

## ESTACIONALIDADE E A PRODUÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES *in vitro* EM VACAS GIR LEITEIRO NA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL

(Seasonality and the production of oocytes and *in vitro* embryos  
in Gir dairy cows in the southeast region of Brazil)

Antônio Prieto DOURADO<sup>1</sup>; André Luís Rios RODRIGUES<sup>1</sup>; José Antonio Silva RIBAS<sup>1</sup>; Rodolpho de Almeida TORRES FILHO<sup>1</sup>; Daniel Fábio SALVADOR<sup>2\*</sup>; Raquel Varella SERAPIÃO<sup>3</sup>; Luiz Altamiro Garcia NOGUEIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brazil Filho, 64 - B. Vital Brazil, Niterói/RJ. CEP: 24.230-340; <sup>2</sup>Fundação Centro de Ciências e Educação Superior a Distância do Rio de Janeiro (CECIEJ); <sup>3</sup>Universidade de Vassouras. \*E-mail: [salvador@cecierj.edu.br](mailto:salvador@cecierj.edu.br)

### RESUMO

A eficiência reprodutiva de doadoras de embriões *Bos taurus* é afetada pelas estações devido ao estresse calórico em países de clima tropical e temperado. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito das condições climáticas de verão e inverno na produção de oócitos e embriões *in vitro* na raça Gir Leiteiro (*Bos indicus*) em fazendas da região Sudeste do Brasil. Os parâmetros avaliados foram: total de oócitos recuperados (OT), oócitos viáveis (OV) e percentual de oócitos viáveis sobre o total (POV); embriões produzidos (EP) e percentual de embriões produzidos (PEP) sobre o total de estruturas recuperadas pela aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU). Os oócitos foram obtidos de 153 doadoras pluríparas de diferentes idades e ordens de parição de 10 rebanhos. As médias obtidas em 380 aspirações foliculares (OPU) nos meses de verão foram: OT=14,8; OV=12,6; EP= 3,4; PEP=22,3%, e no inverno de OT=13,4; OV=10,8; EP=3,5; PEP=26,1%, apresentando coeficiente de variação de até 84%, porém sem diferença estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre estes períodos, utilizando-se o teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ). Apenas a percentagem de oócitos viáveis foi maior ( $p < 0,05$ ) no período de verão (POV=84,4 vs. 80,0%), contudo, o total de embriões PIVE foi semelhante nos dois períodos. Conclui-se que a produção de embriões da raça Gir Leiteiro, criadas na região Sudeste do Brasil, não foi afetada pela sazonalidade climática.

**Palavras-chave:** PIVE, índices reprodutivos, produção estacional, THI.

### ABSTRACT

The reproductive performance of *B. taurus* embryo donors is affected in many tropical and temperate countries. The objective of this study was to evaluate the effects of the climatic conditions of summer and winter climatic conditions on the production of oocytes and *in vitro* embryos in dairy cows of the breed Gir Leiteiro (*Bos indicus*) at farms in Southeast of the Brazil. The variable answers evaluated were the total oocytes recovered (TO) and percentage of viable oocytes over the total (PVO); embryo production (EP) and percentage of embryos in viable oocytes (PE) over the total of structures recovered by follicular aspiration guided by ultrasonography (OPU). The oocytes analyzed were obtained from 10 herds and 153 pubertal donors of different ages and orders of parturition. The average from 380 ovum pick up (OPU) during summer were: TO=14.8; PVO=12.6; EP=3.4; PE=22.3%, and TO=13.4; PVO=10.8; EP=3.5; PE=26.1%, with variation coefficient of up to 84%, and no differences evaluated through the Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ). Only the percentage of viable

oocytes was higher ( $p < 0.05$ ) in the summer period (PVO=84.4 vs. 80.0%). However, the embryo production (IVEP) was similar in both seasons (summer and winter). Therefore, we could conclude that the embryo production of Dairy Gir cows in Southeast of the Brazil was not affected by weather seasonality.

**Keywords:** IVP, reproductive index, seasonal production, IHT.

## INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) vem sendo gradativamente incorporada como a técnica de eleição dos programas de melhoramento animal e multiplicação de bovinos de alto valor zootécnico ou econômico. Seu uso continua aumentando mundialmente e em 2013 o Brasil passou a liderar a produção mundial de embriões PIVE/OPU (VIANA, 2019). O crescimento da PIVE no mundo, bem como os problemas do mercado brasileiro decorrente da crise econômica em 2016 determinaram o fim da hegemonia nacional neste segmento no ano 2017, quando os EUA registraram mais embriões PIV que o Brasil (421.123 vs. 345.528, respectivamente). Como os EUA permanecem como maior produtor de embriões bovinos *in vivo* (45,3%, 224.281/495.054), este país lidera o ranking mundial, considerando-se os números totais (*in vivo* e *in vitro*). Ainda assim, o Brasil segue como referência mundial no uso da PIVE, respondendo por 34,8% da produção global (VIANA *et al.*, 2018; GONÇALVES e VIANA, 2019).

O crescente emprego desta tecnologia em zebuínos no Brasil deve-se, entre outros fatores, à fisiologia reprodutiva deste grupamento genético, que apresenta maior número de folículos disponíveis nos ovários em relação aos taurinos (NEVES *et al.*, 2010). Também contribuem com o elevado valor econômico das matrizes e o aumento da demanda interna e de outros países tropicais, principalmente por matrizes zebuínas leiteiras puras, como as da raça Gir Leiteiro, ou cruzadas com a raça Holandesa (PONTES *et al.*, 2009; ABCZ, 2012).

Neste cenário houve incremento de cerca de 400 % no registro da raça Gir entre 2000 e 2010 (ABCZ, 2012) quando estimou-se que os mestiços Gir x Holandês foram utilizados por 34% dos 100 maiores produtores de leite no Brasil (EMBRAPA, 2010) e que constituem 70% dos rebanhos leiteiros da Região Sudeste (SOUZA *et al.*, 2009).

