

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA
PARAÍBA – CAMPUS SOUSA
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Aldcejam Martins da Fonseca Junior

INFLUÊNCIA DO SOMBREAMENTO ARTIFICIAL NA QUALIDADE DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS NO SEMIÁRIDO

SOUSA-PB

2017

Aldcejam Martins da Fonseca Junior

INFLUÊNCIA DO SOMBREAMENTO ARTIFICIAL NA QUALIDADE DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS NO SEMIÁRIDO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado, como parte das
exigências para a conclusão do
Curso de Graduação de
Bacharelado em Medicina
Veterinária do Instituto Federal
da Paraíba, Campus Sousa.

Orientador: M.Sc. Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira

SOUSA, PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DO IFPB CAMPUS SOUSA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A ficha catalográfica deverá ser elaborada exclusivamente por profissional Bibliotecário e solicitada pelo discente com 48 horas de antecedência pelo e-mail biblioteca.ss@ifpb.edu.br com os seguintes dados:

- Folha de Rosto e Resumo do TCC;
- Número total de Páginas.

Obs.: A mesma deverá ser impressa no verso da folha de rosto do TCC, posicionada conforme este modelo.

Aldcejam Martins da Fonseca Junior

INFLUÊNCIA DO SOMBREAMENTO ARTIFICIAL NA QUALIDADE DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS NO SEMIÁRIDO

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em _____ pela
Comissão Examinadora:

Orientador (a):

M.Sc. Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira
Professor, IFPB – Campus Sousa

Avaliadores (a):

M.Sc. Eduardo Santiago Beltrão
Professor, IFPB – Campus Sousa

D.Sc. Ana Valéria Mello de Souza Marques
Professora, IFPB Campus Sousa

SOUSA, PB

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de conclusão a cada um dos animais utilizados neste experimento, bem como a cada criatura que nestes anos de estudo foram dispostas em prol do ensino de minha profissão. A estes, o meu mais sincero agradecimento e acima de tudo o meu mais explícito respeito e consideração pela importância inadvertida que tiveram e terão pelo decurso de minha vida e ofício.

AGRADECIMENTOS

A Deus. A energia em forma de amor que é fonte de toda alegria e satisfação. Muito obrigado pela oportunidade de estudar, aprender, sonhar e realizar.

À minha família, minha base de amor, educação e plataforma de vislumbre do mundo. Aqueles que nunca mediram esforços desde o berço para que eu pudesse buscar meus anseios, para que eu pudesse realizar meus sonhos, que vibraram comigo a cada degrau alcançado, por mais que isso significasse o exercício do desapego e o convívio com a saudade e a distância. A conexão eterna que além do sangue une nossas almas e corações. Muito obrigado por tê-los em minha vida e por serem como são.

Aos meus amigos, os quais muito me apoiaram em diversos momentos, sendo família, palavra amiga de incentivo e conforto, companhia para estudos, diversão, sonhos, batalhas e realizações. Parte do todo que estou hoje, tijolos da construção do meu ser, muito obrigado aos que passaram e aos que ficarão eternamente no meu coração.

Aos mestres professores, os gigantes de ombros largos que nos inspiram e nos puxam pela mão, nos mostrando que aprender e ensinar é mais que uma relação meramente acadêmica ou profissional. O meu muito obrigado pelas lições diárias, por compartilhar não apenas por obrigação a preciosidade que é o conhecimento.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação, com seu suor, trabalho, sorriso ou palavras. Muito obrigado aos que mesmo em distância, reservaram um pensamento de estima e desejo de vitória.

RESUMO: O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a qualidade de embriões de vacas leiteiras produzidos através de transferência de embrião por superovulação sob influência do sombreamento artificial no semiárido da Paraíba, microrregião de Sousa através da implementação do sombreamento artificial como alternativa para melhoria dos índices reprodutivos. Foram utilizadas oito vacas mestiças com o mesmo padrão racial, permanecendo nas mesmas condições de manejo nutricional. Houve dois grupos experimentais, quatro animais manejados em piquetes sem sombreamento artificial (controle) e quatro com a utilização de sombreamento artificial nas horas de maior incidência solar (das 7 às 13 horas) através da utilização de tela de polipropileno com 70% de proteção solar (tratamento), com área aproximada de 5m² por animal. Frequências respiratória e cardíaca e temperatura retal foram avaliadas bem como a temperatura do ar. Foi implementado protocolo de superovulação e realizadas inseminações artificiais. A coleta dos embriões foi realizada pelo método não cirúrgico através de lavagens uterinas sendo as estruturas recuperadas classificadas de acordo com o manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. A média global foi de 3,25 embriões por animal. Para o grupo controle houve média de 2,75 embriões por animal e para o grupo tratamento a média foi 3,75. Para o grupo controle, o índice de recuperação foi de 25%, enquanto que para o grupo tratamento foi de 83,33%. Não houve diferença significativa entre as fases embrionárias registradas, tendo predominância as fases iniciais de mórulas e blastocistos. Referente à qualidade embrionária o grupo controle apresentou melhores resultados, porém em linhas gerais ambos os grupos atingiram aproximadamente 80% de estruturas viáveis.

Palavras-chave: Estresse térmico. Oócitos. Transferência embrionária.

ABSTRACT: The present work had the objective of evaluating the embryo quality of dairy cows produced through embryo transfer by superovulation under the influence of artificial shading in the semiarid region of Paraíba, Sousa microregion, through the implementation of artificial shading as an alternative to improve reproductive indexes. Eight crossbred cows with the same racial pattern were used, remaining under the same conditions of nutritional management. There were two experimental groups, four animals managed in pickets without artificial shading (control) and four with the use of artificial shading in the hours of highest solar incidence (from 7 to 13 hours) through the use of polypropylene canvas with 70% of sun protection (treatment), with an approximate area of 5m² per animal. Respiratory and cardiac rates and rectal temperature were evaluated as well as air temperature. Superovulation protocol was implemented and artificial inseminations were performed. The collection of the embryos was performed by the non-surgical method through uterine washes and the recovered structures were classified according to the manual of the International Embryo Transfer Society. The overall mean was 3.25 embryos per animal. For the control group there was an average of 2.75 embryos per animal and for the treatment group the mean was 3.75. For the control group, the recovery rate was 25%, whereas for the treatment group it was 83.33%. There was no significant difference between the recorded embryonic phases, predominating the initial phases of morulae and blastocysts. Regarding the embryonic quality, the control group presented better results, but in general both groups reached approximately 80% of viable structures

Keywords: Embryo transfer. Oocytes. Thermal stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Zona de Termoneutralidade	15
Figura 2 – Imagem de bovino gerada a partir de câmara termográfica	16
Figura 3 – Animais do grupo tratamento sob as estruturas de sombreamento artificial	22
Figura 4 – Desenho esquemático do protocolo superovulação	23
Figura 5 – Laboratório de reprodução animal IFPB – Campus Sousa	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios para avaliação de embriões bovinos segundo os parâmetros de qualidade propostos pela IETS (1998)28
Tabela 2 – Classificação de embriões bovinos quanto ao estágio de desenvolvimento25
Tabela 3 – Índice de recuperação, número de embriões coletados, estágios e qualidade embrionária por grupo26
Tabela 4 – Resultados das temperaturas nos grupos de animais expostos ao sol e à sombra, durante os dias do protocolo de superovulação30
Tabela 5 – Análise dos dados de frequência cardíaca e respiratória entre os grupos31

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

±.....	Sinal de mais ou menos
°C.....	Graus Celsius
Aw.....	Tropical úmido e seco ou de savana - Köppen-Geiger
DIB.....	Dispositivo intravaginal bovino
DPBS.....	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EPV.....	Espaço perivitelínico
FC.....	Frequência cardíaca
FIV.....	Fertilização <i>in vitro</i>
FR.....	Frequência respiratória
GnRH.....	Hormônio liberador de gonadotrofina
IA.....	Inseminação artificial
IETS.....	International Embryo Transfer Society
IMS.....	Índice de matéria seca
IR.....	Índice de recuperação
LH.....	Hormônio luteinizante
$p < 0,05$	Probabilidade de significância
SOB.....	Superovulação
SPSS.....	Statistical Package for the Social Sciences
TA.....	Temperatura ambiental
TE.....	Transferência de embrião
TR.....	Temperatura retal
ZP.....	Zona pelúcida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1. Fisiologia reprodutiva no estresse térmico.....	14
2.2. Oogênese e embriogênese.....	17
2.3. Transferência embrionária.....	17
2.4. Coleta e avaliação embrionária.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Localização.....	21
3.2. Grupos Experimentais.....	21
3.3. Avaliação clínica e temperatura superficial.....	22
3.4. Temperatura ambiental.....	22
3.5. Protocolo de superovulação.....	23
3.6. Coleta e avaliação dos embriões.....	23
3.7. Análise dos dados.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Embriões.....	26
4.2. Temperaturas.....	30
4.3. Frequências fisiológicas.....	31
5. CONCLUSÃO.....	33
6. REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

Dois terços do território brasileiro estão situados na região tropical, onde há predominância de temperaturas elevadas e alta incidência de radiação solar e aproximadamente 64% do rebanho bovino mundial são criados em ambiente semelhante, o que representa um desafio para a pecuária mundial (AZEVEDO et al., 2005).

