



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

MICHELLE SILVA ARAUJO

**A INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NAS ETAPAS DA TRANSFERÊNCIA
DE EMBRIÕES BOVINOS**

**Monografia apresentada para a
conclusão do Curso de Medicina
Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária
da Universidade de Brasília**

Brasília DF

Julho, 2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

MICHELLE SILVA ARAUJO

**A INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NAS ETAPAS DA TRANSFERÊNCIA
DE EMBRIÕES BOVINOS**

Monografia apresentada para a
conclusão do Curso de Medicina
Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientadora:

CAROLINA MADEIRA LUCCI

Brasília DF

Julho, 2011

Ficha Catalográfica

Araujo, Michelle Silva

A INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NAS ETAPAS DA
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS / Michelle Silva Araujo,
orientação de Carolina Madeira Lucci – Brasília, 2011

52 páginas

Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária. 2011

1. Reprodução. 2. Verão. 3. Altas temperaturas.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Michelle Silva Araujo

Título da Monografia: A Influência do Estresse Térmico nas Etapas da
Transferência de Embriões Bovinos

Ano: 2011

É concedida a Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor

Michelle Silva Araujo

003.193.671-77

SHIN QL.02 Conj.01 Cs.04

71510-015 – Brasília, DF – Brasil

(61)3468-4230, msa.vet@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: ARAUJO, Michelle Silva

Título: A Influência do Estresse térmico nas etapas da transferência de embriões bovinos

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Professora Dra. Carolina Madeira Lucci

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

José Luiz Jivago de Paula Rôlo, Med. Vet.

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Professor Dr. Ivo Pivato

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu filho João Pedro, por ser a razão da minha vida e por me dar forças para seguir em frente.

A minha família, por todo carinho e apoio recebidos para que eu pudesse conquistar mais esta vitória.

A minha querida amiga Kátia Lie Yasunaga, onde quer que você esteja; que a realização do meu sonho seja a realização do nosso sonho.

A todos os animais, pois sem eles, não haveria veterinária.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me trazer alegrias nos momentos de tristeza e me fortalecer nos meus momentos de fraqueza.

Ao meu filho João Pedro, por ser a minha inspiração e por sempre me receber com um sorriso carinhoso mesmo após a minha ausência devido aos estudos.

A minha mãe e ao meu padrasto, por todos os seus ensinamentos e suporte oferecidos para que eu pudesse continuar seguindo em frente. Vocês são os meus ídolos!

Aos meus irmãos, por todo carinho e companheirismo. Vocês são os meus maiores amigos!

Ao meu pai, por sempre confiar e acreditar em mim.

Aos meus amigos da Medicina Veterinária, em especial à turma Vet XIX, por me acolherem tão bem e por toda a diversão durante o curso.

A todos os meus amigos do Laboratório de Reprodução Animal da UnB, em especial ao Jivago, Fernanda, Renata e a mais nova integrante Daniela, por toda ajuda e carinho, e por tornarem os dias no laboratório muito mais divertidos!

A todos os professores da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB, por compartilharem todo seu conhecimento adquirido, engrandecendo a minha formação profissional.

Em especial a minha orientadora Carolina Madeira Lucci, pela paciência, motivação e grandes ensinamentos transmitidos.

Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

“Num grão de areia ver um mundo;
Na flor silvestre a celeste amplidão;
Segura o infinito em sua mão;
E a eternidade num segundo.”

William Blake

RESUMO

ARAUJO, M. S. A Influência do Estresse Térmico nas Etapas da Transferência de Embriões Bovinos.

Heat stress influence in the stages of bovine embryo transfer. 2011. 52 páginas. Monografia de Conclusão do Curso de Medicina Veterinária – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. Brasília, DF

A bovinocultura possui relevante participação na economia brasileira e estima-se que 60% da população mundial de bovinos são afetados pelo estresse térmico (ET), sendo atribuídas grandes perdas econômicas devido a esta condição. A transferência de embriões bovinos (TE) é uma técnica amplamente utilizada e que oferece uma série de vantagens para a seleção zootécnica e para a produção animal, porém o ET é um dos fatores limitantes que prejudica o sucesso desta biotécnica reprodutiva, levando a alterações dos processos reprodutivos. Algumas estratégias podem melhorar a produção de embriões durante o ET, tais como: redução da magnitude do ET pela manipulação do ambiente, alteração da vaca geneticamente ou fisiologicamente para melhorar a regulação da temperatura corporal na presença do ET, manipulação da vaca para prevenir ou superar o distúrbio nos processos celular e fisiológico que comprometem a reprodução, ou inseminação das doadoras com sêmen coletado de touros durante os períodos de não exposição ao ET. Portanto, é de extrema importância conhecer as consequências geradas pelo ET durante a produção de embriões pela TE, com a finalidade de aumentar as taxas de gestação e de recuperação embrionária, melhorando os índices reprodutivos e aumentando a produção. Sendo assim, o presente estudo é uma revisão bibliográfica sobre a influência do estresse térmico nas etapas de transferência de embriões bovinos.

ABSTRACT

ARAUJO, M.S. Heat stress influence in the stages of bovine embryo transfer. Estresse Térmico na Transferência de Embriões Bovinos. 2011. 52 pages. Monograph of Course Completion of Veterinary Medicine - Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine. University of Brasilia. Brasília, DF

Cattle have significant participation in the Brazilian economy and it is estimated that 60% of the world's cattle are affected by heat stress (HS), with high economic loss being due to this condition. Bovine embryo transfer is a largely used technique, which offers many advantages for the zootechnic selection and animal production; however HS is one of the limiting factors that affect this reproductive biotech, leading to alterations on reproductive processes. Some strategies can improve embryo production during HS, like: reducing the magnitude of HS by manipulating the environment, changing cow genetically or physiologically to improve the regulation of body temperature in the presence of HS, cow manipulating to prevent or bypass disturbance in cellular and physiological processes that compromise reproduction, or donors insemination with sperm collected from sires during periods of no exposure to HS. Therefore, it is extremely important to know the consequences generated by thermal stress during embryo production in embryo transfer, thus pregnancy rates and embryo recovery can increase and reproductive rates and production may be improved. Therefore, this study is a review on HS influence in the stages of bovine embryo transfer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. O ESTRESSE TÉRMICO NA BOVINOCULTURA	11
3. A BIOTÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS	14
4. INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NAS DIVERSAS ETAPAS DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	16
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS E ESTAÇÕES DO ANO	16
4.2. SUPEROVULAÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO.....	19
4.3. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E MONTA NATURAL.....	24
4.4. TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES E TAXAS DE GESTAÇÃO.....	28
5. FATORES QUE PODEM MINIMIZAR OS EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DURANTE AS ETAPAS DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	35
6. CONCLUSÕES.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura possui relevante participação na economia brasileira devido, em grande parte, às cadeias produtivas de carne e leite, as quais tendem a crescer ainda mais nos próximos anos. As biotecnologias reprodutivas, tais como a fertilização *in vitro* e a transferência de embriões (TE), contribuíram de maneira significativa para o aumento da produção de animais em um menor espaço de tempo, além de proporcionarem melhora zootécnica e agregarem valor ao rebanho nacional.

Devido ao Brasil ser um país de clima tropical, caracterizado por elevadas temperaturas, os bovinos apresentam maior susceptibilidade ao estresse térmico (ET). Os bovinos taurinos (*Bos taurus*), apesar de apresentarem maior produção de carne e leite em relação aos bovinos zebuínos (*Bos indicus*), possuem menor resistência frente aos efeitos adversos provocados pelas altas temperaturas. Além de prejudicar a saúde dos animais, o ET também é responsável pela redução do desempenho reprodutivo dos mesmos durante as épocas mais quentes do ano. O ET altera a concentração plasmática dos hormônios reprodutivos, prejudicando a foliculogênese e a produção de gametas viáveis. Além disso, modifica o microambiente uterino e da tuba uterina, podendo reduzir a viabilidade espermática intraútero, bem como a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Touros submetidos a altas temperaturas apresentam redução da libido e redução da qualidade espermática. Desta forma, o ET pode prejudicar a realização das etapas da TE, e conseqüentemente, diminuir a produção embrionária.

Portanto, o objetivo deste trabalho é fazer uma revisão de literatura sobre a influência do ET durante as diversas etapas da TE em bovinos, sendo de suma importância entender os mecanismos que permeiam a redução da viabilidade embrionária frente à hipertermia, permitindo assim, encontrar meios que possibilitem a redução ou a solução deste problema.

2. O ESTRESSE TÉRMICO NA BOVINOCULTURA:

A produção pecuária no Brasil possui relevância para o comércio mundial de alimentos, sendo a produção de carne brasileira a segunda maior do mundo (FERRAZ e FELÍCIO, 2010). A pecuária leiteira também é de fundamental importância, tendo em vista que esta participa na formação da renda de grande número de produtores, além de ser responsável por elevada absorção de mão de obra rural (CAMPOS e PIACENTI, 2007). O Brasil detém o segundo maior rebanho bovino do mundo, ficando atrás da Índia, porém tem o maior rebanho comercial do mundo (FERRAZ e FELÍCIO, 2010), do qual 80% possui influência zebuína (*Bos indicus*), de acordo com a Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ, 2011).