Uma das variáveis pouco estudadas na produção de embriões por PIVE nas raças zebuínas de leite é se a variação climática estacional regional, interfere na qualidade e/ou quantidade dos embriões produzidos, como já observado em doadoras zebuínas de corte em Mato Grosso, Região Centro-Oeste (FERNANDES *et al.*, 2001). Em Minas Gerais, Peixoto *et al.* (2006) cita que os excessos de frio em maio, calor e pluviosidade em novembro interferiram negativamente na resposta reprodutiva em várias raças zebuínas. Novas práticas de manejo ou a estacionalidade dos programas de PIVE poderiam minimizar os efeitos indesejáveis e assim contribuir para a redução dos custos e aumento da eficiência e da difusão entre os produtores (VARAGO *et al.*, 2008).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade e a quantidade de oócitos e embriões produzidos pela PIVE no verão e inverno, na raça Gir Leiteiro nas condições das fazendas no Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

O banco de dados utilizado nesta pesquisa contém informações referentes a 380 aspirações realizadas em 153 fêmeas pluríparas, gestantes ou não, de diferentes idades e ordens de parição, em um programa de PIVE envolvendo 10 rebanhos puros da raça Gir Leiteiro (*Bos indicus*), entre os anos de 2006 e 2009. Todos os rebanhos pertencem a fazendas privadas, com assistência veterinária envolvidas em programas de melhoramento racial e da produção, e estão localizadas em diversos municípios do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, no entorno das coordenadas geográficas 22°54' S e 43°12' O.

As fazendas estão submetidas à condição climática regional classificada por Köppen-Geiger como tropical (Cw), com verão quente e chuvoso e inverno seco (PEEL *et al.*, 2007). As temperaturas médias anuais da região variam entre 18 e 23 °C com precipitação pluviométrica anual de 2.000 a 2.600mm<sup>3</sup> (INMET, 2011). No presente estudo definiu-se como verão, o período que abrangeu os quatro meses de novembro a fevereiro e como inverno, os quatro meses de maio a agosto de todos os quatro anos pesquisados.

Os dados analisados no presente estudo respeitaram um intervalo de 60 dias entre os períodos climáticos de inverno e verão a fim de que o efeito deletério tardio do estresse climático, conforme reportaram Roth *et al.* (2000) e Torres-Junior (2007), não afetassem nossas respostas.

Os dados meteorológicos do período foram obtidos do Relatório de Dados Diários por Ano das Estações do Instituto Nacional de Meteorologia – INEMET (2011).

O cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU) foi baseado na formulação proposta por Kelly e Bond (1971), porém com base nas médias das temperaturas máximas ou mínimas do ar e na umidade relativa verificadas nos períodos citados:  $ITU = 0,8 \times TBS + URA (TBS - 14,3) / 100 + 46,5$ ; onde: TBS: temperatura média máx ou mín do ar medida com termômetro de bulbo seco.

URA: umidade relativa do ar.

As variáveis climáticas que caracterizaram a região e o período onde os rebanhos eram criados, encontram-se na Tab. 01.

O sistema de produção predominantemente adotado neste rebanho classifica-se como semi-intensivo, onde as vacas são mantidas em pastagens tropicais nativas e/ou melhoradas rotacionadas e recebem suplementação mineral durante todo o ano. A suplementação volumosa e concentrada é fornecida principalmente durante os meses com menor precipitação pluviométrica e conseqüente redução qualitativa e quantitativa da produção forrageira. A suplementação volumosa predominante foi de capim elefante (*Pennisetum purpureum Shaum.*) e cana de açúcar (*Saccharum spp*) picados, silagens puras ou mistas de capim elefante e milho (*Zea mays spp*), resíduo úmido de cervejaria e rações comerciais.

O manejo nutricional destas fazendas procura manter um escore de condição corporal compatível com a função reprodutiva, tendo em vista que o objetivo mercadológico é a produção e comercialização de fêmeas de reposição puras Gir ou ½ Holandesa. O sombreamento natural e/ou artificial, estava disponível com frequência apenas nas áreas de fornecimento de suplementação e nos piquetes maternidade. Houve escrituração zootécnica e os rebanhos dispõem de assistência veterinária periódica.

**Tabela 01:** Variáveis climáticas registradas e acumuladas nos períodos de inverno e verão, entre 2006 a 200, Rio de Janeiro, BR.

VARIÁVEIS CLIMÁTICAS	INVERNO	VERÃO
Temperatura máxima média mensal (°C)	28,3	31,6
ITU máxima média mensal	80,4	85,7
Temperatura máxima absoluta diária (°C)	36,4 (08/2006)	41,8 (01/2006)
ITU máximo absoluto diário	93,4	102,2
Temperatura máxima absoluta registrada/mês (°C)	30,2 (08/2007)	34,1 (01/2006)
ITU máximo absoluto registrado/mês	83,4	89,9
Temperatura mínima média mensal (°C)	15,2	18,9
ITU mínimo médio mensal	59,3	65,4
Temperatura mínima absoluta diária (°C)	5,8 (07/2007)	13,5 (11/2006)
ITU da temperatura mínima absoluta diária	44,3	56,6
Temperatura mínima absoluta registrada/mês	10,9 (07/2008)	18,1 (11/2008)
ITU mínimo registrado/mês	52,9	64,1
Umidade Relativa Ar Mensal Média (%)	74,8	77,8
Precipitação Pluviométrica mês média (mm <sup>3</sup> )	36,8	261,5
<b>Precipitação Pluviométrica anual média (mm<sup>3</sup>)</b>	1637,5	

Fonte: INMET (2011).

As 153 doadoras pluríparas estavam gestantes ou vazias, sem restrição clínica, sanitária e ginecológica e com condição corporal leiteira entre 2,5 e 4,5. Foram submetidas à punção folicular para colheita de oócitos por aspiração dos “complexos cumulus oophorus” (CCOs) por via transvaginal, guiada por ultrassonografia (OPU). Os oócitos foram considerados viáveis quando apresentaram ooplasma homogêneo e com granulações finas, zona pelúcida intacta e camada compacta de células do *cúmulos ooforus* (LEIBFRIED e FIRST, 1979).