Na pecuária uma das principais alternativas para o aumento da eficiência produtiva é a otimização reprodutiva do rebanho (VIANA, 2006). Neste contexto as biotécnicas aplicadas à reprodução animal têm sido de enorme importância e produzido efeito positivo nos programas de melhoramento animal (FREITAS, 2007).

Em programas de transferência de embriões pouco se tem estudado a respeito do efeito das variáveis ambientais sobre as taxas de gestação. Tendo as regiões de alta temperatura ambiental e radiação elevada, reduzida eficiência da perda de calor e, com isso, incremento do estresse térmico do animal. (SILVA et al., 2011). Sendo o sombreamento um recurso de manejo importante, pois os efeitos negativos do estresse calórico sobre a produção e a reprodução em vacas são bastante significativos (AZEVEDO; ALVES, 2009).

Os bovinos conseguem identificar locais sombreados que oferecem maior proteção contra a radiação solar, a fim de amenizar o estresse calórico (SCHÜTZ et al., 2009). Porém, animais com aptidão leiteira apresentam maior consumo de alimentos, aumento da produção de calor metabólico e conseqüentemente têm dificuldade de equilíbrio térmico, quando submetidos a condições de calor ambiental (FERREIRA, 2012).

A função celular, como um todo, é influenciada negativamente pelo aumento exacerbado da temperatura corporal (KADZERE et al., 2002), dentre os efeitos deletérios do estresse térmico estão incluídas interferências reprodutivas ligadas aos oócitos, na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial. Tendo as temperaturas elevadas, uma relação inversa com a proporção de embriões transferidos que continuam seu desenvolvimento, culminando com uma menor eficiência reprodutiva (THATCHER et al., 2006). Dessa forma, promover conforto térmico ao animal parece preservar toda a dinâmica reprodutiva e a conseqüente gestação (ROCHA et al., 2012).

No que se refere à lactação em regiões semiáridas, o cenário se agrava devido às condições ambientais desfavoráveis para minimização de tal situação (FERRO et al., 2010). Justificando-se uma atenção especial às medidas mitigadoras de estresse térmico aplicadas aos

1 animais da cadeia leiteira. Desta forma, práticas que possibilitem melhoria na regulação
2 térmica garantindo uma melhor qualidade de folículos, oócitos e embriões nos protocolos
3 utilizados para a realização da transferência de embrião, como a utilização de sombreamento
4 artificial, possibilitariam uma melhoria nos resultados obtidos.

5 Diante deste preâmbulo e levando-se em consideração a importância da pecuária para
6 a região em estudo, objetivou-se nesse experimento, avaliar a qualidade de embriões de vacas
7 leiteiras produzidos através de transferência de embrião por superovulação sob influência do
8 sombreamento artificial no semiárido da Paraíba, microrregião de Sousa.

9

10

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

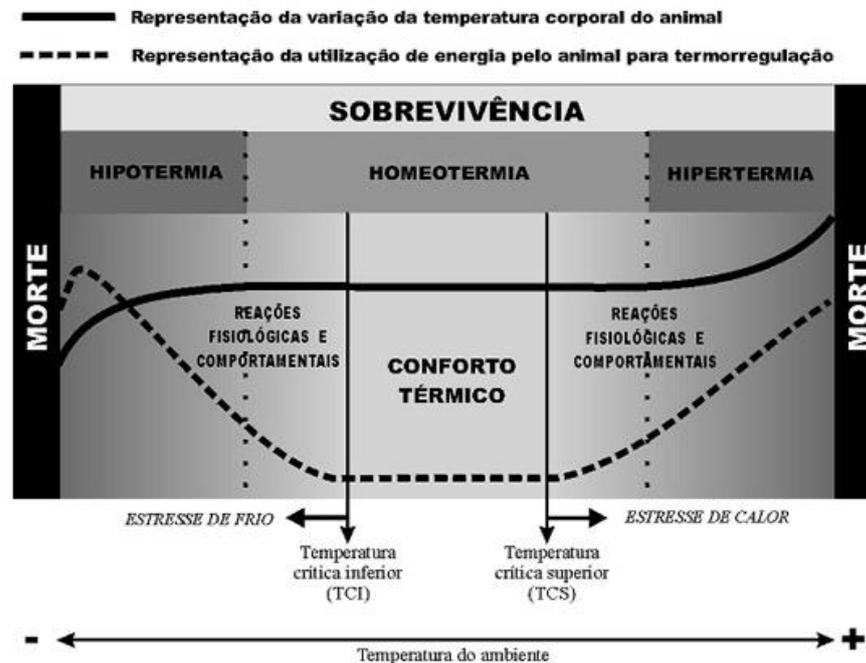
2.1.Fisiologia reprodutiva no estresse térmico

A radiação solar configura-se como principal responsável pelo acréscimo do calor corporal interno em animais expostos ao ar livre, sendo quase todo o calor absorvido proveniente desta, constituindo um dos principais causadores de estresse nos animais de produção (ALVES et al., 2014). Segundo Arcaro Junior et al (2005) as respostas fisiológicas iniciais em bovinos, em estresse térmico, incluem o aumento da frequência respiratória (FR) e frequência cardíaca (FC), bem como da temperatura da pele como na maioria das espécies domésticas (SOUZA et al., 2007).

Os efeitos da radiação direta causam grande preocupação no que se refere à reprodução animal, já que para se adaptar a um ambiente, o organismo sofre um conjunto de ajustes que em condições ambientais estressantes podem causar alterações nos parâmetros fisiológicos (MARTINS JÚNIOR et al., 2007). Em vacas leiteiras submetidas a estresse térmico, ocorrem interferências no controle endócrino comprometendo a maturação dos folículos e ovulação. Acarretando-se alterações nos níveis hormonais gonadais, exercendo influência no ciclo reprodutivo, que provoca a menor manifestação de estro e concepção, abortos e mortalidade embrionária (FERRO et al., 2010).

Os animais homeotérmicos, como mamíferos e aves, possuem a zona de termoneutralidade, nela os animais estão em conforto térmico e podem expressar seu máximo potencial genético. Também, existe uma zona de temperatura ambiental, na qual o animal consegue manter a sua homeotermia. Entretanto, o animal necessitará de ajustes fisiológicos, a fim de manter a temperatura corporal constante. Em qualquer faixa de temperatura fora da termoneutralidade o animal despenderá energia revertida em processos compensatórios, a fim de manter sua homeostase, deixando em segundo plano atividades como a reprodução (CUNNINGHAM, 2008). Para bovinos mestiços em lactação, Nããs (1989) estabelece a zona de termoneutralidade numa temperatura que varia de 5 a 31°C

Na figura 1, está esquematizada a zona de termoneutralidade, as faixas de homeotermia e também os limites a partir dos quais o animal sofrerá os efeitos da temperatura, tanto em hipotermia quanto em hipertermia.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

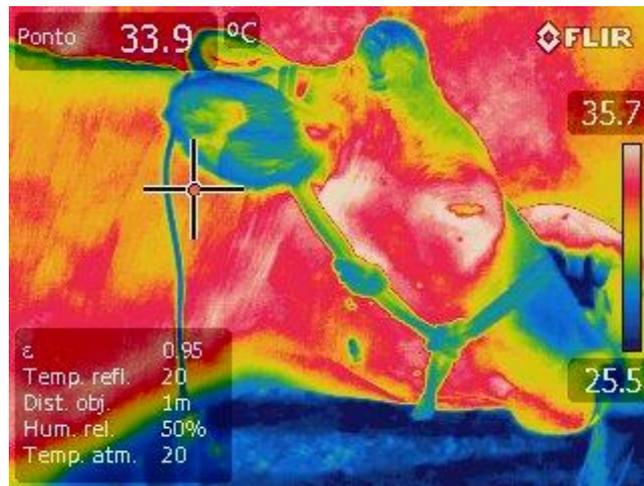
Figura 1 - Zona de Termoneutralidade.

Fonte: Prof. Dr. Marcos Chiquitelli Neto. UNESP-Ilha Solteira.

Durante o estresse calórico, a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, acarreta antagonismo entre seus hormônios e os do eixo hipotálamo hipófise-gonadal (SANTOS, 2003). Esse processo inibitório ocorre quando há liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH), pelo hipotálamo, que inibe a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), no hipotálamo, dessa forma, suprime a liberação na adeno-hipófise, do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Em consequência, há bloqueio nas secreções de hormônios esteróides gonadais (LEITE, 2002). Além disso, em condições de estresse calórico, as células gonadais são afetadas, diretamente, em seus receptores para gonadotrofinas, e causam desequilíbrio hormonal e reduzem a sensibilidade das células à ação de FSH e LH (SANTOS, 2003).