Em média dois terços do território brasileiro estão situados na região tropical, onde há predominância de temperaturas elevadas, devido à alta incidência de radiação solar. Aproximadamente 64% do rebanho bovino mundial é criado em regiões tropicais (AZEVEDO *et al.*, 2005), onde fatores estressantes como as altas temperaturas e umidade em certos períodos do ano, a subalimentação crônica, os riscos de doenças e de parasitas, notavelmente são maiores do que em regiões de clima temperado (HANSEN, 2004; BARROS *et al.*, 2006). Nestas condições ambientais, as raças zebuínas são as que predominam devido a sua maior adaptação em relação às raças européias (SATRAPA, 2011).

A zona de conforto térmico, definida como o intervalo de temperatura em que não há o mínimo esforço dos sistemas termorreguladores para manter a homeotermia (FERRO *et al.*, 2010), é estabelecida entre -1°C a 16°C para bovinos europeus adultos e de 10°C a 27°C para zebuínos adultos (BAËTA e SOUZA, 1997). Quando os animais se encontram na zona de conforto térmico não há comprometimento da atividade reprodutiva (FERRO *et al.*, 2010). Entretanto, quando se encontram acima da temperatura crítica superior, a qual pode variar de acordo com a velocidade do vento, radiação solar, umidade relativa, raça, dentre outros fatores (RODRIGUES, 2006), os animais encontram-se em ET (SILVA, 2000).

Segundo Wolfenson *et al.* (2000), estima-se que 60% da população mundial de bovinos são afetados pelo ET, sendo atribuídas grandes perdas econômicas devido a esta condição. O ET pode levar a alterações dos processos reprodutivos, tanto de forma direta, devido ao efeito direto da hipertermia sobre o sistema reprodutivo, como de forma indireta, relacionada à diminuição do apetite e ingestão de matéria seca (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003). Nas fêmeas e nos machos mamíferos as alterações mais evidentes em consequência da hipertermia são a redução na quantidade e qualidade espermática e redução da fertilidade (HANSEN *et al.*, 2001). Os principais sinais clínicos observados em bovinos que se encontram em ET são o aumento da ingestão de água, redução do consumo de alimentos, aumento da frequência respiratória, aumento da temperatura retal, sudorese excessiva, sialorreia, alterações das concentrações hormonais, diminuição da taxa metabólica, queda na produção de leite em vacas leiteiras, queda da eficiência reprodutiva (PIRES, 2006). A vasodilatação é o primeiro mecanismo acionado para a perda de calor, seguido pela sudorese e por fim da respiração; sendo o aumento da frequência respiratória o primeiro sinal visível (CRUZ *et al.*, 2011).

De acordo com Pires (2006), existem diferentes índices para mensurar o estresse calórico, sendo o mais comum o Índice de Temperatura e Umidade (ITU), calculado a partir da temperatura e da umidade relativa do ar. Porém, a forma mais eficaz é medir a temperatura retal do animal, mas para isso é importante saber que a temperatura retal dos bovinos geralmente apresenta um pico elevado no início da tarde e valores mínimos no início da manhã, dentro da faixa de normalidade de 38,0°C e 39,0 °C. Se os animais apresentarem temperatura superior a 39,4°C, associada a movimentos respiratórios maiores que 60 por minuto e redução em 10% na ingestão de alimentos, é provável que o rebanho esteja manifestando sintomas de ET. A tabela 1 mostra uma relação entre as variações de temperatura retal e a frequência respiratória com os níveis de ET.

Tabela 1. Variáveis fisiológicas e níveis de ET

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

FR = Frequência respiratória

TR = Temperatura retal

Fonte: Pires e Campos (2004)

Os ruminantes são considerados mamíferos homeotérmicos por conseguirem manter a sua temperatura corporal constante frente às variações de temperatura do ambiente. A temperatura corporal é regulada pelo equilíbrio entre a produção e a perda de calor para o ambiente via condução, convecção, radiação e evaporação. Quando o ambiente atua de modo a aumentar a temperatura corporal acima do considerado normal, há a ocorrência do ET (HELDMAIER *et al.*, 2004; HANSEN, 2009).

Os bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus* são derivados de um mesmo ancestral, mas estas duas espécies seguiram caminhos diferentes durante o processo evolutivo, o que permitiu que os bovinos *Bos indicus*, também conhecidos como zebuínos, adquirissem genes de termotolerância. Desta forma, os zebuínos

possuem maior capacidade em regular a temperatura corporal em condições de ET quando comparados aos bovinos de origem europeia (*Bos taurus*). Assim, as produções de leite e carne, bem como os processos reprodutivos provenientes dos *Bos indicus* são menos prejudicados quando comparados aos *Bos taurus* (HANSEN, 2004).

Um dos fatores de estresse mais bem caracterizados que afetam o desenvolvimento embrionário é a exposição a elevadas temperaturas (HANSEN, 2007). Está bem documentado que a exposição de fêmeas de mamíferos ao ET aumenta a mortalidade embrionária (THATCHER e HANSEN, 1993), e que a maior causa da redução na sobrevivência embrionária induzida pelo ET pode ser provocada pelos efeitos adversos das temperaturas elevadas no desenvolvimento dos zigotos e dos embriões (EALY *et al.*, 1993).

3. A BIOTÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS:

Visando um rápido aumento da produção pecuária no Brasil, várias pesquisas nas áreas celular, molecular e genética contribuíram com o desenvolvimento de novas tecnologias na reprodução animal (ABADIA, 2006). A TE é uma técnica amplamente utilizada e que oferece uma série de vantagens para a seleção zootécnica e produção animal tais como: multiplicar rapidamente um genótipo superior, facilitar o transporte e estocagem de material genético, auxiliar no controle de doenças e do sexo do produto e permitir a produção de descendentes de um animal jovem (ANDRADE *et al.*, 2002; MARTINEZ e SOUZA, 2007).

Segundo Thibier (2006), a partir de dados referentes ao ano de 2005, a indústria de embriões bovinos transferiu 612.178 embriões produzidos *in vivo*. O Brasil foi o primeiro colocado entre os países produtores de embriões *in vivo* que estão localizados fora da Europa e da América do Norte, sendo que a maioria dos seus embriões transferidos é realizada em bovinos de corte. Isto mostra que a produção *in vivo* de embriões no Brasil é uma atividade que vem sendo desenvolvida com maior frequência.

A TE tem como objetivo a obtenção de embriões de uma fêmea doadora para em seguida transferí-los para receptoras com a finalidade de completar o período da gestação; baseando-se no princípio da multiplicação da progênie de fêmeas (doadora) consideradas geneticamente superiores dentro de um rebanho (ABADIA, 2006). Segundo os autores Reichenbach *et al.* (2002), Abadia (2006) e Martinez e Souza (2007), as principais etapas envolvidas no processo de TE em bovinos são:

- Seleção zootécnica das doadoras e avaliação clínico-ginecológica das doadoras e das receptoras;
- Tratamento hormonal para superovular as doadoras e sincronizar o ciclo estral das doadoras e das receptoras;
- Observação do estro das doadoras e das receptoras quanto à regularidade e intensidade;
- Inseminação artificial (IA) das doadoras;
- Coleta dos embriões e avaliação da qualidade embrionária;
- Transferência dos embriões das doadoras para as receptoras;
- Diagnóstico de gestação

O procedimento de TE possui limitações que contribuem com a redução da quantidade e qualidade de embriões produzidos. O ET é um dos fatores limitantes que prejudica o sucesso desta biotécnica reprodutiva. Trabalhos realizados mostraram que houve redução no número de embriões transferíveis obtidos após superovulação em climas quentes devido à diminuição da resposta superovulatória (ALFURAIJI *et al.*, 1996), baixa taxa de fertilização (MONTY e RACOWSKY, 1987) e perda da qualidade embrionária (ALFURAIJI *et al.*, 1996). O microambiente formado pela tuba uterina e útero é um determinante do desenvolvimento, e perturbações nesse ambiente podem levar a alterações da função celular e erros de desenvolvimento. Assim, o embrião exposto ao estresse pode se ajustar com sucesso ao ambiente adverso e continuar o seu desenvolvimento, ou morrer como resultado de uma extensa necrose ou apoptose (HANSEN, 2007).

Há grandes evidências de que o ET pode comprometer o oócito e o folículo onde ele se encontra, e o mecanismo pelo qual isso acontece está provavelmente envolvido com alterações na função folicular (HANSEN, 2009). Segundo Roth *et al.*

(2001) a produção de esteróides pelas células da granulosa e da teca foi baixa em cultivo, após a obtenção em abatedouro de ovários provenientes de vacas expostas ao ET 20-26 dias antes do cultivo. Além disso, a exposição de novilhas holandesas ao ET entre o início do estro e a inseminação aumentou o número de embriões com desenvolvimento anormal e retardado comparadas com novilhas mantidas em termoneutralidade (ROCHA *et al.*, 1998). Segundo Hansen (2009), a competência de desenvolvimento do embrião pode ser reduzida se a fertilização for realizada por um espermatozoide exposto ao estresse térmico.

Portanto, é de extrema importância conhecer as consequências geradas pelo ET na produção de embriões durante a TE, com a finalidade de aumentar as taxas de gestação e de recuperação embrionária, melhorando os índices reprodutivos e aumentando a produção.

4. INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NAS DIVERSAS ETAPAS DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES:

4.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS E ESTAÇÕES DO ANO:

A competência de desenvolvimento dos embriões é também um fator dependente de contribuições genéticas de seus progenitores (KHATIB *et al.*, 2008). Há evidências de que bovinos evoluídos em climas quentes adquiriram genes que protegem as células das ações deletérias da temperatura elevada, como é o caso dos bovinos *Bos indicus* e das raças Senepol e Romosinuano, sendo estas duas últimas de origem *Bos taurus* (HANSEN, 2004). Portanto, o genótipo dos animais que serão selecionados para o programa de reprodução deve ser levado em consideração, uma vez que este é o maior determinante da resistência ao ET (TORRES-JÚNIOR *et al.*, 2008).