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada com sêmen sexado de 31 touros Gir Leiteiro sabidamente férteis, ranqueados no teste de progênie da raça e provenientes de centrais de inseminação artificial, sendo que a orientação dos acasalamentos atendeu a preferência dos criadores. Após as etapas subsequentes de maturação, fecundação, cultivo das estruturas e classificação morfológica e seleção dos embriões (VARAGO *et al.*, 2008, GONÇALVES *et al.*, 2008), estes foram destinados à inovulação em receptoras das próprias fazendas. Os procedimentos para a produção *in vitro* de embriões (PIVE) foram realizados sempre pela mesma equipe técnica.

Foi realizada a análise de consistência de dados do total de 852 aspirações conduzidas em 34 rebanhos, sendo excluídas as informações referentes às fertilizações *in vitro* que utilizaram sêmen convencional (16,0%) e que não reuniram o mínimo de dez observações por fazenda. Foram criados grupos ano-estação, a fim de descrever o comportamento das variáveis respostas em cada período. Após esta análise, restaram 380 coletas (44,6%) realizadas em 10 fazendas (29,4%) que utilizaram exclusivamente sêmen sexado (84,0%) de 31 touros da raça Gir Leiteiro. Nem todas as fazendas e mesmo animais tiveram coletas realizadas no inverno e verão, mas pelo menos em um desses períodos.

### Análise Estatística

As variáveis respostas avaliadas foram: oócitos totais (OT), oócitos viáveis (OV), percentual de oócitos viáveis (POV), embriões produzidos (EP) e percentual de embriões produzidos (PEP), em relação ao total de oócitos recuperados por sessão de OPU. Para análise empregaram-se os procedimentos FREQ PROC e MEANS PROC SAS SYSTEM (1994), após a transformação logarítmica dos dados, os mesmos foram submetidos a análise de variância 5% de probabilidade para avaliar o efeito de estação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os índices de desempenho na PIVE da raça Gir Leiteiro entre os anos observados encontram-se na análise descritiva das respostas na Tab. 02 e foram calculados com base no total de estruturas recuperadas por sessão realizada de OPU (n=380). Corresponderam ao total de 5.391 oócitos aspirados, sendo 4.489 considerados viáveis, os quais, após a fertilização *in vitro*, resultaram em 1.308 embriões viáveis produzidos.

**Tabela 02:** Valores mínimos e máximos de oócitos totais, oócitos viáveis, percentual de oócitos viáveis (POV), embriões produzidos e percentual de embriões produzidos (PEP) por sessão de OPU (n=380).

Variável	Mínimo	Máximo
<b>Oócitos totais</b>	1,0	73,0
<b>Oócitos viáveis</b>	1,0	65,0
<b>POV (%)</b>	0,8	100,0
<b>Embriões produzidos</b>	0,0	24,0
<b>PEP (%)</b>	0,0	100,0

O desempenho da PIVE, no intervalo de quatro anos, segundo sua distribuição nas estações climáticas de verão e inverno respectivamente, pode ser observado na Tab. 03.

**Tabela 03:** Média de oócitos (totais e viáveis), percentual de oócitos viáveis (POV), embriões produzidos, sob o total de estruturas recuperadas por sessão de OPU, nos períodos de verão e inverno, durante os anos de 2006 a 2009, na raça Gir Leiteiro.

VARIÁVEL	VERÃO	INVERNO	MÉDIA TOTAL
<b>OPU (n=380)</b>	214	166	---
<b>Oócitos totais</b>	14,8±11,3 <sup>a</sup>	13,4±10,7 <sup>a</sup>	14,2
<b>Oócitos viáveis</b>	12,6±9,7 <sup>a</sup>	10,8±9,0 <sup>a</sup>	11,8
<b>POV (%)*</b>	84,4±14,6 <sup>a</sup>	80,0±17,7 <sup>b</sup>	83,3
<b>Embriões produzidos</b>	3,4±3,8 <sup>a</sup>	3,5±4,3 <sup>a</sup>	3,4
<b>PEP (%)</b>	22,3±18,7 <sup>a</sup>	26,1±23,0 <sup>a</sup>	24,3

\*Médias na mesma linha seguidas por diferentes letras (p<0,05)

Pontes *et al.* (2010) realizaram 3.778 aspirações em vacas Gir, na Região Norte do Brasil e recuperaram média superior no total de oócitos /OPU (17,1) mas igualmente ao presente estudo, obtiveram média de 12 oócitos viáveis/ OPU. O percentual de oócitos viáveis foi numericamente superior em nosso estudo (83,3 vs. 70,2%), que ocorreu pelo maior número de estruturas recuperadas e está associada provavelmente ao fator humano de decisão no momento da aspiração por OPU.

Os resultados do presente estudo foram superiores ao reportado por Viana *et al.* (2004) que trabalhando com a mesma raça testaram as coletas com frequências de uma ou duas sessões de OPU/ semanais. No grupo com frequência de uma sessão de coleta por semana houve o maior número de oócitos recuperados ( $8,9 \pm 0,8$  versus  $7,0 \pm 0,7$  respectivamente), resultando em maior ( $p < 0,01$ ) taxa de recuperação (POV) quando comparado com duas sessões (74,3% versus 59,0%, respectivamente). Porém com resultados ainda inferiores ao verificado à média geral deste estudo de 14,2 oócitos totais e 11,8 oócitos viáveis. Essa diferença pode estar relacionada à frequência de aspirações ou outros fatores inerentes à técnica de aspiração.

Ao manter vacas Gir Leiteiro em câmara climática durante 28 dias contínuos, numa condição de estresse calórico mais extrema de ITU (93,1) do que ocorreu nas fazendas deste estudo durante o verão (ITU=85,7), Torres-Junior (2007) também não verificou redução do número total de oócitos recuperados. Sob estresse calórico ou normotermia, os totais (9,2 e 10,0) foram inferiores à média geral do presente estudo (14,2). Tal fato provavelmente explica-se pela variabilidade intra racial já citada e pelo emprego de apenas cinco vacas por tratamento, o que aliás, é comum neste tipo de experimento, mas que foi capaz de demonstrar sua capacidade de termotolerância ao clima tropical.