Segundo Chebel et al. (2004), vacas expostas ao estresse por calor ao menos um dia de temperatura máxima $>29^{\circ}\text{C}$ antes da inseminação artificial tiveram taxa de gestação menor ($p<0,001$) que vacas não expostas a esse fator. Demonstrando que quando os animais se encontram na zona de conforto térmico não há comprometimento da atividade reprodutiva (FERRO et al., 2010). Entretanto, ao se encontrarem acima da temperatura crítica, a qual pode variar de acordo com a velocidade do vento, radiação solar, umidade relativa, raça, além de outros, os animais em estresse térmico, reduzem a fertilidade (SILVA, 2000).

1 Ultimamente novas técnicas e ferramentas têm sido introduzidas como suporte no
 2 manejo reprodutivo de animais de fazenda para controle de fertilidade e índices reprodutivos,
 3 possibilitando a identificação de melhores raças para as condições do semiárido e servindo
 4 para promover o bem-estar animal. O uso da termografia de infravermelho, por exemplo, é
 5 uma nova técnica de precisão, introduzida através da formação de imagens termográficas já
 6 explorada em vários países e em diversas áreas (ALVES et al., 2014). O registro de imagem
 7 termográfica pode ser visualizado na figura 2 a seguir.



9
 10 Figura 2 – Imagem de bovino gerada a partir de
 11 câmera termográfica.
 12

13 A termografia é definida como uma técnica que possibilita a medição de temperatura
 14 de um corpo e a formação de imagens termográficas a partir de radiação de infravermelho.
 15 Estas imagens auxiliam na compreensão da termorregulação em relação às mudanças na
 16 temperatura superficial e o impacto das condições ambientais sobre o bem-estar animal
 17 (KOTRBA et al., 2007 & ZOTTI 2010).

18 O uso de sombreamento artificial configura-se como outra ferramenta considerada
 19 essencial para reduzir perdas na produção de leite e na eficiência reprodutiva. (BARBOSA;
 20 DAMASCENO, 2002). Ferro et al (2010) cita aumento de 19% na taxa de concepção de vacas
 21 em condições de sombreamento. Por isso, há necessidade do uso de práticas de manejo no
 22 ambiente físico, como sombreamento natural ou artificial, sistemas silvipastoris, com espécies
 23 de crescimento rápido, água e alimentos adequados, em quantidade e qualidade, bom manejo
 24 no rebanho, principalmente em regiões tropicais (LOURENÇO JUNIOR et al., 2006).

2.2.Oogênese e embriogênese

A sequência de eventos pelos quais as células germinativas primordiais passam até atingirem o estágio de oócito maduro, apto para a fecundação é denominada oogênese (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Estima-se uma população de 120 a 150 mil oócitos primários contidos em folículos primordiais em fêmeas bovinas ao nascimento (YANG et al., 1998).

As células do epiblasto, durante a gastrulação, se tornam células indiferenciadas, chamadas de células germinativas primordiais (CGP), que irão dar origem aos oócitos. As CGP colonizam a gônada ainda indiferenciada e se diferenciam em oogônias (MCLAUGHLIN & MCIVER, 2009). Posteriormente, as oogônias entram no estágio da prófase da primeira divisão meiótica e passam a ser chamadas de oócitos primários. Os oócitos permanecem nesse estágio até entrar em atresia ou receber o estímulo hormonal, que induz a maturação (SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

Em resposta à onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH), os oócitos retomam a meiose e sofrem o processo de maturação (MAYES & SIRARD, 2001). Ocorre o rompimento da vesícula germinativa e progride na meiose, passando pelos estágios de metáfase I, anáfase I, telófase I, completando o primeiro ciclo meiótico com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e, imediatamente atingindo a metáfase II. Nesse estágio ocorre a segunda parada meiótica, e o oócito permanece nessa fase até o momento da fecundação (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Com a fecundação, o oócito completa a sua segunda divisão meiótica, com a extrusão do segundo corpúsculo polar. A célula retorna a sua configuração inicial diplóide com a interação do material genético, formando assim o zigoto, que dará origem ao embrião (ADONA, 2006).

2.3.Transferência embrionária

Dentre as várias tecnologias utilizadas, para amplificar a utilização do potencial genético das fêmeas, a transferência de embriões (TE) se destaca por ser um campo em constante mudança e expansão, possibilitando que vacas produzam múltiplas crias em um único ano (BARROS; NOGUEIRA, 2004).

A primeira TE realizada com sucesso em mamíferos foi com coelhos em 1890 (HEAPE, 1891), sendo 70 anos mais tarde, obtido a primeira em bovino (WILLETT et al.,

1 1951). Em 2012 foram documentados 263.036 TEs bovinos em todo o mundo, com o Brasil
2 responsável por 14,81% (STROUD; CALLESEN, 2012).

3 A TE na realidade é um passo no processo de remoção de um ou mais embriões a
4 partir do trato reprodutivo de uma doadora até transferi-los para uma ou mais receptoras.
5 Podendo ser considerada no sentido mais amplo um processo composto por várias etapas, tais
6 como: superovulação e inseminação das doadoras, coleta dos embriões, isolamento, avaliação
7 e armazenamento a curto prazo dos embriões, micromanipulação e análise genética dos
8 embriões, congelamento e transferência dos embriões propriamente dito (TROXEL, 2007).

9 Com o advento da transferência de embrião (TE) por superovulação (SOV) e da
10 fertilização *in vitro* (FIV), as características genéticas das fêmeas passaram a ser mais
11 amplamente propagadas, sendo uma importante ferramenta para o melhoramento zootécnico
12 (REICHENBACH et al., 2002).

13 Estudos a respeito da influência do estresse térmico sobre os índices reprodutivos
14 relacionados a TE são de sobremaneira escassos, entretanto alguns trabalhos demonstram sua
15 interferência na reprodução (SILVA et al., 2010). Também se considera que são inúmeros os
16 fatores que interferem nos resultados da TE, sendo o estresse térmico um dos pontos
17 limitantes para o sucesso desta técnica (CHEBEL et al., 2004).

18 19 **2.4.Coleta e avaliação embrionária**

20 A colheita de embriões é realizada preferencialmente, entre o sexto e oitavo dia após a
21 primeira inseminação das doadoras. Nesse período o embrião encontra-se flutuando, num
22 filme líquido no lúmen da ponta dos cornos uterinos. Isso permite sua captação através da
23 técnica de lavagem dos cornos uterinos (DEMÉTRIO, 2003).

24 A tricotomia e antissepsia com álcool iodado, no espaço intervertebral, entre a última
25 vértebra sacral e a primeira coccígea, é indispensável para a realização da anestesia epidural
26 baixa, utilizando-se quatro a seis mililitros de lidocaína a 2% (2012).

27 Deve ser realizada higienização ao redor da vulva, ânus e inserção da cauda, com
28 água, escova e sabão seguida de antissepsia com solução de álcool etílico e iodado a 10%.
29 Uma sonda de Folley com o mandril no seu interior é guiada através da cérvix por
30 manipulação retal. Após o posicionamento da sonda em um dos cornos, o balão é inflado
31 injetando-se dez a vinte ml de ar, quantidade suficiente para fechar a abertura cervical e fixar

1 a sonda. Por conseguinte, o mandril é retirado e inicia-se a coleta dos embriões através da
2 lavagem uterina (GAMBARINI, 2004).

3 Em circuito fechado, o lavado fluiu por gravidade através do tubo acoplado ao
4 recipiente com DPBS, bem como através do cateter em direção ao corno uterino, sendo
5 necessário que o recipiente seja posicionado cerca de um metro acima da garupa do animal.
6 Após a lavagem do corno uterino, o meio de coleta retorna através do outro tubo plástico para
7 o filtro acoplado nesse tubo retendo os embriões juntamente com dez a 30 ml do meio de
8 lavagem (REICHENBACH et al. 2002).

9 Os embriões coletados são transportados do filtro de colheita para placas de Petri com
10 diâmetro de 12cm. Com o auxílio de um estereoscópio se faz a primeira busca na placa com
11 suaves movimentos circulares, onde toda e qualquer estrutura encontrada é retirada com a
12 ajuda de uma seringa tipo de insulina e ponteira estéril para uma placa menor (60x35),
13 contendo gotas do meio de manutenção (DEMÉTRIO, 2003).