Vários trabalhos *in vitro* têm demonstrado maiores taxas de desenvolvimento de blastocisto de embriões *Bos indicus* submetidos ao ET, comparados aos

embriões *Bos taurus* (BARROS *et al.*, 2002; PAULA-LOPES *et al.*, 2003). Em relação aos taurinos, os zebuínos possuem menor redução da função embrionária quando expostos ao ET, demonstrando que esta resistência a altas temperaturas se estende em nível celular (PAULA-LOPES *et al.*, 2003). Em um trabalho realizado por Eberhardt *et al.* (2009) para avaliar a influência do oócito e do sêmen na resistência do embrião ao ET, durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário *in vitro*, em touros (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) e em vacas (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus*, e híbridas – *Bos taurus* x *Bos indicus*), observaram (Tabela 2) que os efeitos deletérios do ET no desenvolvimento embrionário inicial foram menos pronunciados nos zebuínos comparados aos taurinos e aos híbridos. Além disso, o decréscimo nas taxas de desenvolvimento dos blastocistos provocados pela exposição a 41°C por 12 horas foi mais evidente para embriões que tinham genótipo taurino predominante. Ainda, embriões provenientes de oócitos taurinos (Holandês) foram mais resistentes ao ET quando fertilizados com sêmen de zebuínos (Nelore) do que com sêmen de taurinos (Angus). Com isso os autores concluíram que a resistência ao ET foi o resultado da contribuição genética do oócito e do espermatozoide.

Tabela 2. Taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto expandido de vacas Nelore (N) e Holandesas (H), fertilizadas com sêmen de touros Nelore (N) ou Angus (A), mantidos a 39°C ou sujeitos ao estresse térmico de 41°C por 12h, 96h após inseminação.

Variáveis	Temperatura (°C)							
	39	41	39	41	39	41	39	41
Raça do touro	N	N	A	A	N	N	A	A
Raça da vaca	N	N	N	N	H	H	H	H
Oócito (n)	171	166	172	177	169	176	179	173
Clivagem^a (% de oócitos)	66,1 ^a	61,4 ^y	58,7 ^b	66,1 ^z	65,7 ^a	60,2 ^y	68,2 ^a	63,0 ^{y,z}
Blastocisto^a (% de oócitos)	33,3 ^a	29,5 ^y	30,8 ^a	24,9 ^{y,w}	30,8 ^a	22,7 ^{w,*}	27,9 ^a	12,7 ^{z,*}
Blastocisto expandido^a (% de oócitos)	14,0 ^a	10,8 ^y	14,0 ^a	9,0 ^y	13,6 ^a	8,5 ^y	12,3 ^a	2,9 ^{z,*}

^{a,b,c}Médias com diferentes sobrescritos representam diferenças significantes entre combinações de raças a 39°C.

^{y,z,w}Médias com diferentes sobrescritos representam diferenças significantes entre combinações de raças a 41°C.

^a O desvio padrão médio para as taxas de clivagem e blastocisto foi <0.7%

* Diferença significativa entre os grupos controle e estresse térmico entre a mesma combinação de raça. Interações touro x tratamento e vaca x tratamento foram significantes para as taxas de blastocisto.

Fonte: Eberhardt *et al.* (2009)

Sendo assim, uma alternativa de cruzamento para a produção pecuária em climas quentes é incorporar os genes zebuínos que conferem termotolerância às raças européias, porém evitando selecionar genes que reduzem a produção dos animais (HANSEN, 2004).

As inter-relações entre nutrição e reprodução em bovinos são bastante complexas, obtendo respostas diversificadas, o que explica parcialmente os resultados inconsistentes de superovulação e de produção embrionária na TE (REICHENBACH *et al.*, 2002). Segundo Rigolon *et al.* (2000) tanto a falta quanto o excesso de energia na dieta afetam negativamente a produção de embriões, portanto o estado nutricional do animal possui significativa influência no sucesso da TE. A condição nutricional deficiente contribui com a baixa fertilidade (MORAES *et*

al., 2005), uma vez que a nutrição das doadoras parece interferir diretamente na resposta superovulatória e qualidade dos embriões (FIGUEIRA *et al.*, 2005).

Animais submetidos ao ET apresentam redução na ingestão de alimentos, o que possivelmente provocará alterações no balanço energético e na disponibilidade nutricional, podendo afetar a ciclicidade, o estabelecimento da gestação e o desenvolvimento fetal (HANSEN, 2009). A redução na ingestão de matéria seca e o aumento do balanço energético negativo reduzem ainda mais a fertilidade de vacas leiteiras durante o período pós-parto (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003). O balanço energético negativo se torna mais acentuado devido ao ET (CRUZ *et al.*, 2011), o que promove uma redução nas concentrações plasmáticas de insulina, glicose e IGF-I, e um aumento nas concentrações plasmáticas de GH e ácidos graxos não esterificados, os quais podem afetar a reprodução (BUTLER, 2001). A insulina, o IGF-I e a glicose são essenciais para manter uma foliculogênese normal e suas baixas concentrações plasmáticas levam a um desenvolvimento folicular anormal, piora na detecção do estro e baixa qualidade oocitária (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003).

As estações do ano escolhidas para o manejo reprodutivo devem ser consideradas, uma vez que, na Flórida, as taxas de concepção caem de 40-60% nos meses mais frios para 10-20% ou menos nos meses mais quentes, de acordo com a severidade do ET (CAVESTANY *et al.*, 1985). Embora a temperatura ambiente caia e os animais não estejam mais expostos ao estresse, a fertilidade permanece baixa no outono em relação ao inverno, contando com aproximadamente um terço ou mais da síndrome de baixa fertilidade observada durante o verão (WOLFENSON *et al.*, 2000).

4.2. SUPEROVULAÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO:

A superovulação tem como objetivo induzir, a partir da administração de hormônios exógenos, a múltipla ovulação (BARROS e NOGUEIRA, 2001), aumentando o número de embriões recuperados no momento da TE.

O ET pode afetar a secreção dos hormônios reprodutivos, a foliculogênese e a produção de gametas (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003). Esta interferência pode alterar os resultados esperados na superovulação e na sincronização do cio.

Durante o ET, as concentrações plasmáticas de LH podem estar aumentadas (TROUT *et al.*, 1998), reduzidas (RONCHI *et al.*, 2001) ou não alteradas (ROTH *et al.*, 2000). Já a concentração plasmática de inibina é baixa em vacas estressadas no verão, elevando as concentrações plasmáticas de FSH durante o período pré-ovulatório, permitindo um aumento no número de folículos de tamanho médio (ROTH *et al.*, 2000).

O estradiol apresenta concentrações plasmáticas reduzidas em vacas leiteiras durante o ET (WOLFENSON *et al.*, 1997), estando correlacionado com a diminuição das concentrações de LH e com a baixa dominância do folículo selecionado (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003).

A atuação do ET sobre a concentração plasmática de progesterona é mais controversa, com alguns estudos relatando que não há efeito sobre a sua concentração, porém havendo atraso na luteólise (WILSON *et al.*, 1998), enquanto outros reportaram aumento (TROUT *et al.*, 1998), redução (RONCHI *et al.*, 2001) ou a não alteração (GUZELOGLU *et al.*, 2001). A baixa concentração plasmática de progesterona, durante a fase luteal antes da concepção, pode comprometer o desenvolvimento folicular, levando a uma maturação oocitária anormal, morte embrionária precoce (AHMAD *et al.*, 1995) e falha na implantação (MANN *et al.*, 1999).

O mecanismo pelo qual o ET altera as concentrações dos hormônios reprodutivos circulantes não é conhecido (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003), mas acredita-se que o aumento da secreção de corticoesteróide (ROMAN-PONCE *et al.*, 1978), a qual pode inibir a secreção de GnRH e de LH, seja a responsável (GILAD *et al.*, 1993). Porém, há trabalhos que demonstram que a concentração de cortisol em vacas expostas ao ET não foi alterada (TORRES-JÚNIOR *et al.*, 2008).

A eficiência da superovulação pode ser comprometida devido à ampla variedade na resposta dos animais frente ao tratamento hormonal (ABADIA, 2006). Alguns estudos afirmam que o clima quente está associado à redução no número de embriões transferíveis após superovulação, devido à baixa resposta das vacas a

este tratamento. Os resultados obtidos por Chebel *et al.* (2008), sobre os fatores que afetam a coleta e a TE em vacas leiteiras, corroboram esta afirmação, uma vez que os autores encontraram uma resposta menor ao tratamento superestimulatório em vacas leiteiras em lactação, as quais foram mais comprometidas pela exposição ao ET. Porém, segundo Putney *et al.* (1989) o ET não teve nenhum efeito adverso na resposta superovulatória em novilhas holandesas, mas aumentou a incidência de embriões com desenvolvimento retardado e embriões classificados como de qualidade razoável a ruim.