Macedo *et al.* (2014), Baumgard *et al.* (2015) e Dash *et al.* (2016) também enfatizam que se a vaca doadora for submetida ao estresse calórico durante o estágio de foliculogênese, pode apresentar elevada temperatura nos ovários, prejudicando o recrutamento, seleção, dominância folicular e maturação oocitária e consequentemente, também a percentagem de oócitos viáveis e fertilizados nos programas de produção de embriões PIVE.

Quanto à influência das estações do ano não houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre as médias dos totais de oócitos, médias de oócitos viáveis e embriões produzidos por sessão de OPU no presente estudo. Da mesma forma, a porcentagem média de embriões produzidos sobre o total de estruturas aspiradas em cada sessão, também não foi afetada pelas estações de verão e inverno.

Os efeitos deletérios estacionais do estresse calórico de verão nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas são relatados na literatura como atuantes sobre a dinâmica folicular, competência oocitária e desenvolvimento embrionário nas raças taurinas especializadas para leite (ROCHA *et al.*, 1998; ZERON *et al.*, 2001; AL-KATANANI *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2014), e em zebuínos (TORRES-JUNIOR, 2007) e seus mestiços (AZEVEDO *et al.*, 2009 e ALHUSSIEN *et al.*, 2018).

Vários fatores presentes nesta pesquisa podem ter contribuído de maneira isolada ou em conjunto nestes resultados, sendo os principais: (1) a termotolerância do zebu (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999; THATCHER *et al.*, 2010); (2) amenidade climática predominante na região (SANTOS, 2001; PIRES *et al.*, 2003), e (3) as condições

satisfatórias de ambiência e de manejo nutricional das doadoras de rebanhos de raças puras (CARDOSO *et al.*, 2014; MELLO *et al.*, 2014; FOURNEL *et al.*, 2017).

Estudos de dinâmica folicular e de comportamento do estro conduzidos por Borges (2001), Santos (2001) e Pires *et al.* (2003) com vacas Gir, demonstraram que a variação estacional de inverno ou verão no Sudeste do Brasil, não constituiu fator limitante a estes aspectos da função reprodutiva. Os três estudos citados foram conduzidos em fazendas experimentais com dietas balanceadas durante todo o período, com vacas da raça Gir com idade entre 5 e 15 anos, não gestantes, não lactantes, com peso médio de 454,8kg. Conclusão semelhante chegaram Cardoso *et al.* (2014) e Mello *et al.* (2014) no desempenho de programas PIVE com a raça zebuína Sindhi, incluindo os seis meses secos e outros seis chuvosos da região.

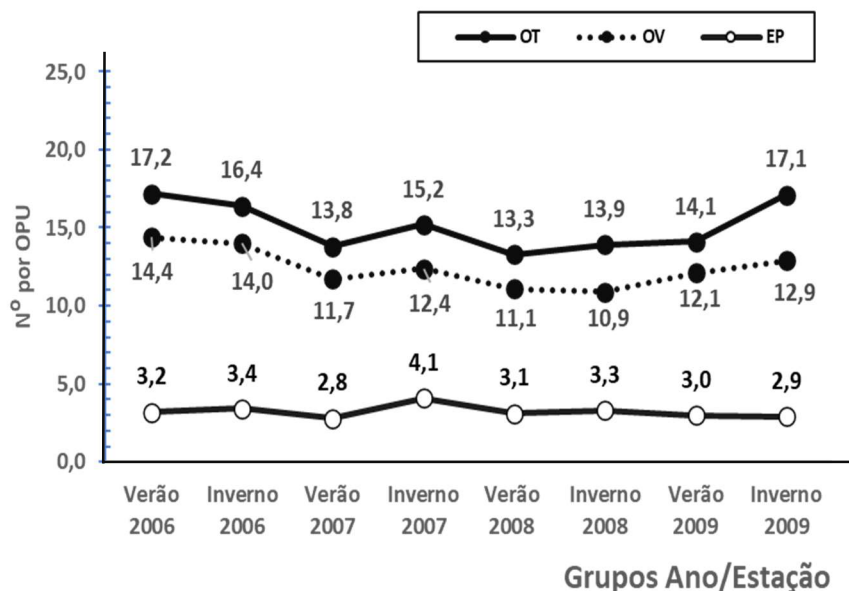
Entretanto, outros estudos nas Regiões Centro-Oeste (FERNANDES *et al.*, 2001) e Sudeste do Brasil (PEIXOTO *et al.*, 2006) indicaram que a atividade ovariana em zebuínos foi mais intensa no período chuvoso do verão do que no período seco de inverno. Os autores atribuíram tal resposta ao manejo do rebanho e à melhoria qualitativa e quantitativa das pastagens. Em programas PIVE com zebuínos André *et al.* (2014) e Sales *et al.* (2015) também observaram efeito estacional adverso e recomendaram o controle ambiental e nutricional como requisitos para o bom desempenho de programas de reprodução assistida.

É possível que além da suplementação, o melhor valor nutricional das pastagens no período chuvoso de verão tenha melhorado a qualidade oocitária, expressa pelo percentual de óocitos viáveis (POV) sobre o total de recuperados – POV no presente estudo (Tab. 03). Isso se contrapõe em parte o verificado por Prata (2013), que não observou efeito sobre as respostas da PIVE quando ofereceu dietas balanceadas que variaram entre 70,0 e 150,0% das necessidades energéticas.