14 Na avaliação morfológica de um embrião considera-se com relação as estruturas e
15 qualidades os seguintes critérios: Forma esferóide; Simetria dos blastômeros; Aparência clara
16 e nítida dos blastômeros; Tonalidade escura e uniforme; Uniformidade da membrana celular;
17 Proporcionalidade entre o embrião e o espaço perivitelíneo; Integridade da zona pelúcida;
18 Ausência de vacúolo no embrião e fragmentos celulares no espaço perivitelíneo; Ausência de
19 fragmentos celulares aderidos à zona pelúcida; Compactação dos blastômeros entre si
20 (GOODHAND et al., 2005).

21 Segundo Pinto Neto (2000) são utilizados sete estágios de desenvolvimento: estágio 1
22 mórula: aglomerado celular em cuja superfície blastômeros individuais podem ser
23 distinguidos; estágio 2 mórula compacta: blastômeros individuais não podem ser distinguidos
24 na superfície do embrião; estágio 3 blastocisto inicial: uma pequena cavidade, a blastocele,
25 está visível e a massa celular interna começa a se formar; estágio 4 blastocisto: o embrião
26 ocupa a maior parte dentro da zona pelúcida, a massa celular interna começa a tornar-se mais
27 distinta mas o diâmetro global do embrião, incluindo a zona pelúcida, permanece inalterado;
28 estágio 5 blastocisto expandido: o diâmetro embrionário está aumentado e a espessura da zona
29 pelúcida pode ser reduzida para aproximadamente 1/3 da espessura original; estágio 6
30 blastocisto em eclosão: O embrião está iniciando o processo de saída da zona pelúcida;
31 estágio 7 blastocisto eclodido: O embrião está completamente livre da zona pelúcida; é ainda
32 nítida a presença da fase de blastocele (GONÇALVES et al. 2001).

1 A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (ROBERTSON &
2 NELSON, 1998), classifica os embriões quanto à qualidade em quatro graus: grau I
3 (excelente: estágio de desenvolvimento com zona pelúcida intacta e esférica, massa celular
4 homogênea com células de tamanho uniforme, nenhum ou poucos fragmentos celulares no
5 espaço perivitelino); grau II (bom: alterações mínimas na forma e coloração com relação ao
6 grau I, alguns fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelino e/ou pequenas formações
7 vesiculares nos blastômeros); grau III (regular: claras alterações comparadas com o grau II,
8 embora com a maior parte da massa celular intacta); e grau IV (ruim: muitos fragmentos ou
9 debris celulares no espaço perivitelino, vesículas maiores e em maior número e claras
10 mudanças degenerativas nos blastômeros, com menos da metade da massa celular intacta).

11 A média de embriões viáveis obtidas por coleta e a porcentagem de embriões
12 excelentes e bons podem atestar a eficiência dos procedimentos utilizados, dentre eles o do
13 protocolo de superovulação (GONÇALVES, 2001).

14 Os embriões avaliados como excelentes, bons e regulares são passíveis de
15 transferência. Os resultados, expressos em percentual de gestações, variam entre 45 e 60%, e
16 normalmente não diferem para os embriões classificados como excelentes e bons. Na
17 indicação para a congelação e micromanipulação, somente os embriões excelente e bom são
18 utilizáveis, em relação ao estágio de desenvolvimento recomenda-se a utilização de embriões
19 em estágios que antecedam a eclosão embrionária. (RUMPF, 2005).

20

21

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.Localização

O experimento foi desenvolvido no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB) – Campus de Sousa, Unidade de São Gonçalo, em conjunto com o setor de Bovinocultura e Ovinocultura, alto sertão da Paraíba, município de Sousa, perímetro irrigado de São Gonçalo. Sendo o clima semiárido do tipo Aw (clima tropical úmido e seco ou de savana) da classificação de Koeppen, com precipitação média anual de 800 mm, com o período chuvoso se estendendo de janeiro a abril. A temperatura média anual é de 27 °C, com mínima de 22 °C e máxima de 38 °C e umidade relativa média de 64% (EMBRAPA, 2010).

3.2.Grupos Experimentais

Foram utilizadas 8 vacas mestiças, de cruzamento de gado taurino com zebuino, vazias com no mínimo de 45 dias pós-parto. Estas foram pré-selecionadas por exame clínico e ginecológico auxiliado por avaliação ultrassonográfica transretal e consideradas aptas à reprodução. Foram selecionadas as com condição corporal entre 3 e 4, numa escala de 1-5, sendo 1 muito magra e 5 muito gorda (EMBRAPA, 2010). Permanecendo todas elas das sete às treze horas no pastejo em piquetes com capim Tifton, conduzido em rotação, acompanhado de um quilo de ração à base de milho duas vezes ao dia no momento das ordenhas, sendo estas realizadas no início da manhã, antes das sete horas, e logo após o retorno dos animais do pastejo, após às treze horas.

Os animais foram separados em dois grupos, quatro indivíduos manejados em piquetes sem sombreamento artificial (controle) e quatro com a utilização de sombreamento artificial nas horas de maior incidência solar (das 7 às 13 horas) através da utilização de tela de polipropileno com 70% de proteção solar (tratamento), com área de 5m² por animal (NÄÄS & ARCARO JÚNIOR, 2001), implantado 30 dias antes do primeiro dia do protocolo de superovulação (D-30), conforme estruturas mostradas na imagem 01 a seguir.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Figura 3 – Animais do grupo tratamento sob as estruturas de sombreamento artificial.

3.3. Avaliação clínica e temperatura superficial

Os animais foram monitorados diariamente desde trinta dias antes do protocolo de superovulação (SOV) até o dia da coleta dos embriões, sempre durante a segunda ordenha do dia, tendo sua frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC) e temperatura retal (TR) avaliadas, conforme recomendações de Dirksen et. al (1993).

A temperatura superficial (TS) foi obtida por meio de uma câmera termográfica (Flir® T420) com calibração automática. Todas as imagens foram realizadas do lado direito do animal, de modo a obter a real flutuação da temperatura corporal, evitando que os processos digestivos ocorridos no rúmen tivessem participação no aumento da temperatura superficial conforme preconizado Baêta & Souza (2010).

A temperatura superficial será dada pela média das temperaturas dos quatro indivíduos por grupo e por dia analisado.

3.4. Temperatura ambiental

A temperatura ambiental (TA) foi monitorada através de data loggers onset®, modelo U23-004 HOBO Pro v2. Estes equipamentos foram posicionados à altura da cernelha das vacas sob o sombreamento artificial bem como na área não sombreada no local de pastejo animal referenciando-se por Alves et al (2014). Os dados de temperatura ambiental serão registrados durante as seis horas nas quais os animais permanecem no tratamento.

3.5. Protocolo de Superovulação

O protocolo de SOV iniciou-se com a introdução do dispositivo intravaginal bovino de progesterona (DIB), associado a 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE) em qualquer dia do ciclo estral, correspondendo ao dia zero (D0) do protocolo. No D4 foi iniciada a aplicação de 200 mg FSH de 12 em 12 horas, em doses decrescentes até o D7 (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10, 10 mg). No D6 realizado a administração de 0,5 mg de cloprostenol, sendo o DIB retirado no D7 e 24 horas depois aplicado 25mg de LH. Foram realizadas duas inseminações artificiais, pelo método transcervical, com sêmen da mesma partida de um reprodutor da raça Girolando proveniente de central de sêmen comercial, ocorridas 12 e 24 horas após administração do LH, conforme representado na figura 01.

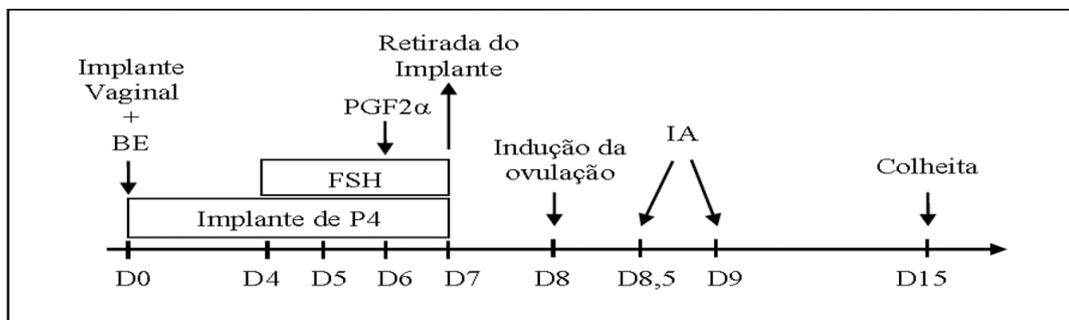


Figura 4 - Desenho esquemático do protocolo superovulação

3.6. Coleta e avaliação dos embriões

A coleta dos embriões foi realizada no D15 do protocolo de superovulação. Realizou-se assepsia e anestesia epidural baixa, conforme recomendado por Andrade (2012).

O método de lavagem uterina foi implementado para a colheita dos embriões, sendo seguidas recomendações de Gambarini (2004) e Reichenbach (2002).