Em um trabalho realizado por Barati *et al.* (2006) com vacas de corte de origem *Bos indicus*, com o objetivo de avaliar a resposta superovulatória dos animais após a aplicação de três diferentes doses de FSH durante o inverno e o verão, foi observado que não houve diferença na resposta superovulatória dos animais e no número total de embriões transferidos entre as duas estações do ano. Os animais do presente experimento apresentaram ET médio, com temperatura retal média de $38.8^{\circ}\text{C} \pm 0.04$; não atingindo a temperatura retal crítica de 39.6°C , a qual é apresentada pelos *Bos taurus* durante o ET. Portanto, o fato dos *Bos indicus* possuírem maior capacidade de termorregulação em relação aos *Bos taurus* pode ter contribuído para que não houvesse diferença na resposta superovulatória. Além disso, Alfuraiji *et al.* (1996) demonstraram que durante o verão há um maior impacto na resposta superovulatória em *Bos taurus*, com os animais apresentando menor número de embriões transferíveis, comparado aos meses de inverno.

Torna-se mais difícil detectar o estro nas doadoras e receptoras quando estas se encontram em ET (HANSEN *et al.*, 2001), ocorrendo diminuição na sua duração (ABILAY *et al.*, 1975) e intensidade (GANGWAR *et al.*, 1965), bem como aumento na incidência de anestro e ovulação silenciosa (GWAZDAUSKAS *et al.*, 1981). Em um trabalho realizado por Peralta *et al.* (2005) com o objetivo de comparar três sistemas de detecção de estro (Heat Watch® device, ALPRO® e a detecção visual) em um rebanho leiteiro comercial durante o verão, foi relatado que apesar da observação visual do comportamento estral ter detectado o maior número de vacas em estro, não resultou em maior número de concepções devido ao erro na observação do estro ou no momento da inseminação. Além disso, foram encontradas menores porcentagens de detecção de estro em relação a outros

trabalhos que compararam o Heat Watch® e os sistemas de pedômetro com a observação visual, e que isto se deve provavelmente ao ET.

Alguns autores demonstraram que a redução na probabilidade de detecção do estro durante o ET ocorre devido ao aumento da secreção de cortisol (ROMAN-PONCE *et al.*, 1978), e que este hormônio bloqueia o comportamento sexual induzido pelo estradiol (HEIN e ALLRICH, 1992). Porém, outros autores não observaram uma correlação entre o ET e a secreção de cortisol, com alguns experimentos demonstrando que houve aumento transitório (ELVINGER *et al.*, 1992), redução (ABILAY *et al.*, 1975) ou não alteração na secreção deste hormônio (TORRES-JÚNIOR *et al.*, 2008). Apesar de ter sido relatado que o ET promoveu uma redução nas concentrações periféricas de estradiol-17 β durante o estro (WOLFENSON *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 1998), isto não foi observado em todos os trabalhos (ROSENBERG *et al.*, 1982). Também é possível que a letargia física promovida pelo ET seja a causa da redução na expressão do estro (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999).

A sincronização de cio consiste na manipulação do ciclo estral por meio da utilização de hormônios ou associações hormonais que induzem a luteólise ou prolonguem a vida do corpo lúteo, de maneira que um grupo de fêmeas entre em estro e/ou ovule durante um curto período de tempo ou até mesmo em um único dia (MORAES *et al.*, 2002). Na TE, esta etapa é importante para sincronizar o cio das receptoras com as doadoras, viabilizando a transferência dos embriões.

No trabalho realizado por De Rensis *et al.* (2002), para avaliar a fertilidade de vacas leiteiras no pós-parto durante o inverno e verão seguida pela sincronização de estro e inseminação artificial em tempo fixo (IATF), os autores concluíram que a supervisão veterinária aliada à sincronização de estro e IATF podem melhorar a fertilidade de vacas sob ET. Neste trabalho os animais controle eram inseminados após a observação visual do estro, enquanto dois grupos de vacas eram tratados com GnRH (Hormônio gonadotrófico) e PGF2 α (Prostaglandina F 2 α), e hCG (Gonadotrofina coriônica humana) e PGF2 α , respectivamente, para indução da ovulação e sincronização do estro. A tabela abaixo (Tabela 3) mostra que houve uma redução estatisticamente significativa na taxa de prenhez nas vacas do grupo controle durante o verão em relação ao inverno, o que é esperado devido ao ET

promover uma redução na expressão do estro (ROMAN-PONCE *et al.*, 1981; HANSEN e ARÉCHIGA, 1999), ou devido a erros na IA (DE RENSIS *et al.*, 2002). Apesar disso, não houve uma diferença estatística no aumento da taxa de prenhez entre os grupos tratados durante o verão, e entre os grupos tratados e o grupo controle nesta mesma época.

Tabela 3. Taxas cumulativas de prenhez (número de vacas prenhes pelo total do número de vacas) em vacas leiteiras nos dias 90 e 135 do pós-parto no verão e inverno

Tratamento	Taxa de prenhez cumulativa nos 90 dias pós-parto		Taxa de prenhez cumulativa nos 135 dias pós-parto	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
CONT	42/126 (33%) ^a	46/100 (46%)	78/126 (62%) ^a	76/100 (76%)
GnRH	30/80 (37%)	32/84 (38%)	57/80 (71%)	67/84 (79%)
hCG	30/76 (40%)	35/90 (38%)	56/76 (73%)	70/90 (77%)

Vacas CONT foram inseminadas no primeiro e, se necessário, nos primeiros períodos subsequentes de detecção de estro. As vacas GnRH e hCG foram sincronizadas e a ovulação foi induzida com PGF2 α e GnRH, ou PGF2 α e hCG, respectivamente, e inseminadas em tempo fixo. Inseminações subsequentes (se necessárias) foram realizadas quando o próximo estro foi detectado.

^a P < 0.05 entre estações na mesma linha.

Fonte: De Rensis *et al.* (2002)

Porém, houve uma significativa redução no número de dias entre o parto e a próxima concepção durante o verão e inverno entre os grupos dos dois tratamentos, em relação ao grupo controle, podendo ser observada na tabela 4. Desta forma houve um aumento na fertilidade das vacas sincronizadas e inseminadas em tempo fixo durante o verão, permitindo com que os animais produzam mais descendentes durante sua vida reprodutiva.

Portanto, a sincronização de estro pode ser uma alternativa para a dificuldade na observação do cio em vacas sob ET, podendo melhorar os índices reprodutivos. Porém, sua utilização de forma isolada, com a finalidade de aumentar a fertilidade dos animais submetidos ao ET, pode não ser suficiente.

Tabela 4: Média do intervalo em dias do parto à concepção no pós-parto de vacas leiteiras inseminadas no inverno e verão

Tratamento	Intervalo do parto à concepção (dias)	
	Verão	Inverno
CONT	139 ± 3.1 ^{a,b}	126 ± 3.2 ^{a,b}
GnRH	112 ± 3.2	102 ± 3.2
hCG	114 ± 3.2	106 ± 4.2

Vacas CONT foram inseminadas no primeiro e, se necessário, nos períodos subsequentes de detecção de estro. As vacas GnRH e hCG foram sincronizadas e a ovulação foi induzida com GnRH (Dia 0), PGF2 α (Dia 7) e GnRH (Dia 9), ou hCG (Dia 0), PGF2 α (Dia 7) e hCG (Dia 9), e inseminadas em tempo fixo. Inseminações subsequentes (se necessárias) foram realizadas nos períodos subsequentes do próximo estro.

^a P < 0.05 entre estações na mesma linha.

^b P < 0.05 entre tratamentos na mesma coluna.

Fonte: De Rensis *et al.* (2002)

4.3. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E MONTA NATURAL:

Os testículos necessitam de uma temperatura entre 4°C e 7°C abaixo da temperatura corporal central para evitar lesões que podem ser provocadas pelas altas temperaturas. O músculo cremáster, a túnica dartos, o plexo pampiniforme e as glândulas sudoríparas, são mecanismos intrínsecos dos testículos utilizados na termorregulação (BRAKETT, 2006).

O aumento da temperatura testicular resulta em elevado metabolismo e demanda de oxigênio, porém o fluxo sanguíneo testicular é limitado, não acompanhando este aumento na demanda, levando à hipóxia, produção de espécies reativas de oxigênio e deterioração da qualidade seminal (SETCHELL, 1998). Ainda, a alta temperatura testicular pode levar a uma redução na produção espermática, decréscimo da motilidade e aumento na proporção de espermatozoides morfologicamente anormais no ejaculado (HANSEN, 2009), sendo os espermatócitos e as espermátides as células mais susceptíveis aos danos provocados pelo ET (SETCHELL, 1998). A secreção hormonal nos machos também pode ser alterada pelo ET, promovendo uma baixa secreção de LH e um declínio inicial na concentração de testosterona circulante por duas semanas; a qual retorna

aos níveis normais mesmo se o animal continuar sob influência do ET (RHYNES e EWING, 1973; HANSEN, 2009).

O ET produz efeitos menos severos em touros zebuínos do que em touros europeus (SKINNER e LOUW, 1966), e isto também se deve às alterações morfológicas testiculares que auxiliam a termorregulação. Segundo Brito *et al.* (2004), as menores proporções do comprimento e volume arterial em relação ao volume do tecido testicular observadas nos *B. taurus*, quando comparadas aos *B. indicus* e aos touros híbridos (5/8 ou 5/16 Charolês X Zebu), sugerem que o suprimento sanguíneo testicular pode ser mais limitado nos taurinos, contribuindo com a maior susceptibilidade destes aos ambientes mais quentes. Estes autores encontraram ainda que os *B. indicus* apresentam a menor distância entre o sangue arterial e o sangue venoso, quando comparado aos taurinos e aos híbridos, devido a menor espessura da parede arterial e pela maior proximidade das artérias às veias, o que contribui para uma troca de calor mais eficiente.