O emprego do índice ITU ou da temperatura e umidade ambiental nas fazendas são importantes para controle do conforto térmico de seus rebanhos (LÓPES-GATIUS, 2013). Os índices de temperatura e umidade (ITU) médios máximos e recordes mensais verificados neste estudo (entre 85,7 e 89,9), se enquadrados segundo a classificação de Armstrong (1994), atingiram condições de estresse calórico elevados (entre 79,0 e 90,0), tendo sido limítrofes ao estresse brando (ITU entre 72 e 79) nas estações de inverno e limítrofes ao estresse severo (ITU entre 91,0 e 99,0), nas estações de verão. Considerando-se os valores recordes alcançados em alguns dias em ambas estações, foi atingida uma condição descrita como crítica vital (acima de 99,0) para bovinos de raças taurinas (ARMSTRONG, 1994). Embora este nível calórico seja capaz de produzir alterações deletérias sobre as respostas pesquisadas em vacas Gir, como constatou Torres-Junior (2007), não se pode dimensionar esta influência nas respostas do presente estudo, mesmo tendo ocorrido vários dias com temperaturas máximas diárias acima dos 35 e compatíveis com o estresse calórico. Em 420 dias de verão, ocorreram 117 acima de 35 °C (27,8%) e 77 acima de 36 °C (18,3%). Dessa forma, pode-se sugerir que os intervalos de ITU, que correspondem às respostas fisiológicas de tolerância ao calor, devam ser reavaliados para bovinos de raças zebuínas, já que estes grupamentos raciais dispõem de recursos anátomo-fisiológicos mais eficientes contra o estresse calórico.

No presente estudo as médias variaram entre 17,2 a 13,3% para OT, entre 14,4 e 10,9 para OV e entre 4,1 e 2,8 para EP em função do ano/estação das coletas (Fig. 01), porém

sem diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na comparação entre estações e anos. Esta variabilidade pode ser aceita como intrínseca aos recursos biotecnológicos utilizados na PIVE e não sugeriu um padrão estacional de desempenho que possa ser atribuído aos grupos ano/estação estudados.



**Figura 01:** Oócitos totais (OT), oócitos viáveis (OV) e embriões produzidos (EP) na raça Gir Leiteiro e nos grupos ano/estação 2006 a 2009.

A obtenção de OT, OV e embriões produzidos (EP) por OPU-PIVE nos poucos resultados reportados na raça Gir (PONTES *et al.*, 2010; ANAMARA, 2012) aproximaram-se ao encontrado neste estudo (Tab. 03 e Fig. 01) e demonstraram que não houve influência dos períodos estacionais de verão e inverno na produção total de oócitos, nem de oócitos viáveis à fertilização ( $p > 0,05$ ). Isso concorda com Santos (2001) e Borges (2001) que constataram que as variações de clima da região Sudeste não alteraram a dinâmica folicular em vacas Gir.

A produção percentual de embriões (PEP) é um parâmetro importante relacionado desde a recuperação total de oócitos (OT) pela OPU ( $PEP = EP \times 100/OT$ ) e envolve as fases de maturação oocitária, fecundação e cultivo embrionário pronto para inovular. Entretanto, outros autores (TORRES-JUNIOR, 2007; ALVES *et al.*, 2013) optaram por taxas que permitem um acompanhamento mais segmentado (clivagem, mórula e blastocistos). Em pesquisa conduzida em câmara climática, com estresse calórico induzido e constante (TORRES-JUNIOR, 2007), a taxa de produção de embriões apresentou redução de 35,5 % para 25,0%, o que não ocorreu em ambientes naturais das fazendas do presente estudo, cuja diferença de 3,5 pontos percentuais não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Também é possível que as temperaturas mais baixas desde o entardecer, durante a noite e até elevar-se novamente amenizem a condição de estresse no ambiente natural e nas fazendas que estabulam vacas entre ordenhas ou nas horas mais quentes.

Embora a raça Gir seja expressiva no Brasil, encontramos poucas informações bioclimatológicas na produção de embriões pela PIVE. Ferreira *et al.* (2014) produziram com doadoras Gir a média de 6,2 embriões (entre zero e 32). Esta média foi superior ao



obtido no presente estudo, sendo que ambos apresentaram grande variação. A diferença no trabalho de Ferreira *et al.* (2014), é que constaram o efeito dos meses do ano, sendo maior ( $p < 0,05$ ) no período de setembro a dezembro (15,8 a 8,1) do que de janeiro a abril (2,7 a 5,7). A conversão média em embriões (34,06%) também foi superior ao nosso resultado, mesmo se calculado sobre o total de oócitos recuperados.

Embora ambos estudos sejam na mesma região Sudeste, e para Ferreira *et al.* (2014) os resultados finais favoreceram o emprego estacional da PIVE, os resultados do presente estudo sugerem que esta biotécnica pode ser empregada indistintamente em qualquer época do ano. Ainda na região Sudeste, e com diferentes raças zebuínas mantidos em microclima ao redor dos 800 m de altitude, Anamara (2012) obteve média de embriões ( $4,0 \pm 3,2$ ). Apesar da alta variabilidade, a produção de embriões foi superior no verão ( $p > 0,05$ ) em relação ao inverno, atribuída à redução qualitativa das pastagens e temperaturas que excederam à condição de conforto para este grupo genético.

Os estudos acima descritos indicam que o efeito nutricional “flushing” mereça estudo atualizado diante da especificidade das novas práticas de manejo e biotecnologias reprodutivas aplicadas aos rebanhos nas diferentes regiões do Brasil. Se por um lado a redução do consumo de matéria seca (MS) e energia na dieta podem afetar a reprodução, Prata (2013) não verificou diferença na produção de embriões, (5 vs 6) e PEP (30 e 34%;  $p = 0,67\%$ ) quando comparou os grupos experimentais de restrição alimentar com 70% da manutenção segundo o National Research Council (NRC) e da alta ingestão de matéria seca com 150% da manutenção segundo NRC, durante 30 dias experimentais.

Confirmando o desempenho superior dos grupos genéticos, Nelore e  $\frac{1}{2}$  Gir-Holandesa, Pontes *et al.* (2009 e 2010) reportaram os respectivos totais de embriões produzidos (5,5 e 5,1). Segundo os autores, o desempenho da PIVE nestes grupos genéticos viabiliza o seu emprego comercial em larga escala. Ao comparar o efeito do clima de verão e inverno norte americano no estado de Lousiana, sobre vacas taurinas e zebuínas, Rocha *et al.* (1998) reportaram que apenas as taurinas foram afetadas, com redução de 29 pontos percentuais na taxa de produção de embriões, o que confirma o resultado verificado no presente, ou seja, o número de embriões produzidos pela PIVE pelas doadoras Gir não foi prejudicado pelo calor ( $p < 0,05$ ).