As estruturas recuperadas foram classificadas de acordo com o manual da Sociedade Internacional de Transferencia de Embriões (IETS) (ROBERTSON & NELSON, 1998) e criopreservados segundo recomendações de Reichenbach et al. (2002), sendo armazenadas em nitrogênio líquido para posterior inovulação.

Foram tomadas as medidas de biossegurança, higiene e boas práticas laboratoriais para o procedimento de rastreio de avaliação dos embriões.

Segue a figura 5 retratando ambiente contendo fluxo laminar, estereomicroscópio, placa aquecedora e demais materiais e equipamentos necessários para o manuseio das

1 estruturas recuperadas no Laboratório de Ensino em Biotecnologia Reprodução do IFPB –
2 Campus Sousa – LEBRE.

3



4
5 **Figura 5 – Laboratório de reprodução animal IFPB –**
6 **Campus Sousa**

7
8 Na avaliação individual dos embriões, várias características foram observadas,
9 conforme descrito na tabela 1.

10

11 Tabela 1 - Critérios para avaliação de embriões bovinos segundo os parâmetros de qualidade
12 propostos pela IETS (1998)

CÓDIGO DA IETS	AVALIAÇÃO	PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
1	EXCELENTE OU BOM	Estádio de desenvolvimento corresponde ao esperado; massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade; forma regular, a zp não deve apresentar superfície côncava, deve ser lisa, preferencialmente intacta, especialmente se o embrião é destinado à exportação; células extrusadas da massa celular do embrião compreendem menos de 15% do material celular total.
2	REGULAR	Estádio de desenvolvimento corresponde ao esperado; forma regular, zp intacta ou não, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais; células extrusadas da massa celular compreendem mais de 15% do material celular total; pelo menos 50% das células compreendem uma massa embrionária viável, intacta.
3	POBRE	Estádio de desenvolvimento não corresponde ao esperado; irregularidades maiores na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais; menos de 75% das células degeneradas; pelo menos 25% das células compõem uma massa embrionária viável, intacta.
4	MORTO OU DEGENERADO	Estádio de desenvolvimento não corresponde ao esperado, embrião em degeneração; massa embrionária de menos de 25% de todo material celular presente no interior da zp; oócitos ou estruturas unicelulares degeneradas.

13 Fonte: REICHENBACH et al., 2002.

14

15

1 A classificação quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário seguiu
 2 recomendações de Pinto Neto et al., (2000), de acordo com o que pode ser verificado no
 3 quadro 02 a seguir.

4

5 Tabela 2 – Classificação de embriões bovinos quanto ao estágio de desenvolvimento

ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO	DEFINIÇÃO
MÓRULA	Aglomerado celular que permite a distinção entre os blastômeros, porém sem diferenciação celular.
BLASTOCISTO INICIAL	Início da diferenciação entre células do trofoblasto e massa celular interna, com aparecimento de uma pequena cavidade entre os blastômeros (blastocele).
BLASTOCISTO	Clara diferenciação entre as células do trofoblasto e massa celular interna. Blastocèle visível. O embrião ocupa maior parte do interior da zp sem alterar o diâmetro do embrião.
BLASTOCISTO EXPANDIDO	Aumento de 1,2 a 1,5 o diâmetro embrionário, com adelgaçamento da zp em até dois terços da espessura inicial.
BLASTOCISTO ECLODIDO	Embrião fora do espaço perivitelínico, podendo estar próximo ou não da zp, apresentando o dobro do volume inicial.
OÓCITO	Gameta feminino não fecundado. Não há distinção entre células. Espaço interno e zp homogêneos.
ESTRUTURA DEGENERADA	Estrutura comprometida que impede a classificação quanto ao estágio de desenvolvimento.

6 Fonte: PINTO NETO et al., 2000.

7

8 **3.7. Análise dos dados**

9 A análise estatística dos resultados foi realizada pelo SPSS v.20 para Windows (SPSS,
 10 Chicago, IL, USA). As variáveis foram testadas para observar a distribuição normal pelo teste
 11 de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados são apresentados em média e desvio padrão. Foi
 12 aplicada a ANOVA com pós teste de Tukey-Kramer para as variáveis paramétricas. Todos os
 13 testes foram calculados para um nível de significância de 5%. Em algumas variáveis a análise
 14 foi realizada sob a forma descritiva.

15

16

17

18

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.Embriões

Os resultados de índice de recuperação, número de embriões coletados, estágios embrionários e qualidade embrionária obtidos no presente trabalho são apresentados no gráfico 01 a seguir.

Tabela 3 – Índice de recuperação, número de embriões coletados, estágios e qualidade embrionária por grupo.

VARIÁVEIS		GRUPOS EXPERIMENTAIS	
		SOL	SOMBRA
ÍNDICE DE RECUPERAÇÃO (%)		25,00%	83,33%
Nº DE EMBRIÕES POR ANIMAL±DESVIO PADRÃO		3,75±4,11 ^a	2,75±4,19 ^a
ESTÁGIOS	MÓRULA INICIAL	18,18%	6,67%
	MÓRULA	54,55%	66,67%
	BLASTOCISTO INICIAL	27,7	20%
	2 - 12 CÉLULAS	0%	6,67%
QUALIDADE	EXCELENTE	64%	20%
	REGULAR	18%	60%
	POBRE	9%	13%
	DEGENERADO	9%	7%

^{ab} Letras diferentes indicam diferença entre grupos

O número total de embriões recuperados para os dois grupos foi de 26, com uma média global de 3,25 embriões por animal. Para o grupo controle houve média de 2,75 embriões por animal e para o grupo tratamento a média foi 3,75.

Os números são semelhantes aos apresentados por Renesto (2004) que obteve 3,1 embriões por animal, conduzindo superovulação em vacas da raça Nelore, não obstante, diferem quando comparados aos resultados de Cruz et al (2008) que obtiveram uma média de 10 embriões por animal após realizarem duas sessões de lavagem uterina, no intervalo de até cinquenta minutos, na mesma raça.

Segundo Witbank (2002), a presença de folículo dominante funcional pode exercer um efeito negativo na resposta ovulatória e diminuir o número de embriões coletados. Subnutrição, lactação e estresse ambiental podem exercer um efeito prejudicial na secreção

1 pulsátil de LH e no desenvolvimento folicular. O presente experimento não obteve diferenças
2 estatísticas referentes à quantidade de embriões recuperados entre os grupos trabalhados, o
3 que pode sugerir a ação desses fatores intrínsecos e extrínsecos em ambos os grupos.

4 Provavelmente o número relativamente baixo de estruturas recuperadas no presente
5 trabalho, se deve aos diversos fatores afetando ambos os grupos, tais como o estresse térmico
6 (FERRO et al., 2010), o fato dos animais permanecerem em lactação durante o experimento
7 (WITBANK, 2002) e sobretudo à substancial variabilidade racial que confere respostas
8 heterogêneas dos indivíduos aos fármacos utilizados no protocolo de superovulação, como
9 também contribui para a multiplicidade dos resultados (FERREIRA, 2012).

10 Também, de acordo com Galli (2003) há baixa consistência na produção *in vivo* de
11 embriões, sendo um terço das doadoras tratadas pouco responsivas à superovulação, um terço
12 produz em média 3 embriões e somente o terço restante resulta em grande número de
13 embriões transferidos, como pôde ser evidenciado em nosso trabalho com nove embriões
14 sendo coletados de um único animal e zero embriões coletados de um outro indivíduo, fato
15 este ocorrido em ambos os grupos experimentais.

16 O índice de recuperação (IR) total, isto é, a relação entre o número de corpus lúteos e
17 o número de embriões coletados obteve uma taxa global de 41,93%. Para o grupo controle,
18 esta taxa foi de 25%, enquanto que para o grupo tratamento o IR foi de 83,33%.

19 Esta considerável diferença entre grupos sugere o efeito benéfico que o sombreamento
20 artificial pode causar nos protocolos de transferência de embrião, denotando um impacto
21 positivo nas taxas de fecundação e morte embrionária precoce pela qualidade dos oócitos
22 viabilizados e demais circunstâncias fisiológicas envolvidas na manutenção da homeostase e
23 conforto térmico dos animais (ARCARO JUNIOR et al., 2005).

24 Apesar da diferença positiva no índice de recuperação, o número de embriões não
25 diferiu estatisticamente devido o pequeno número de corpus lúteos formados no grupo
26 tratamento. Fato que atribuímos a dosagem de FSH (utilizando valores medianos entre gado
27 de corte e gado de leite) utilizada e ao fator individual de cada animal. Desta maneira
28 acreditamos que dosagens mais elevadas devem ser utilizadas em gados mestiços.

