.M.; SATURNINO, H.M.; TEODORO, R.L. Taxa de
410 gestação em fêmeas da raça Holandesa confinadas em free stall, no verão e inverno.
411 **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, p.57-63, 2002.
- 412 PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.;
413 SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCINATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.;
414 FAIBER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale *in*
415 *vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and
416 *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1349-1355,
417 2010.
- 418 ROBINSON, J.J.; SINCALIR, K.D.; MCEVOY, T.G. Nutritional effects on foetal
419 growth. **Journal of Animal Science**, v.68, p.315-332, 1999.
- 420 ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R.; LIM, J.M.; BLAIR, R.M.;
421 ROUSSEL, J.D.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. High environmental temperature and
422 humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows.
423 **Theriogenology**, v.49, n.3, p.657-665, 1998.

- 424 ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and
425 delayed effect of heat stress on follicular development and its association with plasma
426 FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**,
427 v.120, p.83–90, 2000.
- 428 SATRAPA, R. A.; NABHAN, T.; SILVA, C. F.; SIMÕES, R. A. L.; RAZZA, E. M.;
429 PUELKER, R. Z.; TRINCAB, L. A.; BARROS, C. M. Influence of sire breed (*Bos*
430 *indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat
431 stress tolerance *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.76, n.6, p.1162-
432 7, 2011.
- 433 SCHULLER, L.K.; BURFEIND, O.; HEUWIESER, W. Impact of heat stress on
434 conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different
435 temperature humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load
436 indices. **Theriogenology**, v.81, p.1050-1057, 2014.
- 437 SEGNALINI, M.; BERNABUCCI, U.; VITALI, A.; NARDONE, A.; LACETERA,
438 N. Temperature humidity index scenarios in the Mediterranean basin. **International**
439 **Journal of Biometeorology**, v.57, p.451–458, 2013.
- 440 SILVA, C.F.; SARTORELLI, E.S.; CASTILHO, A.C.S.; SATRAPA, R.A.;
441 PUELKER, R.Z.; RAZZA, E.M.; TICIANELLI, J.S.; EDUARDO, H.P.; LOUREIRO,
442 B.; BARROS, C.M. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos*
443 *indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v.79, n.2, p.351-
444 357, 2013.
- 445 SOLYMOSI, N.; TORMA, C.; KERN A.; MARÓTI-AGÓTS, Á.; BARCZA, Z.;
446 KONYVES, L.; BERKE, O.; REICZIGEL, J. Changing climate in Hungary and trends
447 in the annual number of heat stress days. **International journal of biometeorology**,
448 v.54, n.4, p.423-431, 2010.
- 449 SPENCER, T.H.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C.;
450 PALMARINI, M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic
451 ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses.
452 **Reproduction Fertility and Development**, v.19, p.65–78, 2007.
- 453 TORRES-JÚNIOR, JR. de S.; DE FA PIRES, M.; DE SA, W.F.; FERREIRA, A.D.M.;
454 VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.D.A.; RAMOS, A.A.; FOLHADELA, I.M.;
455 POLISSENI, J.; DE FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; DE SÁ FILHO, M.S.,
456 PAULA-LOPES, F.F; BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular
457 growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.69, n.2,
458 p.155-166, 2008.
- 459 WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat stressed
460 cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**. v.60-61, p.535-547,
461 2000.