Em dois experimentos conduzidos com vacas Holandesas (ROTH *et al.*, 2000) e Gir (TORRES-JUNIOR, 2007) com a finalidade de se verificar as respostas imediatas e tardias ao estresse calórico induzido, foi comprovado que mesmo após as respostas fisiológicas terem retornado com a termoneutralidade ambiental, observou-se aumento do percentual de degeneração oocitária e diminuição da taxa de produção embrionária durante pelo menos mais 42 dias pós-estresse. Os resultados de ambos estudos encontram fundamentos nas revisões atualizadas de Silva *et al.* (2013) e Baumgard *et al.* (2015) sobre os impactos negativos indiretos do estresse calórico sobre o consumo voluntário, balanço energético, metabolismo hormonal, taxas de desenvolvimento oocitário e embriológico e finalmente sobre o desempenho da PIVE.

Já quanto à porcentagem de oócitos viáveis (POV) sobre o total de estruturas obtidas em cada sessão, como um parâmetro de qualidade oocitária para o presente estudo, essa foi superior ( $p < 0,05$ ) durante o verão (84,4%) em relação ao inverno (80,0%) com

incremento qualitativo em 4,4 pontos percentuais no verão em relação ao inverno. Porém o número de embriões totais produzidos foi igual em ambas estações climáticas ( $p < 0,05$ ).

O ITU médio máximo mensal foi de 85,7 e máximo absoluto diário de 102,2, embora ocorrido em apenas um dia com temperatura máxima diária do ar superior a 40°C. Como a POV é uma expressão matemática de relatividade, baseada no número de oócitos viáveis em relação ao total recuperado, e como estes (OT) não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), podemos apenas suspeitar de uma tendência à maior competência oocitária, em função da melhoria qualitativa das pastagens no verão na região sudeste do Brasil.

Mesmo considerando a ocorrência de estresse calórico (ARMSTRONG, 1994) e as diferenças na POV, as respostas relativas aos embriões produzidos não foram prejudicadas, o que sugere adaptação das doadoras ao ambiente das fazendas nas quais foram manejadas.

Com doadoras de diferentes raças zebuínas leiteiras mantidas em microclima tropical de altitude próximo a 800 m (Mantiqueira/Sudeste, Br). Anamara (2012) avaliou a produção de mensal da PIVE durante o ano e obteve as médias de 20,4±16,5 OT, 13,2±12,5 OV e de conversão de OV em embriões semelhantes em todas as estações (30,6±15,7).

O desempenho da PIVE na raça zebuína Sindhi (MELLO *et al.*, 2014) também não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre inverno e verão na região Sudeste e produziram respectivamente 17,00 e 15,62 oócitos viáveis, o que correspondeu a 72,12 e 67,56 % POV. Esta raça, ainda pouco estudada no Brasil, obteve produção na PIVE superior à Gir e inferior à Nelore. Na comparação com resultados do presente estudo a porcentagem de oócitos viáveis (POV) sobre o total de estruturas obtidas em cada sessão foi superior e com diferença entre as estações de verão e inverno (84,4% vs. 80,0%).

Pontes *et al.* (2009) trabalhando com vacas Nelore obtiveram médias totais entre 22,7 e 25,6 de oócitos recuperados/OPU ( $n=1.504$ ) sendo que o percentual de viáveis variou entre 82,7 e 89,3. Cinco das doadoras de melhor desempenho dentre 420, disponibilizaram em média 38,2 OT e 31,6 OV por sessão de OPU. Algumas hipóteses que tentam justificar a superioridade quantitativa atribuída à raça e podem ser verificadas no trabalho do citado autor, sendo a mais consistente relacionada ao maior número de ondas de crescimento folicular e maior população de folículos menores (diâmetro <5mm) por onda.

Os mesmos autores ao realizarem a OPU em 617 vacas ½ Gir-Holandes obtiveram 31,4 oócitos por sessão dos quais 24,3 foram classificados como viáveis, o que supera outros resultados da literatura e os obtidos com a raça Gir nessa pesquisa. A POV com índices de 77,4%, ainda que inferior, está dentro do desvio padrão da média do atual estudo. Tal desempenho tem sido um fator de estímulo para a expansão da biotécnica nestes grupamentos genéticos no Brasil (PONTES *et al.*, 2010).

Outros estudos estacionais com zebuínos no Brasil também verificaram sensibilidade na qualidade oocitária. Ferreira *et al.* (2014) citaram que houve tendência (CV= 63,6%) de maior produção de OV (entre 20,4 e 25,2) nos meses chuvosos entre setembro e novembro, com alguma equivalência também em junho (20,0). Podemos questionar se aí estaria ocorrendo um efeito suplementar nutricional ou "flushing", já que alguns produtores começam a intensificar a suplementação concentrada e volumosa neste período. Este efeito também foi reportado no Estado do Mato Grosso do Sul por Fernandes

*et al.* (2001) e foi atribuído à melhoria das pastagens de primavera verão e ao manejo nutricional (NICODEMO, 2008).

Embora a condição nutricional e metabólica possa interferir no padrão de crescimento folicular, secreção dos hormônios da reprodução e qualidade oocitária (SALES *et al.*, 2015), o número de ovócitos viáveis (17 vs 14), totais (23 vs 20) e POV (71 e 75%) variou pouco ( $p=0,41$ ) entre os grupos de níveis dietéticos 0,7% vs 1,5% da manutenção (PRATA, 2013).

Exatamente o oposto ocorre com as raças taurinas, tanto nas condições de climas tropical, subtropical úmido e também temperado, nos quais durante o verão, a taxa de fertilidade, a produção qualitativa e quantitativa dos embriões ficam comprometidas nas estações quentes do ano, quando provavelmente verifica-se a expressão da adaptabilidade do zebu ao clima tropical (ZERON *et al.*, 2001, PAULA-LOPES *et al.*, 2003, AZEVEDO *et al.*, 2009, SILVA *et al.*, 2013). Estes rebanhos, assim como rebanhos zebuínos puros de alto valor econômico, como os desta pesquisa, seriam menos dependentes da sazonalidade das pastagens devido ao emprego de sistemas mais intensivos (ZERON *et al.*, 2001, PAULA-LOPES *et al.*, 2003, PRADHAN *et al.*, 2008 e TAKUMA *et al.*, 2010).