29 No que se refere aos estágios de desenvolvimento dos embriões recuperados, em
30 análise global, 60% deles foram blastocistos, 24% blastocistos expandidos, 12% blastocistos
31 iniciais e 4% de mórulas compactadas, que está em concordância com o descrito por Fonseca
32 et al., (2001), uma vez que a coleta dos embriões ocorreu sete dias após a ovulação. Observa-

1 se predominância de estádios embrionários avançados (blastocisto e blastocisto expandido)
2 que representaram 84% do total de estruturas, contra 16% de mórulas e blastocistos iniciais,
3 corroborando com Fonseca et al., (2001), que recuperaram 80% de estágios adiantados
4 (blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) contra 20% de mórulas e
5 blastocistos iniciais.

6 O grande predomínio de estádios avançados de desenvolvimento no sétimo dia após o
7 estro parece ser uma característica marcante que diferencia zebuínos e taurinos, tendo os
8 taurinos predominância de recuperação de estruturas iniciais e zebuínos apresentando estádios
9 mais avançados quando a coleta é realizada no D7 do protocolo de superovulação, de acordo
10 com um detalhado estudo feito por Callesen et al (1995). Os animais utilizados neste
11 experimento possuem padrão racial mestiço, entretanto os resultados mostram que em relação
12 aos estágios embrionários em D7, os animais demonstraram números mais aproximados aos
13 de linhagens zebuínas.

14 No que se refere aos estágios embrionários em cada um dos grupos, 66,6% dos
15 embriões do grupo do tratamento sombra foram classificados como mórula, contra 54,5% do
16 grupo do sol. Uma taxa de 20% dos embriões do grupo sombra foi classificada como
17 blastocisto inicial, enquanto 27,7 dos embriões do grupo sol foi considerado nesta fase. Na
18 fase de mórula inicial, foram rotulados 6,6% dos embriões do grupo sombra, ao passo que se
19 constatou uma percentagem de 18,1% no grupo sol. Resultados menos significantes foram
20 descritos para estruturas compostas por 2-12 células, as quais obtiveram percentagem de 6,6%
21 para o grupo sombra e não obtendo representatividade para o grupo sol.

22 Com o protocolo de sincronização e coleta dos embriões em tempo programado, as
23 estruturas coletadas coincidem com a fase esperada, entre mórula inicial e principalmente
24 mórula, não havendo, portanto, diferença significativa entre os tratamentos no que se refere às
25 fases embrionárias (FONSECA et al., 2001). Ademais, Silva (2011) estudando a influência do
26 estresse calórico em embriões produzidos *in vitro* em bovinos de corte, verificou que o
27 estresse calórico diminuiu a produção de blastocistos, sendo encontrados os seguintes valores
28 para temperatura ambiente e taxa de blastocisto 38,5°C e 24,33%; 41°C e 14,16%,
29 respectivamente, porém não observamos esta interferência, conduzindo experimento *in vivo* e
30 em gado mestiço leiteiro.

31 Na qualidade embrionária, os índices demonstraram melhores resultados no grupo
32 controle, no qual os animais foram expostos ao sol. Apresentando 64% de estruturas

1 consideradas excelentes contra 20% nesta classificação para o grupo manejado à sombra. Por
2 outro lado, o grupo controle também apresentou maior taxa de estruturas degeneradas, sendo
3 9%, enquanto o grupo tratamento obteve 7%. Para a classificação regular, o grupo Sol obteve
4 18% e o grupo Sombra 60%. Os embriões classificados com qualidade pobre foram 9% no
5 grupo Sol e 13% no grupo Sombra.

6 Apesar do tratamento ter influenciado positivamente incrementando o índice de
7 recuperação (IR) e o número de embriões produzidos no grupo Sombra (tratamento), o
8 mesmo efeito positivo não aconteceu no que concerne à qualidade embrionária. Porém, os
9 resultados corroboram em linhas gerais com os encontrados por Fonseca et al., (2001) e Pinto
10 Neto et al., (2000), os quais obtiveram cerca de 80% de estruturas viáveis para inovulação,
11 isto é, a soma das estruturas excelentes com as consideradas regulares (REICHENBACH et
12 al., 2002).

13

14 **4.2. Temperaturas**

15 A temperatura superficial apresentou diferença estatística com relação aos dias de
16 avaliação ($p < 0,05$). Em D3-SOL apresentou $38,5 \pm 0,16^\circ\text{C}$, levemente superior que os demais
17 dias. Já na sombra, em D7, a temperatura superficial mostrou-se em $37 \pm 0,16^\circ\text{C}$. No sol, D8
18 apresentou temperatura de $39,55 \pm 0,32^\circ\text{C}$, e na sombra tanto D-13 quanto D8 apresentaram
19 temperaturas retais de $39,17 \pm 0,50^\circ\text{C}$ e $39,17 \pm 0,41^\circ\text{C}$, respectivamente. Não houve diferença
20 estatística entre as temperaturas retais registradas, nos grupos exposto ao sol ou à sombra ($p <$
21 $0,05$).

22 Segundo Silva (2013), a manutenção da temperatura corporal ocorre mediante trocas
23 de calor com o ambiente, sendo que, em temperaturas mais amenas, o calor é dissipado para o
24 ambiente na forma sensível, através de um gradiente de temperatura entre animal e meio, e
25 sob estresse pelo calor, o principal processo de perda de calor é o da evaporação, através do
26 aumento da frequência respiratória, devido aos mecanismos sensíveis de transferência térmica
27 serem ineficientes.

28 A temperatura superficial pode ser considerada um bom indicador da atividade de
29 sudorese em bovinos (SHARF et al., 2008). A termólise evaporativa é o mais efetivo meio da
30 dissipação de calor corporal, sendo que a evaporação cutânea representa cerca de 85% da
31 perda total do calor latente (MAIA et al., 2005). A queda da temperatura de pele relacionada
32 ao aumento do estresse ocorre quando há estimulação simpática, o que gera vasoconstrição

periférica e o aumento da pressão arterial, levando a um aumento da temperatura interna e à diminuição da temperatura periférica do corpo (RANDALL et al., 2002). As temperaturas retal e superficial apresentam-se dentro do padrão para a espécie segundo Silva (2010), porém em alguns momentos estão no limite superior da normalidade, demonstrando a dificuldade dos animais em se estabelecerem em conforto térmico.

No que se refere à temperatura ambiental, os dados mostram diferença estatística entre os grupos sol e sombra em todos os dias avaliados, coincidentes com os dias do protocolo de superovulação.

Os resultados de temperaturas são apresentados em graus Celsius (°C) e reproduzem as médias e desvios-padrões desde duas semanas anteriores ao protocolo de superovulação (uma verificação semanal), bem como durante o período de sua realização (monitoramento diário), compreendendo um período de vinte e dois dias de acompanhamento, conforme apresentado na tabela 02.

Os resultados da temperatura ambiental, são baseados na média das seis horas diárias durante as quais os animais permaneceram nos tratamentos (das 07 às 13 horas) para ambos os grupos experimentais.

Tabela 4 – Resultados das temperaturas nos grupos de animais expostos ao sol e à sombra, durante os dias do protocolo de superovulação.

	Temperatura Superficial (°C)		Temperatura Retal (°C)		Temperatura Ambiental (°C)	
	SOL	SOMBRA	SOL	SOMBRA	SOL	SOMBRA
D-13	37,95±0,41 ^a	37,02±0,18 ^a	38,57±0,32 ^a	39,17±0,26 ^a	35,30±0,20 ^b	25,20±0,35 ^a
D-06	38,22±0,06 ^a	38,07±0,62 ^a	38,47±0,18 ^a	38,55±0,003 ^a	34,93±0,45 ^b	19,80±0,24 ^a
D0	37,67±0,74 ^a	37,57±1,00 ^a	38,65±0,21 ^a	38,40±0,04 ^a	35,80±0,20 ^b	23,50±0,50 ^a
D1	37,77±0,04 ^a	37,72±0,04 ^a	39,13±0,72 ^a	38,97±0,39 ^a	32,50±0,20 ^b	26,30±0,45 ^a
D2	37,70±0,02 ^a	37,92±0,24 ^a	38,40±0,15 ^a	38,32±0,03 ^a	32,16±0,30 ^b	24,80±0,40 ^a
D3	38,50±0,02 ^b	37,95±0,17 ^a	38,52±0,07 ^a	38,52±0,07 ^a	33,26±0,50 ^b	23,20±0,55 ^a
D4	37,87±0,06 ^a	38,07±0,08 ^a	38,87±0,12 ^a	38,67±0,06 ^a	34,30±0,20 ^b	24,80±0,40 ^a
D5	37,40±0,02 ^a	37,50±0,06 ^a	38,62±0,14 ^a	38,57±0,16 ^a	35,00±0,20 ^b	25,70±0,30 ^a
D6	36,90±0,10 ^a	37,00±0,02 ^a	38,57±0,18 ^a	39,07±0,59 ^a	33,63±0,35 ^b	22,00±0,20 ^a
D7	37,52±0,06 ^a	36,42±0,36 ^b	38,55±0,03 ^a	38,55±0,03 ^a	33,46±0,25 ^b	23,70±0,35 ^a
D8	37,80±0,06 ^a	37,50±0,02 ^a	39,55±0,13 ^a	39,17±0,16 ^a	35,20±0,50 ^b	25,50±0,20 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão

^{ab} Letras diferentes indicam diferença entre grupos (p <0.05).