Segundo Pegorer *et al.* (2007), a utilização de touros Gir aumentou as taxas de gestação quando comparadas com touros Holandeses (9,1% versus 5,0%, respectivamente), durante o ET de verão, em vacas Holandesas após IA ou IATF. Desta forma concluíram que a utilização de touros *Bos indicus* pode resultar em maiores taxas de concepção em vacas de aptidão leiteira Holandesas do que os touros *Bos taurus*, durante o ET.

Em um estudo feito por Johnston *et al.* (1963) em que foi realizada uma comparação da qualidade espermática de touros das raças Holandês, Pardo Suíço, Red Sindhi X Holandês e Red Sindhi x Pardo Suíço foi observado que durante o ET houve um marcado declínio na qualidade do sêmen dos touros de raça pura, o qual se tornou perceptível 1 a 2 semanas após o estresse. Já o declínio na concentração espermática e no total de espermatozoides produzidos das raças híbridas não foi tão severo, não aconteceu tão cedo, e retornou próximo à normalidade mais rapidamente do que nas raças puras. Os autores correlacionaram este retorno à normalidade mais rápido nas raças híbridas em relação às raças puras, devido às primeiras apresentarem maior termotolerância durante o ET. Ainda encontraram um inesperado aumento na concentração espermática e no total de espermatozoides produzidos em todos os touros do presente experimento durante a semana de ET,

seguido por um declínio na qualidade do sêmen dos touros de raça pura, a qual se tornou aparente uma a duas semanas após o estresse. Os autores declararam que as bases fisiológicas ainda não haviam sido elucidadas no momento em que foi realizado o experimento. O aumento dos espermatozoides anormais foi significativamente maior nas raças Holandês e Pardo Suíço do que nas raças híbridas, sendo peças intermediárias enroladas ou dobradas o primeiro defeito morfológico visível. Contudo, um grande número de cabeças piriformes apareceu dentro de 2 semanas após o estresse. Ainda, os testículos de 3 dos touros de raças puras estavam macios à palpação, indicando a ocorrência de uma degeneração testicular. Portanto, o cruzamento entre as raças demonstrou maior resistência ao ET comparado às raças puras. Isto provavelmente se deve ao fato de a raça Red Sindhi ser de origem zebuína e, portanto, possui maior capacidade de termorregulação quando comparada às raças Holandês e Pardo Suíço, as quais são de origem taurina.

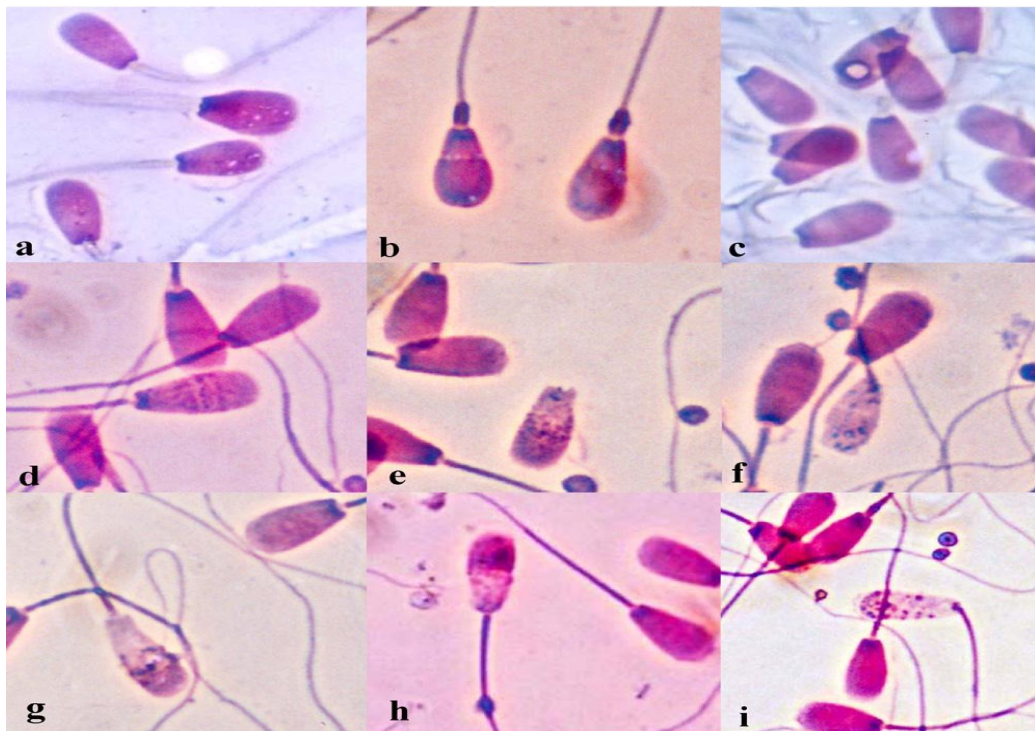
Vários criadores de gado de leite utilizam touros para monta natural na tentativa de superar os problemas associados à detecção de estro (RISCO, 2000). Porém, a habilidade dos touros em encontrar e cobrir as vacas que estão em estro determina a eficácia no programa de reprodução, e vários fatores podem causar um grande impacto nesta habilidade final (NILES e RISCO, 2002). O ET afeta a IA por reduzir a duração do estro e a taxa de concepção das vacas (BADINGA *et al.*, 1985); porém também afeta os touros, reduzindo a libido, a motilidade espermática e aumentando o número de espermatozoides anormais no ejaculado (OTT, 1986). Além disso, acredita-se que os touros permanecem subférteis ao final da estação quente por mais seis a oito semanas (OTT, 1986), provocando uma redução na fertilidade quando se efetua a monta natural após o término do ET (NILES e RISCO, 2002). Portanto, vários trabalhos têm comparado a eficiência reprodutiva de vacas utilizando IA e monta natural (SMITH *et al.*, 2004).

Em um trabalho realizado por Fernandes *et al.* (2008), quatro touros Nelore com idade entre 30-36 meses, os quais apresentavam boa qualidade seminal (motilidade espermática maior que 80% e espermatozoides morfolologicamente normais), tiveram os testículos insulados com um saco de lã e cobertos com nylon plástico por 5 dias. Após este período o sêmen de todos os touros foi coletado com

eletroejaculador um dia antes, 7, 14 e 21 dias após a insulação, sendo posteriormente avaliados quanto à morfologia, vigor e motilidade espermáticas.

Foi demonstrado que alterações como defeitos de cabeça, aparecimento de vacúolos nucleares e condensação anormal da cromatina (Figura 1), além da redução das taxas de blastocisto e clivagem de embriões produzidos *in vitro*, surgiram em consequência da hipertermia.

Figura 1. Imagens representativas de diferentes perfis de vacúolos nucleares (a-c) e condensação anormal da cromatina (d-i) em espermatozoides de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) após insulação escrotal (intervalo de 21 dias). Corante Fielgen. Microscópio de contraste de fase (1000 X).



Fonte: Fernandes *et al.* (2008)

Os dias 14 e 21 após a insulação escrotal foram os que mais apresentaram anormalidades espermáticas no ejaculado, sendo maiores a porcentagem de células espermáticas com vacúolos nucleares e os danos na cromatina do que a porcentagem de espermatozoides com morfologia anormal de cabeça, durante estes mesmos períodos. Segundo os autores, no dia 7 após a insulação não houve mudanças significativas nas características seminais, provavelmente devido ao fato dos espermatozoides se encontrarem na cauda do epidídimo e na ampola dos

ductos deferentes no momento da insulação escrotal. Desta forma, a cabeça e as estruturas nucleares podem estar mais compactas e resistentes embora o ambiente epididimário seja também alterado pelo ET. A população espermática após a realização do gradiente de Percoll apresentou uma porcentagem satisfatória de integridade do acrossoma em todos os períodos do experimento, sendo compatível com boas taxas de reação acrossomal e fertilização.

Ainda neste experimento, ovários de vacas híbridas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) foram coletados em abatedouro para obtenção de oócitos para a realização da produção *in vitro* de embriões. Os oócitos foram fertilizados com o sêmen dos touros, proveniente de cada um dos tratamentos, sendo em seguida incubados a 39°C com 5% de CO₂ por 22 horas. Dois a sete dias após a fertilização, os embriões foram avaliados com relação à clivagem e à formação de blastocistos.

Com exceção de um touro, o qual já apresentou redução na taxa de blastocisto 7 dias após a insulação, todos os demais tiveram redução na taxa de formação de blastocisto apenas após 14 dias, quando as anormalidades da cromatina foram de, no mínimo 15%, e dos vacúolos nucleares foram de 20%.

Apesar dos efeitos adversos provocados pelo ET durante a TE acometerem principalmente as fêmeas comprometendo, desta forma, o desenvolvimento embrionário, os machos expostos ao ET também podem contribuir com a redução nas taxas de gestação e de desenvolvimento embrionário, uma vez que a qualidade espermática pode ser reduzida em função das altas temperaturas.

4.4. TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES E TAXAS DE GESTAÇÃO

A escolha das doadoras é um dos pontos críticos da TE, uma vez que estas, além de possuírem alto valor zootécnico, não devem apresentar distúrbios reprodutivos para garantir a produção de embriões viáveis. Já as receptoras possuem grande importância devido à necessidade de levarem a gestação a termo (ABADIA, 2006).

Os efeitos adversos da elevada temperatura corporal, induzidos pelo ET, sobre o desenvolvimento dos zigotos e embriões, pode ser um importante fator relacionado à sobrevivência embrionária (EALY *et al.*, 1993).