## CONCLUSÕES

Nos rebanhos e regiões de clima tropical estudados na Região Sudeste, Estado do Rio de Janeiro, vacas *Bos indicus* da raça Gir Leiteiro não apresentaram comportamento estacional quanto à quantidade oocitária, nem quanto à produção de embriões pela PIVE, permitindo o mesmo desempenho tanto no verão como no inverno. Entretanto, pode-se vislumbrar que o período do verão regional favoreceu, em alguma medida, o percentual qualitativo de oócitos viáveis à fertilização *in vitro*. Esses resultados, em conjunto com os resultados atuais da literatura, sugerem que para a raça Gir Leiteiro, criada em pastagens com ambiência e dietas adequadas, as vacas responderam satisfatoriamente ao desafio do clima tropical da região Sudeste do Brasil (seco no inverno e quente e húmido no verão) quanto ao seu desempenho para PIVE.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à OPU Assessoria Reprodutiva Ltda., Cordeiro, Rio de Janeiro, BR. e Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (6º Distrito e Brasília/DF., BR.).

## REFERÊNCIAS

ABCZ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE ZEBU. Estatísticas 2011. ABCZ. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br/conteudo/tecnica/estatisticas.html>>. Acesso em: 3 janeiro 2012.

ALHUSSIEN, M.N.; KAMBOJ, A.; ALJADER, M.A.; BIBHUDATTA, S.K.P.; YADAV, M. L., SHARMA, L.; MOHAMMED, S.; SHEIKH, A.A.; LOTFAN, M.; KAPILA, R.;

MOHANTY, A.K.; DANG, A.K. Effect of tropical thermal stress on peri-implantation immune responses in cows. *Theriogenology*, v.112, n.5, p.149-158, 2018.

ALVES, M.F.; GONÇAVES, R.F.; PAVÃO, D.L.; PALAZZI, E.G.; SOUZA, F.; QUEIROZ, R.K.R.; D'ANGELO, M.; ACHILLES, M.A. Effect of heat stress on the maturation, fertilization and development rates of in vitro produced bovine embryos. *Open Journal of Animal Sciences*, v.3, n.3, p.174-178, 2013.

AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.390-396, 2002.

ANAMARA, P. Variações climáticas ao longo do ano e resultados da PIVE em doadoras de diferentes grupos genéticos. 2012. 60p. (Mestrado Acadêmico em Ciência Animal) Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas. Biblioteca Central, 2012.

ANDRÉ, G.R.; FOLINO, J.O.; ANCIOTO, K.L.; SORIANO, G.A.; DIOMETTI, I.C.; CASTILHO, C. Oocyte recovery and blastocysts production of Nelore donors on OPU-IVP program in comercial production of embryo. *Animal Reproduction*, v.11, n.3, p.421, 2014.

ARMSTRONG, D.V. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science*, v.77, p.2044-2050, 1994.

AZEVEDO, M. de; PIRES, M.F.A.; SATURNINO, H.M.; LANA, A.M.Q.; SAMPAIO, I.B.M.; MONTEIRO, J.B.N.; MORATO, L.E. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras 1/2, 3/4, e 7/8 Holandes-zebú em lactação. *Revista Brasileira Zootecnia*, v.34, n.6, p.2000-2008, 2009.

BAUMGARD, L.H.; KEATING, A.; ROSS, J.W.; RHOADS, R.P. Effects of heat stress on the immune system, metabolism and nutrient partitioning: implications on reproductive success. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.39, n.1, p.173-183, 2015.

BORGES, A.M. Influência de diferentes manejos e tratamentos hormonais na dinâmica ovariana durante o ciclo estral e no anestro pós-parto de vacas Gir e Nelore. 2001. 134p. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2001.

CARDOSO, B.O.; MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUZA, S.L.G.; MELLO, M.R.B. Dry and rainy seasonal effects on in vitro production program of Sindhi (*Bos taurus indicus*) embryos. *Animal Reproduction*, v.11, n.3, p.404, 2014.

DASH S.; CHAKRAVARTY A.K.; SINGH A.; UPADHYAY A.; SINGH M.; YOUSUF, S. Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review, *Veterinary World*, v.9, n.3, p.235-244, 2016.

EMBRAPA. CNPGL. Raças ou cruzamentos utilizados. Top 100 milkpoint maiores produtores de leite 2010 do Brasil. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 10 março 2012.

FERNANDES, C.E.; DODE, M.A.N.; GODOY, K.; RODOVALHO, N. Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso

do Sul. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.38, n.3, p.131-135, 2001.

FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M.R.; RODRIGUES, C.A.; FREITAS, B.G.; MEIRELLES, F.V.; BARUSELLI, P.S. Estresse termico e produção embrionária em vacas de leite de alta produção. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 24, 2010, Anais... Porto de Galinhas: SBTE, p.49-59, 2010.

FERREIRA, M.B.D.; LOPES, B.C.; SOUZA, J.C.; PINTO, T.L.C.; LIMA, M.R.; LEMOS, F.O.; FERNANDES, L.O.; GARCIA, J.M. In vitro production of Gir (*Bos taurus indicus*) embryos and pregnancy rates: of donor age and sires influence. Animal Reproduction, v 11, n.3, p.436, 2014.

FOURNEL, S.; OUELLET, V.; CHARBONNEAU, E. Practices for Alleviating Heat Stress of Dairy Cows in Humid Continental Climates: A Literature Review. Animals, v.7, n.37, p.1-23, 2017.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FIGUEIRÊDO FREITAS, V.J. Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. 2ª ed., São Paulo: Roca, 2008. 408p.

GONÇALVES, R.L.R., VIANA J.H.M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.43, n.2, p.156-159, 2019.

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

INMET. MAPA. Banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa. BPMEP. Disponível em: <<http://www.inemet.gov.br>>. Acesso em: 10 janeiro 2011.