4.3.Frequências fisiológicas

No tocante à frequência cardíaca e frequência respiratória, os dados não apresentam diferença estatística nem em relação aos dias de protocolo em relação aos dias de protocolo entre os grupos. Seguem dados na tabela 03.

Tabela 5 – Análise dos dados de frequência cardíaca e respiratória entre os grupos

	Frequência cardíaca		Frequência respiratória	
	SOL	SOMBRA	SOL	SOMBRA
D-13	64,5±6,6 ^a	53,0±6,0 ^a	49,0±6,8 ^a	51,5±23,2 ^a
D-06	66,5±14,7 ^a	73,0±15,4 ^a	57,0±10,5 ^a	55,5±3,4 ^a
D0	77,0±11,9 ^a	75,5±23,6 ^a	60,0±14,0 ^a	50,0±9,5 ^a
D1	76,0±18,1 ^a	72,0±12,6 ^a	60,0±26,0 ^a	55,0±5,0 ^a
D2	65,0±2,0 ^a	67,5±14,4 ^a	52,0±18,7 ^a	49,0±2,0 ^a
D3	70,0±8,3 ^a	72,0±12,6 ^a	45,0±15,4 ^a	42,0±6,9 ^a
D4	70±8,3 ^a	69,0±8,8 ^a	39,0±8,8 ^a	37,0±5,0 ^a
D5	71,0±8,8 ^a	66,0±12,4 ^a	48,0±13,8 ^a	42,0±9,5 ^a
D6	75,0±5,0 ^a	65,0±10,5 ^a	47,0±12,3 ^a	53,0±18,0 ^a
D7	66,0±6,9 ^a	56,0±16,3 ^a	50,0±13,2 ^a	41,0±2,0 ^a
D8	67,0±3,8 ^a	76,0±5,6 ^a	66,0±7,6 ^a	52,0±6,5 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão

^{ab} Letras diferentes indicam diferença entre grupos (p <0.05).

Já em relação ao padrão fisiológico estabelecido para a espécie, de 10 a 30 movimentos por minuto na frequência respiratória e 36 a 80 batimentos por minuto para a frequência cardíaca (SILVA, 2000), os dados mostram clara exacerbação principalmente no que se refere à frequência respiratória, denotando que os animais sofreram estresse calórico e ambiental durante o experimento, indicando que essas fêmeas ativaram mecanismos fisiológicos para perda de calor para atingir a homeostase. A capacidade do animal de resistir ao estresse por calor, em função de altas temperatura e umidade relativa do ar, tem sido avaliada fisiologicamente por alterações na temperatura retal e na frequência respiratória, explicando a tentativa de o animal perder o calor absorvido (MAIA et al., 2005).

Segundo Silva (2013), a manutenção da temperatura corporal ocorre mediante trocas de calor com o ambiente, sendo que, em temperaturas mais amenas, o calor é dissipado para o ambiente na forma sensível, através de um gradiente de temperatura entre animal e meio, e sob estresse pelo calor, o principal processo de perda de calor é o da evaporação, através do

1 aumento da frequência respiratória, devido aos mecanismos sensíveis de transferência térmica
2 serem ineficientes.

3 Os critérios de tolerância e adaptação dos animais são distinguidos pelas medidas
4 fisiológicas da respiração, batimento cardíaco e temperatura corporal, já a temperatura retal e
5 a frequência respiratória são as melhores referências fisiológicas para avaliar a tolerância dos
6 animais ao calor (Saab 1995). Apesar da diferença de temperatura ambiental a qual os animais
7 dos diferentes grupos foram submetidos, ambos parecem ter sofrido interferência do estresse
8 calórico de maneira equitativa, exacerbando suas variáveis fisiológicas com vistas à
9 compensação ao estresse calórico.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **5.CONCLUSÃO**

2

3 Conclui-se que o tratamento com sombreamento artificial instituído aos animais não
4 foi suficiente para amenizar o estresse térmico a ponto de refletir nos índices de qualidade e
5 estadiamento dos embriões produzidos, destacando de maneira positiva apenas o índice de
6 recuperação para o grupo tratamento.

7 Consta-se que mesmo em estresse térmico, sem acurada padronização racial entre os
8 indivíduos dos grupos experimentais, os mesmos atingiram em linhas gerais as taxas de
9 qualidade e estadiamento de embriões, bem como a média de estruturas recuperadas descritas
10 em literatura.

11 Depreende-se dos resultados apresentados a alta capacidade adaptativa que os animais
12 utilizados neste experimento possuem, provavelmente por sua pronunciada variabilidade
13 racial conferindo rusticidade e permitindo uma maior amplitude de respostas compensatórias
14 quando comparados a animais de raça definida.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

6.REFERÊNCIAS

ADONA, P.R; LEAL,C.L.V. Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.354-359, 2006.

AGUIAR, P.R.L. **Estudo de marcadores moleculares (macrossatélites) em vacas doadoras de embriões com diferentes respostas superovulatórias**. 2008, 112f. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ALVES A.S.; SOUZA B.B.; SILVA E.M.N.; SILVA G.A.; BATISTA N.L.; ALCÂNTARA M.D.B.; GOMES T.L.S.; ROBERTO J.V.B. Determinação dos parâmetros fisiológicos e gradientes térmicos de caprinos jovens Anglo-nubianos no semiárido brasileiro. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v.2, n.3, p.90-94, 2014.

ANDRADE, G.A; FERNANDES, M.A.; KNYCHALA, M.V.; PEREIRA JUNIOR M.V. Factors affecting pregnancy rate of recipients of bovine embryos produced in vitro **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.1, p.66-69, 2012.

ARCARO JUNIOR, I; ARCARO JUNIOR, J.R.P.; POZZI, C.R.; FAVA, C.D.; FAGUNDES, H.; MATARAZZO, S.V.; OLIVEIRA, J.E.D. Respostas fisiológicas de vacas em lactação à ventilação e aspersão na sala de espera. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.639-643, 2005.

AZEVEDO, M. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 holandês zebu em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2000-2008, jun. 2005.

AZEVÊDO, D.M.M.R.; ALVES, A.A. **Bioclimatologia Aplicada à Produção de Bovinos Leiteiros nos Trópicos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, p.9-72, mar. 2009. (Documentos,188).

BAÊTA, F. C.; SOUZA, C. F. **Ambiência em edificações rurais: conforto animal**. Viçosa: UFV, 2010. 246p.

BARBOSA, O. R.; DAMASCENO, J. C. **Bioclimatologia e bem estar animal aplicados à bovinocultura de leite**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, jun. 2002.

BARROS, C.M,; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação em zebuínos de corte. **1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, p. 212-222. 2004.

CUNNINGHAM. J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 4ª edição, Brasil. Elsevier, 2008. 728p.

- 1 CALLESEN, H.; LOVENDAHL, P.; BAK, A. Factors affecting the developmental stage of
2 embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. **Journal of Animal Science.**;
3 v.73, p.1539-1543, 1995.
4
- 5 CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.P.; REYNOLDS, J.P.; CERRI, R.L.A.; JUNCHEM, S.O.;
6 OVERTON, M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy
7 loss in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science.**; v84, p.239-255, 2004.
8
- 9 CRUZ F.B.; JUNIOR I.O.; VIEIRA A.D.; GERGER R.P.C.; RIBEIRO E.S.; BERTOLINI M.
10 & MEZZALIRA A. Recoleta uterina como estratégia para aumentar a taxa de embriões em
11 fêmeas bovinas de corte e leite. **Acta Scientiae Veterinariae.** V36(3), p.249-254, 2008.
12 CURI, P.R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas.** Botucatu: Tipomic,
13 1997. 263 p.
14
- 15 DEMÉTRIO, D. G. B. **Colheita e transferência de embriões bovinos.** São Paulo, SP.2003.
16 p. 22-23. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina
17 Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu. 2003.
18
- 19 DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.; STÖBER, M. ROSENBERGER **Exame Clínico dos**
20 **Bovinos.** 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1993. 419p.
21
- 22 EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de**
23 **Solos,** Brasília: EMBRAPA, 2010, 412p.
24
- 25 FERREIRA, R.M. A baixa fertilidade de vacas Holandesas (*B.taurus*) repetidoras de serviço
26 durante o estresse térmico está relacionada à sua baixa competência oocitária. 2012. 62p.
27 Dissertação (Doutorado em Ciências) – **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da**
28 **Universidade de São Paulo.**
29
- 30 FERRO, F.R.A; NETO, C.C.C; FILHO, M.R.T.; FERRI, S.T.S.; MONTOALDO, Y.C. Efeito
31 do estresse calórico no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. **Revista Verde,** v.5, p.01-
32 25. 2010.
33
- 34 FONSECA, J.F.; SILVA FILHO, J.M.; PINTO NETO A.; PALHARES M.S. Estádios de
35 desenvolvimento embrionário de vacas zebrúinas superovuladas. **Arquivo Brasileiro de**
36 **Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.53, n.6, p.671-676. 2001.
37
- 38 FREITAS, D.S. Uso de inibidor da síntese de prostaglandinas sobre a taxa de prenhez em
39 receptoras bovinas com diferentes graus de manipulação cervical. Dissertação (Mestrado),
40 2007,89f, **Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia.**
41
- 42 GALLI, C.; DUCHI, R.; GROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO COLLEONI, S.;
43 LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology,** v.59,
44 p. 599-616. 2003.
45
- 46 GONÇALVES, P. B. F.; FIGUEIREDO, J. R de; FREITAS, V. J de F. **Biotécnicas aplicadas**
47 **à reprodução animal.** REICHENBACH, Horst, Dieter, et al., São Paulo: Varela, Cap. 8.
48 p.127 – 162. 2001.