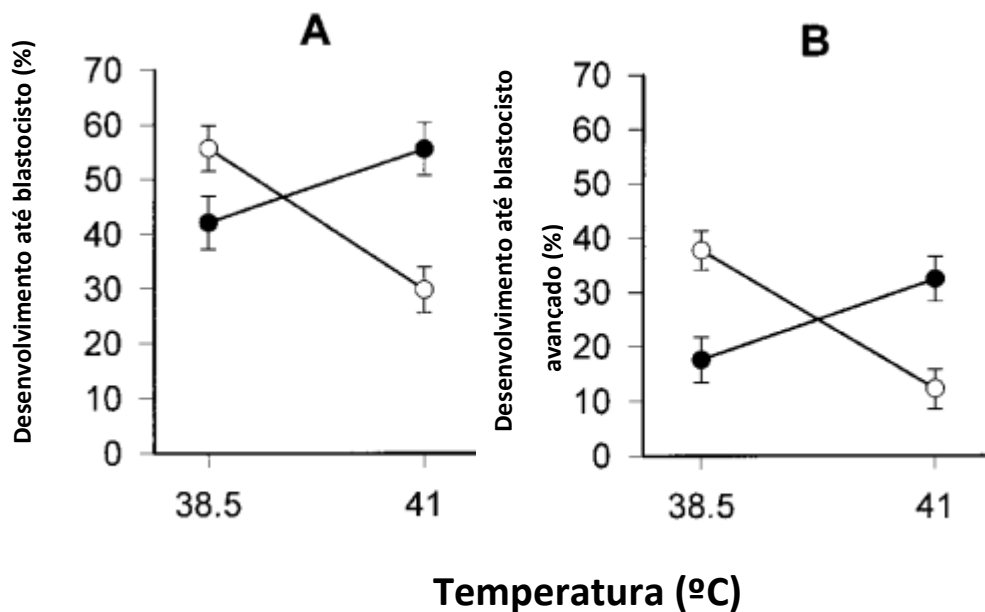
É possível que a exposição de um espermatozoide a elevadas temperaturas dentro do útero ou tuba uterina de uma fêmea submetida ao ET possa comprometer a sobrevivência espermática intrauterina, ou a sua capacidade de fertilização (HANSEN, 2001). Além disso, durante o ET o fluxo sanguíneo é reduzido no útero devido ao seu direcionamento para as regiões periféricas do corpo do animal, e há um aumento da temperatura intrauterina pelo comprometimento da dissipação do calor. Assim, o aporte nutricional e hormonal se tornam insuficientes, prejudicando a função do endométrio e da tuba uterina (ROMAN-PONCE *et al.*, 1978). Estas mudanças inibem o desenvolvimento embrionário (RIVERA e HANSEN, 2001), aumentam a perda embrionária precoce e reduzem a proporção de inseminações bem sucedidas (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003). A elevada temperatura ambiente também afeta o estágio de pré-implantação embrionária (RAY *et al.*, 1992), mas a magnitude do efeito diminui conforme os embriões vão se desenvolvendo (RIVERA e HANSEN, 2001). Gonçalves *et al.* (2002) ressaltou que um aumento de temperatura uterina de 0,5°C já reduz a taxa de concepção em 10%.

Block *et al.* (2002) realizaram um estudo *in vitro* com a finalidade de determinar se a habilidade dos embriões de gado Brahman em resistirem aos efeitos deletérios do ET ocorreu devido a contribuições do espermatozoide, do oócito ou de ambos. Foram feitos dois experimentos. O primeiro experimento tinha como objetivo demonstrar os efeitos da raça da vaca doadora de oócitos na resistência dos embriões bovinos ao ET. Para tal, oócitos de vacas das raças Holandês e Brahman foram coletados em abatedouro e fertilizados *in vitro* com sêmen de diferentes touros da raça Angus. Os embriões que apresentaram nove ou mais células foram aleatoriamente divididos em grupo controle (incubados a 38.5°C com 5% de CO₂ por 8 dias) ou grupo submetido ao ET (incubados a 41°C por 6 horas com 7% de CO₂ e depois incubados a 38.5°C a 5% de CO₂ por 8 dias). Posteriormente eram analisadas as proporções de embriões que se encontravam no estágio de desenvolvimento de blastocisto ou no estágio de blastocisto avançado (blastocisto expandido, blastocistos que estavam eclodindo e blastocistos eclodidos).

O segundo experimento tinha como objetivo demonstrar os efeitos da raça do touro na resistência dos embriões bovinos ao ET. Para tal, oócitos de vacas da raça Holandês foram coletados em abatedouro, sendo que 50% dos mesmos foram fertilizados *in vitro* com sêmen de diferentes touros da raça Angus e os 50% restantes foram inseminados com sêmen de diferentes touros da raça Brahman. Conforme realizado no primeiro experimento, os embriões do segundo experimento que apresentavam 9 células ou mais eram alocados aleatoriamente no 4º dia após a fertilização para o grupo controle ou para o grupo submetido ao ET. Ainda neste experimento, as proporções de embriões que se desenvolveram até o estágio de blastocisto e de blastocisto avançado também foram analisadas.

De acordo com a figura 2, os autores observaram no primeiro experimento que a exposição dos embriões provenientes de oócitos de vacas Holandesas ao ET reduziu o desenvolvimento embrionário comparado ao grupo controle desta mesma raça. Em contraste, o ET não reduziu o desenvolvimento de embriões de oócitos Brahman.

Figura 2. Efeito do estresse térmico no desenvolvimento de embriões (≥ 9 células) no dia 4, produzidos com oócitos de Brahman (●) e oócitos de Holandês (○). **Painel A** representa a proporção de embriões desenvolvendo a blastocisto no dia 8 após a fertilização. **Painel B** representa a proporção de embriões que se desenvolveram até blastocisto avançado (blastocisto expandido, blastocisto eclodindo e blastocisto eclodido) no dia 8. Dados que representam os menores intervalos são o desvio padrão médio. Houve uma interação raça X temperatura afetando a porcentagem de blastocistos ($P < 0.001$) e a porcentagem de blastocistos avançados ($P < 0.005$).



Fonte: Block *et al.* (2002)

Já no segundo experimento (Tabela 5), a proporção de embriões com menos de 4 células no 4º dia após a fertilização tendeu a ser menor para os embriões inseminados com sêmen de touros Brahman. Para os embriões que tinham entre nove ou mais células, o ET reduziu significativamente a porcentagem de embriões que se desenvolveu até o estágio de blastocisto e blastocisto avançado, sendo similar para os embriões fertilizados com sêmen de touros Angus e Brahman.

Tabela 5. Taxa de clivagem e de desenvolvimento de oócitos de Holandês no dia 4 após a fertilização *in vitro* com espermatozoide de Angus e Brahman

	Brahman	Angus
Taxa de clivagem (%) ^a	63.6 ± 7.5% (203/324)	77.0 ± 7.5% (230/309)
Porcentagem do total de oócitos		
2-3 células	8.8 ± 1.3% (28/324)	5.1 ± 1.3% (15/309)
4-8 células	14.9 ± 2.8% (48/324)	21.8 ± 2.8% (64/309)
≥ 9 células	39.3 ± 6.8% (125/324)	50.1 ± 6.8% (159/309)
Porcentagem de oócitos clivados		
2-3 células ^b	14.4 ± 1.9% (28/203)	6.7 ± 1.9% (15/230)
4-8 células	25.5 ± 4.1% (48/203)	28.4 ± 4.1% (64/230)
≥ 9 células	59.5% ± 5.3% (125/203)	64.9 ± 5.3% (159/230)

^aDados que representam os menores intervalos são o desvio padrão médio. Dados dentro dos parêntesis representam a proporção de oócitos por todas as replicatas do experimento.

^bP < 0.02.

Fonte: Block *et al.* (2002)

Estes resultados indicaram que a contribuição do oócito possui um papel maior na habilidade dos embriões Brahman em resistirem aos efeitos do ET do que a contribuição do espermatozoide, uma vez que os embriões que se apresentaram no estágio de nove ou mais células no dia 4 após a fertilização foram mais afetados pelo ET quando produzidos com oócitos de Holandês do que com oócitos de Brahman. Em contraste, a raça do touro não apresentou efeito na resistência térmica em embriões produzidos utilizando sêmen de Angus e de Holandês. Além disso, a maioria da herança citoplasmática nos mamíferos é proveniente do oócito (SMITH e ALCIVAR, 1993), e este possui fatores citoplasmáticos, tais como as mitocôndrias, RNAm, antioxidantes e proteínas, que persistem durante a vida embrionária, permitindo um aumento na resistência ao ET. Apesar do espermatozoide ser transcricionalmente inativo, ele pode contribuir com componentes não nucleares, tais como a mitocôndria e a membrana plasmática, para o aumento da termotolerância embrionária ao ET, porém de forma menos significativa do que o oócito (BLOCK *et al.*, 2002).