KELLY, C.F.; BOND, T.E. Bioclimatic factors and their measurements. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, (Ed.) A guide to environmental research on animals. Washington: National Academy of Sciences, 1971. p.71-92.

LEIBFRIED, L; FIRST, N. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. Journal of Animal Science, v.48, p.76-86, 1979.

LÓPES-GATIUS, F. Approaches to increase reproductive efficiency in artificially inseminated dairy cows. Animal Reproduction, v.10, n.3, p.143-147, 2013.

MACEDO, G.G.; COSTA E SILVA, E.V.; PINHO, R.O.; ASSUMPÇÃO, T.I.; JACOMIN, J.O. O estresse por calor diminui a fertilidade de fêmeas bovinas por afetar o desenvolvimento oocitário e o embrionário. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.38, n.2, p.80-85, 2014.

MELLO, R.R.C.; CARDOSO, B.O.; FERREIRA, J.E.; SOUZA, S.L.G.; MELLO, M.R.B. Effect of seasonality on oocytes production of Sindhi breed bovine females (*Bos taurus indicus*). Animal Reproduction, v.11, n.3, p.444, 2014.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década de século XXI. R. Bras. Zootec., v.39, supl. especial, p.414-421, 2010.

NICODEMO, M.L.F.; SERENO, J.R.B.; AMARAL, T.B. Minerais na eficiência reprodutiva de bovinos. Documento 80, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos. 2008. 50 p. Disponível em:

<[http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacao gratuita/documentos/documento\\_s80.pdf/view](http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacao gratuita/documentos/documento_s80.pdf/view)>. Acesso em: 10 de abril de 2008.

PAULA-LOPES, F.F.; CHASE, C.C. Jr.; AL-KATANAMI, Y.M.; KRININGER, C.E. 3rd; RIVERA, R.M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A.C.; OLSON, T.A.; HANSEN, P.J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: difference between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction*, n.125, p.285-284, 2003.

PEEL, M.C.; FINLAYSON, B.L.; MACMAHON, T.A. Update world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, v.11, p. 1633-1644, 2007.

PEIXOTO, M.G.C.D.; BERGMANN, J.A.G.; FONSECA, C.G.; PENNA, V.M.; PEREIRA, C.S. Effect of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.4, p.567-574, 2006.

PIRES, M.F.A.; ALVES, N.G.; SILVA FILHO, J.M.; CAMARGO, L.S.A.; VERNEQUE, R.S. Comportamento de vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*) em estro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.2, p.187-196. 2003.

PONTES, J.H.F. Aspectos aplicados da produção *in vitro* de embriões *Bos indicus*. 2009. 159p. Tese. (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2009.

PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UNO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, n.4, p.690-697, 2009.

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

PRADHAN, R.; OSHIMA, K; OCHIAI, Y.; KOJIMA, T.; YAMAMOTO, N.; GHANEM, E.E.; NAKAGOSHI, N. Influence of season and parity on embryo recovery and subsequent reproductive performances in early postpartum suckling Japanese Black cows. *Livestock Research for Rural Development*, v.20, n.2, p.8, 2008.

PRATA, A.B. Influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na produção *in vitro* de embriões bovinos. 2013. 71p. (Dissertação de Mestrado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2013.

ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R.; LIM, J.M.; BLAIR, R.M.; ROUSSEL, R.A.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos Taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, v.49, p. 657-665, 1998.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, n.120, p.83-90, 2000.

SALES, J.N.S.; IGUMA, L.T.; BATISTA, R.I.T.P.; QUINTÃO, C.C.R.; GAMA M.A.S.; FREITAS, C.; PEREIRA, M.M.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SOUZA, J.C.; BARUSELLI, P.S. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Journal of Dairy Science*, v.98, p. 3086-3099, 2015.

SANTOS, J.C. Dinâmica folicular em bovinos da raça Gir no inverno e no verão. 2001. 93p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Federal Fluminense – Niterói, RJ, 2001.

SILVA, C.F.; SARTORELLI, E.S.; CASTILHO, A.C.; SATRAPA, R.A.; PUELKER, R.Z.; RAZZA, E.M.; TICIANELLI, J.S.; EDUARDO, H.P.; LOUREIRO, B.; BARROS, C.M. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology*, v.79, p.351-357, 2013.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P.; SILVA, M.V.G.B. Variação na contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos de mastite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.5, 2009.

THATCHER, W.W.; FLAMENBAUM, I.; BLOCK, J.; BILBY, T.R. Interrelationships of heat stress and reproduction in lactating dairy cows. In: *The High Plains Dairy Conference*. 1. 2010. Proceedings... Amarillo, Texas, USA, p.45-60, 2010.

TAKUMA, T.; SAKAI, S.; EZOE, D.; ICHIMARU, H.; JINNOUCHI, T.; KAEDEI, Y.; NAGAI, T.; OTOI, T. Effect of season and reproductive phase on the quality and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. *Journal of Reproduction and Development*, v.56, n.1, p.55-59, 2010.

TORRES-JUNIOR, J.R.S. Produção *in vitro* de embriões em *Bos indicus* sob estresse calórico. 2007. 134p. Tese (Doutorado) – FMVZ, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2007.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, n.2, p.100-1009, 2008.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; FERNANDES, C.A.C.; MARQUES JUNIOR, A.P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, v.4, n.1, p.1-12, 2004.

VIANA, J.H.M., FIGUEIREDO A.C.S., GONÇALVES R.L.R., SIQUEIRA L.G.B. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. *Animal Reproduction*, v.15, p.963-970, 2018.

VIANA, J.H.M. International Embryo Transfer Society - 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, v.36, n.4, p.8-19, 2019.

VIEIRA, L.M.; RODRIGUES, C.A.; MENDANHA, M.F.; SÁ FILHO, M.F.; SALES, J.N.S.; SOUZA, A.H.; SANTOS, J.E.P.; BARUSELLI, P.S. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology*, v.82, p.204-212, 2014.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*, v.1, n.121, p.447-454, 2001.