1
2 GOODHAND, K.L.; WATT, R.G.; STAINES, M.E. In vivo oocyte recovery and in vitro
3 embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH
4 treatment. **Theriogenology** . Gainesville, v.51.p.951-961.1999.

5
6 HEAPE, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a
7 uterine foster-mother. **Proceedings of the Royal Society**, v. 48, p 457-458. 1891.

8
9 KADZERE, C.T.; MURPHY, M.R.; SILANIKOVE, N.; MALTZ, E. Heat stress in lactating
10 dairy cows: a review. **Livestock production science**; v77, p59-91, 2002

11
12 KOTRBA R.; KNÍŽKOVÁ I.; KUNC P.; BARTOS L. Comparison between the coat
13 temperature of the eland and dairy cattle by infrared thermography. **Journal of Thermal**
14 **Biology**; v32, p355–359, 2007.

15
16 LEITE, D.M.G. **Efeitos negativos do estresse sobre o desempenho reprodutivo**. Seminário
17 apresentado na disciplina Endocrinologia da reprodução. Programa de Pós-Graduação em
18 Ciências Veterinárias, UFRGS. Rio Grande do Sul, 2002.

19
20 LOURENÇO JÚNIOR, J.B., et al. Efeito dos Índices de Temperatura Umidade (ITU) sobre
21 Bubalinos Criados em Sistema Silvipastoril, em Belém, Pará. In: CONGRESSO
22 BRASILEIRO DE BIOMETEOROLOGIA MUDANÇAS CLIMÁTICAS: IMPACTO
23 SOBRE HOMEM, PLANTAS E ANIMAIS, 4, 2006, Ribeirão Preto - SP. **Anais**. São Paulo,
24 2006.

25
26 MAIA, A.S.C.; SILVA, R.G.; LOUREIRO, C.M.B. Sensible and latent heat loss form the
27 body surface of holstein cow in a tropical environment. **International Journal of**
28 **Biometeorology**, v. 50, p. 17-22, 2005.

29
30 MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. The influence of *cumulus*-oocyte complex morphology and
31 meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n.
32 55, p. 911-922, 2001.

33
34 MCLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial
35 follicle development. **Reproduction**, v.137, p. 1-11, 2009.

36
37 PINTO-NETO, A.; SILVA FILHO, J.M.; FONSECAJ.F.; MOTA, M.F. Desempenho de vacas
38 doadoras da raça Nelore em programa de transferência de embriões. **Arquivo de Ciência**
39 **Veterinária e Zoologia**. v.2, p167-173, 2000.

40
41 RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Animal physiology: mechanisms and**
42 **adaptations**. 5. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2002. 727 p.

43
44 REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; FILHO, A.S.S.; ANDRADE,
45 J.C.O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: **Biotécnicas aplicadas a**
46 **reprodução animal**, São Paulo: Varela, 2002 p. 127-178.

47

- 1 RENESTO, A. associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e
2 superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos.2004. 59f. Dissertação
3 (Mestrado em Medicina Veterinária) **Universidade Estadual Paulista**.
4
- 5 ROBERTSON, I.; NELSON, R.E. Certificação e identificação de embriões. In: OLIVEIRA
6 FILHO, E. B. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**.
7 Uberlândia, Cap. 9, p.109- 122. 1998.
8
- 9 ROCHA, D. R., et al. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. **Revista**
10 **Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.1, p.18-24, jan./mar. 2012.
11
- 12 RUMPF, Rodolfo et al. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas**
13 **espécies bovina e equina**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 41-67,
14 2005.
15
- 16 SAAB, S.A; SLEIMAN, F.T. Physiological responses to stress of filial crosses compared to
17 local Awassi sheep. **Small Ruminant Research**. v.16, p.55-59, 1995.
18
- 19 SANTOS, V.P. **O estresse e a reprodução**. Seminário apresentado na disciplina de
20 Endocrinologia da Reprodução. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências
21 Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
22
- 23 SÁNCHEZ, F.; SIMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**,
24 v. 1822, p. 1896-1912, 2012.
25
- 26 SCHÜTZ, K.E.; ROGERS, A.R.; COX, N.R. TURCKER, C.B. Dairy cows prefer shade that
27 offers greater protection against solar radiation in summer: shade use, behaviour, and body
28 temperature. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 116, p. 28-34, 2009.
29
- 30 SHARF, B.; WAX, L.E.; AIKEN, E.; SPIERS, D.E. Regional differences in sweat rate
31 response of steers to short-term heat stress. **International Journal Biometeorology**, v.52, n.
32 8, p.725-732, 2008.
- 33 SILVA, G.A. Avaliação do sistema de resfriamento adiabático evaporativo na melhoria do
34 bem-estar de novilhas leiteiras em confinamento. 2013.43f. Dissertação (Mestrado em
35 Zootecnia) **Instituto de Zootecnia**.
- 36 SILVA, G.A.; SILVA, E. M. N.; SOUZA, B. B.; ZOTTI, C. A.; ALCÂNTA, M.D.B.;
37 MARQUES, B. A. A. **Aplicação da termografia na avaliação da resposta fisiológica e**
38 **gradientes térmicos de cabras anglo nubianas criadas no semiárido paraibano**. In:
39 CONGRESSO BRASILEIRO DE METEOROLOGIA, 5, 2011, Piracicaba SP. Anais...
40 Piracicaba SP. CD-Rom.
- 41 SILVA, R. G. **Introdução à bioclimatologia animal**. Ed. 1, São Paulo: Nobel, 2000.
42
- 43 SOUZA, B. B. Parâmetros fisiológicos e índice de tolerância ao calor de bovinos da raça
44 Sindi no semiárido paraibano. **Ciência Agrotecnica**, v.31, n.3, p.883-888, 2007.
45

- 1 STROUD, B; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. **Animal**
2 **Reproduction**, v.9, n.3, p.210-216, 2012.
3
- 4 SWENSON, M.J., **Fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara
5 Koogan, 1996. 856p.
6
- 7 THATCHER, W.W.; BILBY, T.R.; BARTOLOME, J.A. Strategien for improving fertility in
8 the modern dairy cow. **Theriogenology**, v. 65, p. 30-44, 2006.
9
- 10 TROXEL, T.R. **Purebred cattle series: embryo transfer**. University of Arkansas Division
11 of Agriculture, Cooperative Extension Service. 2007. 60p.
12
- 13 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth,
14 differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-
15 1751, 2005.
16
- 17 VIANA, J. H. M. Estado atual da transferência de embriões (TE) e produção in vitro de
18 embriões (FIV) no Brasil e no mundo. **O Embrião**, n.29, p 1-3, 2006
19
- 20 WILLETT, E.L. BLACK, W.G.; CASIDA, L.E.; STONE, W.H.; BUCKNER, P.J. Successful
21 transplantation of a fertilized bovine ovum. **Science**, v. 113, p. 247. 1951.
22
- 23 WRATHALL, A. E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOON, A. Evaluation of risks of viral
24 transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected
25 semen. **Theriogenology**. v. 65, p. 247-274. 2005.
26
- 27 YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; PRESICCE, G.A.
28 Control of oocyte maturation in cows: Biological factors. **Theriogenology**, v. 49, p. 471-482,
29 1998.
30
- 31 ZOTTI C.A. **Desempenho, respostas fisiológicas e comportamentais de novilhas leiteiras**
32 **mantidas em diferentes regimes de ventilação forçada**. 2010. 63f. Dissertação (Mestrado
33 em Zootecnia) - Instituto de Zootecnia.