Os efeitos maternos da hipertermia são mais pronunciados quando acontecem entre o início do estro e a inseminação (PUTNEY *et al.*, 1989) e durante as primeiras clivagens embrionárias (EALY *et al.*, 1993). Os efeitos do ET no desenvolvimento de embriões bovinos são reduzidos com o avanço do

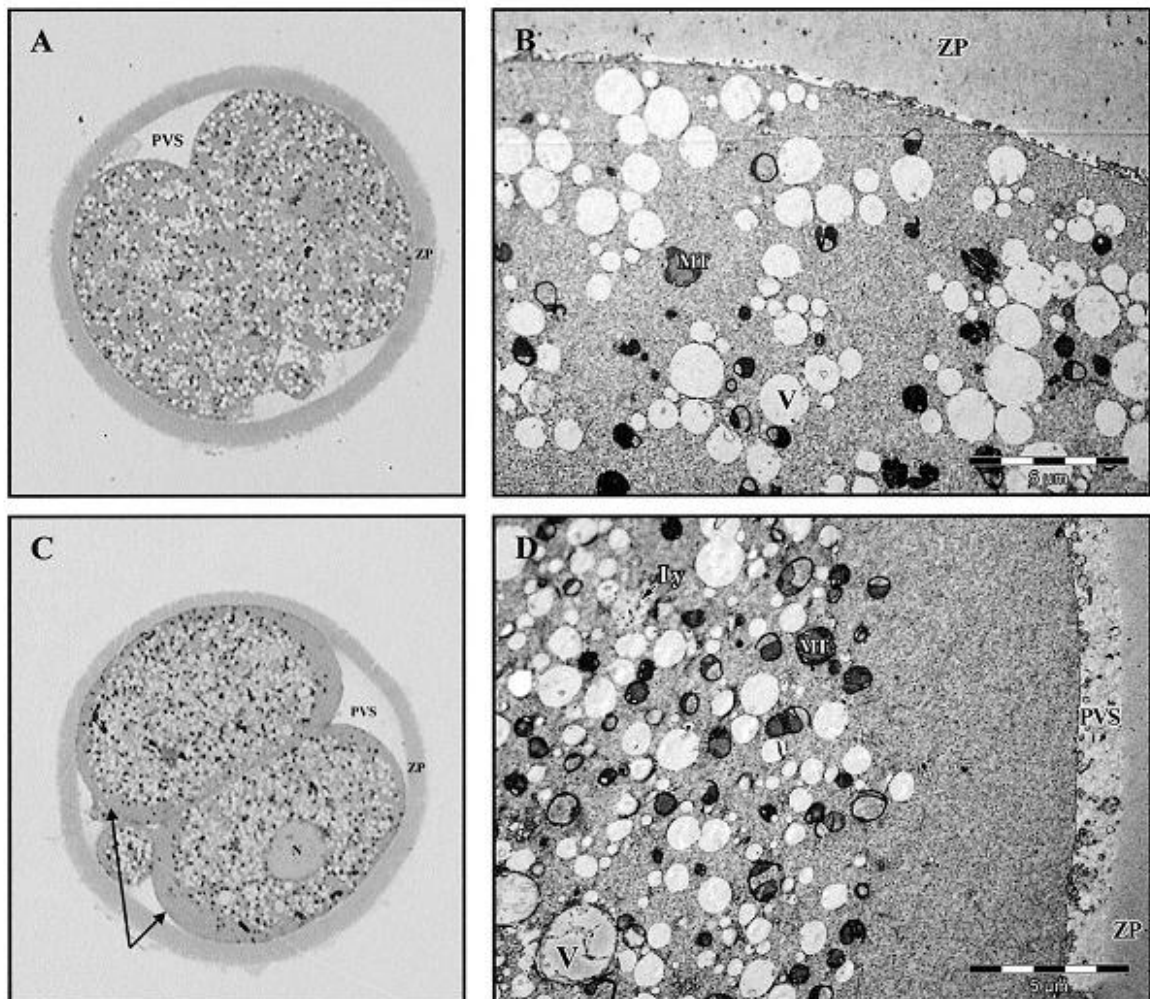
desenvolvimento embrionário após o estágio de duas a quatro células (EDWARDS e HANSEN, 1997; KRININGER *et al.*, 2002).

Segundo Edwards e Hansen (1997), o aumento na termotolerância conforme o embrião se desenvolve está relacionado ao aumento no número de células ou na aquisição de mecanismos bioquímicos termoprotetores ao longo do seu desenvolvimento. Embriões com maior número de células possuem maior capacidade de sobreviver à perda de uma fração de suas células do que embriões com menor número celular. Membros da família das *heat shock proteins 70* (HSP70) e a glutathione são mecanismos bioquímicos termoprotetores adquiridos pelo embrião ao longo do seu desenvolvimento. As HSP70 presumivelmente protegem as células do ET pela renaturação das proteínas danificadas e estabilização do RNA ribossomal (DUNCAN e HERSHEY, 1989; NOVER e SCHARF, 1991), enquanto que a glutathione é conhecida por limitar os efeitos dos radicais livres (LOVEN, 1988).

Segundo Rivera *et al.* (2003), as mudanças celulares provocadas pela temperatura elevada, as quais levam ao bloqueio do desenvolvimento embrionário, não são bem conhecidas. De acordo com um experimento realizado por estes autores, as alterações ultraestruturais observadas em embriões bovinos de duas células produzidos *in vitro* e *in vivo*, após exposição ao choque térmico, foram semelhantes. Nos embriões produzidos *in vitro*, todas as organelas celulares se moveram centralmente, deixando a periferia do blastômero desprovida de organelas. A distância média da membrana plasmática da região do citoplasma contendo as organelas aumentou pela exposição dos embriões a 41°C e a 43°C, comparado com embriões submetidos à temperatura de 38.5°C. Além disso, várias mitocôndrias estavam inchadas em embriões que sofreram ET. Os embriões expostos a 43°C apresentaram aumento da distância entre as duas membranas do envelope nuclear, organelas mais unidas e redistribuídas pela região perinuclear, vacuolização do nucleoplasma e citoplasma, citoplasma recoberto por material eletrodense heterogêneo, cromatina com degeneração severa e aparência irregular e maior número de lisossomos.

Em particular, as organelas dos embriões produzidos *in vivo*, quando submetidos à temperatura de 41°C, afastaram-se da membrana plasmática em direção ao núcleo, deixando uma área livre de organelas em volta da borda dos blastômeros (Figura 3). Os lisossomos apareceram com maior frequência nos embriões produzidos *in vivo* e estressados a 41°C por 6 horas, do que nos embriões produzidos *in vitro* e tratados nas mesmas condições.

Figura 3. Efeitos do choque térmico na morfologia de embriões bovinos de duas células produzidos *in vivo* e tratados *ex vivo* para avaliação no microscópio de luz, de seções de 500nm corados com azul de toluidina (A e C), ou para microscopia eletrônica de transmissão (B e D). Embriões foram incubados por 6 horas a 38.5°C (A e B) ou 41.0°C (C e D). Setas mostram área do citoplasma desprovida de organelas. ZP, zona pelúcida; PVS, espaço perivitelino; N, núcleo; MT, mitocôndria; Ly, lisossomo.



Fonte: Rivera *et al.* (2003).

Portanto, o distúrbio do desenvolvimento provocado pela exposição de embriões bovinos a um ET relevante, envolve interações com o citoesqueleto e com a mitocôndria, sendo o distúrbio do citoesqueleto provavelmente a maior causa da inibição do desenvolvimento embrionário promovido pelo ET.

Para as fêmeas, a TE e a produção *in vitro* de embriões têm sido utilizadas na tentativa de driblar os efeitos provocados pelo ET, por meio da coleta de embriões de doadoras não estressadas e sua subsequente transferência para receptoras estressadas pelo calor. Seria de se esperar que o grau de termotolerância da receptora afete as chances de sobrevivência embrionária, porém isto ainda não foi avaliado em bovinos (BARROS *et al.*, 2006). Em ovelhas, no entanto, Alliston e Ulberg (1961) realizaram TE recíprocas entre doadoras e receptoras estressadas e demonstraram que, quando a doadora e a receptora permaneceram a 23°C, 56.5% das TE obtiveram sucesso. Quando a doadora e a receptora permaneceram a 32°C e 23°C, respectivamente, a ET obteve 9.5% de sucesso. E quando os embriões foram transferidos de doadora mantida a 23°C para receptora mantida a 32°C, 24% das transferências foram realizadas com sucesso. Neste mesmo estudo, embora diferenças morfológicas nos embriões não terem sido aparentes no momento da transferência, a morte embrionária ocorreu em um estágio mais tardio do desenvolvimento. Assim, tanto o embrião como o trato reprodutivo são comprometidos pelo ET, com grades efeitos sendo exercidos sobre o embrião.

5. FATORES QUE PODEM MINIMIZAR OS EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DURANTE AS ETAPAS DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES:

Segundo Hansen *et al.* (2001), o ET reduz a produção de embriões devido à interrupção dos aspectos fisiológicos e celulares da função reprodutiva em decorrência do aumento da temperatura corporal, ou pelas adaptações fisiológicas realizadas pela vaca para reduzir a hipertermia. Assim, algumas estratégias podem melhorar a produção de embriões durante o ET, tais como:

- Redução da magnitude do ET pela manipulação do ambiente;
- Alterando a vaca geneticamente ou fisiologicamente para melhorar a regulação da temperatura corporal na presença do ET;
- Manipulando a vaca para prevenir ou superar o distúrbio nos processos celular e fisiológico que comprometem a reprodução.

A utilização de raças bovinas geneticamente adaptadas ao ambiente local ou a alteração do ambiente para reduzir a magnitude do ET, são duas estratégias diferentes que têm sido implementadas para aumentar a produção dos bovinos em climas quentes (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999). Estudos realizados no Brasil (MADALENA *et al.*, 1990) demonstraram que o genótipo que produz grandes quantidades de leite depende do nível de manejo e da disponibilidade de alimento. Quando o nível de manejo e da alimentação foram altos, os bovinos com predomínio da genética *Bos taurus* foram favorecidos, enquanto que alguns tipos intermediários entre *Bos indicus* e *Bos taurus* foram superiores quando o nível do manejo e da alimentação foram menores.

O planejamento das instalações é um fator crucial na prevenção do estresse calórico, proporcionando aos animais máxima estacionalidade na sua zona de conforto. O resfriamento evaporativo de ambientes para gado de leite tem se expandido rapidamente em locais afetados pelo ET (ACARO JÚNIOR *et al.*, 2003). A utilização da ventilação forçada nas horas mais quentes do dia, associada a banhos de aspersão, tornam mais eficiente o resfriamento, acelerando a evaporação (SOUZA, 2003). A disponibilidade de sombra aos animais susceptíveis ao ET é um recurso de manejo de suma importância, oferecendo abrigo aos animais nos horários mais quentes do dia (BARBOSA e DAMASCENO, 2002). Além dos benefícios gerados pelo conforto térmico aos animais, a associação de árvores a pastagens proporciona maiores benefícios ao produtor, incrementando a renda da propriedade, somando a produção animal à produção de madeira ou frutas (PORFÍRIO-DA-SILVA *et al.*, 2006).

Uma vez que os embriões são mais sensíveis ao ET durante os estágios iniciais da gestação (EDWARDS e HANSEN, 1997), a redução da temperatura

corpórea dos animais em estresse calórico por um número limitado de dias, durante a máxima sensibilidade do embrião ao ET, pode aumentar as taxas de gestação (HANSEN, 1997). Por exemplo, a taxa de gestação de vacas inseminadas e que experimentaram uma redução na sua temperatura corpórea por 8 dias, começando após a administração de PGF2 α , foi 16% vs 6% para os controles (EALY *et al.*, 1994). Quando a redução da temperatura corpórea falha em aumentar a taxa de gestação, é provável que o ET já tenha comprometido a função oocitária ou folicular antes desta redução, ou mais tarde na gestação, após a diminuição da temperatura corporal ter sido realizada (HANSEN *et al.*, 2001).

Para sanar o problema da redução da ingestão de matéria seca pelas vacas durante o ET, segundo Staples (2009), é necessário resfriar fisicamente os animais e alimentá-los nas primeiras horas do dia e no final da tarde, atenuando a carga de calor sobre as vacas. Deve-se ainda oferecer aos animais uma dieta com maior densidade de nutrientes para evitar a queda na produção leite, no caso de vacas leiteiras (PIMENTEL *et al.*, 2007). Porém, as vacas se tornam mais susceptíveis à acidose ruminal e, portanto, dietas muito concentradas devem ser fornecidas com cuidado em épocas de calor. A qualidade da fibra passa a ter grande importância durante o verão pela sua capacidade de tamponamento e por estimular a produção de saliva. O fornecimento de gordura protegida na dieta é uma estratégia adicional durante o balanço energético negativo, pois resulta em incremento calórico mais baixo no rúmen, fornecendo energia sem efeito térmico adverso (BILBY *et al.*, 2009).

O estabelecimento da gestação seguida pela TE, entre outros fatores, depende de uma sincronização bem sucedida das receptoras (AMBROSE *et al.*, 1999). Como a eficiência da detecção de estro é ruim durante os meses mais quentes, a seleção das receptoras se tornou uma tarefa difícil, fazendo com que a TE seja menos praticada durante o verão (WOLFENSON *et al.*, 1988). Para aumentar a taxa de gestação do rebanho no ET, os problemas de detecção de estro e mortalidade embrionária devem ser reduzidos (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999). A sincronização das receptoras utilizando o protocolo GnRH no dia 0, PGF2 α no dia 7 de GnRH no dia 9, desenvolvido para IATF (SCHMITT *et al.*, 1996), elimina a necessidade de detecção de estro (AMBROSE *et al.*, 1999). Além disso, a utilização de GnRH com PGF2 α demonstrou ser economicamente mais vantajoso do que a

utilização de hCG com PGF2 α para a sincronização de cio e indução da ovulação de vacas leiteiras (DE RENSIS *et al.*, 2002).

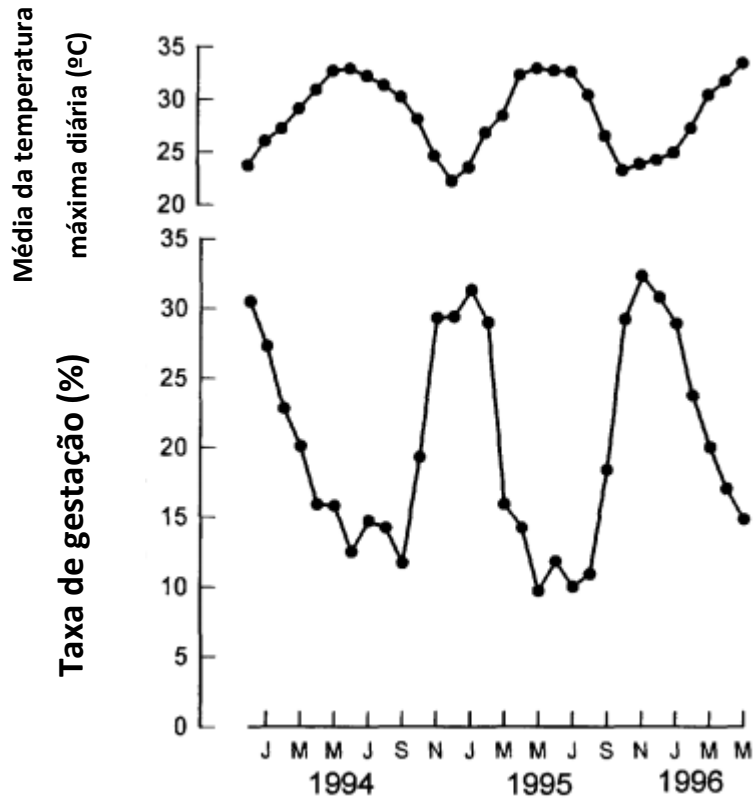
Outras alternativas para melhorar a detecção de estro são a utilização de aparelhos que auxiliam na detecção do cio, tais como o HeatWatch® e o pedômetro (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999). O sistema HeatWatch® é um transdutor de pressão radiotelemétrico colocado na cauda do animal para transmitir informações sobre o número de vezes que o animal foi montado (WALKER *et al.*, 1996). O pedômetro mensura o aumento da atividade locomotora associada ao estro (MAATJE *et al.*, 1997).

O problema da infertilidade nos machos provocado pelo ET pode ser solucionado utilizando sêmen de machos provenientes de regiões mais frias para a IA, porém nas fêmeas é mais difícil reverter esta situação (HANSEN *et al.*, 2001). Devido à atual redução na taxa de fertilidade no verão em regiões quentes, poucos animais ficarão prenhes pela IA ou pela monta natural. A maior dificuldade observada na monta natural é a redução da fertilidade do touro pelo ET. De fato, a IA com sêmen descongelado representa o melhor método para ultrapassar os efeitos do ET sobre a fertilidade do macho (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999).

A coleta de embriões de doadoras não estressadas e sua posterior transferência para receptoras estressadas também pode ser uma alternativa para driblar os efeitos provocados pelo ET na produção de embriões (BARROS *et al.*, 2006). Além disso, altas taxas de prenhez podem ser obtidas com a TE sendo realizada durante os estágios finais do desenvolvimento embrionário (RUTLEDGE, 2001). Tem sido demonstrado também, que as taxas de gestação no verão podem ser significativamente aumentadas pela TE de embriões descongelados produzidos *in vivo* (AMBROSE *et al.*, 1999).

As modificações no ambiente dos animais com a finalidade de diminuir os efeitos do ET podem, até certo ponto, reduzir o seu efeito negativo na produção de leite e no desempenho reprodutivo em vacas leiteiras. Porém, como demonstrado na figura 4, elas não eliminam os problemas do ET, sendo ainda observado um declínio na taxa de gestação de vacas leiteiras inseminadas durante o verão no sul da Flórida (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999).

Figura 4. Variação sazonal na taxa de gestação (porcentagem de inseminações nas quais a gestação foi estabelecida) em um rebanho leiteiro comercial do sul da Flórida, onde as vacas foram mantidas em instalações com sombra, ventiladores e aspersores.



Fonte: Hansen e Aréchiga (1999)

6. CONCLUSÃO

Países localizados em regiões climáticas caracterizadas por elevadas temperaturas, tais como o Brasil, devem se precaver quanto aos efeitos provocados pelo ET durante as etapas da produção embrionária pela TE. Mudanças nas instalações tais como a utilização de aspersores e ventiladores, com o objetivo de reduzir a temperatura corporal dos animais, podem amenizar os efeitos do ET durante os meses mais quentes do ano. Porém, muitas vezes estes equipamentos são caros, aumentando consideravelmente o custo da produção. Além disso, quando são a única fonte para amenizar os efeitos adversos das altas temperaturas,

podem não auxiliar na melhora do desempenho reprodutivo do rebanho. Portanto, a utilização conjunta de várias estratégias que minimizam os efeitos do ET durante a TE, tais como a sincronização do cio, IA com sêmen de touros não estressados ou coletados em épocas mais frias do ano, introdução de raças mais termotolerantes ao rebanho, disponibilização de áreas de sombra no pasto, coleta de embriões de doadoras não estressadas, torna-se mais provável ultrapassar os efeitos deletérios do ET, podendo melhorar a recuperação embrionária e os índices reprodutivos.

Assim, devemos nos ater às condições brasileiras, onde o clima com elevada temperatura é o predominante, e o sistema de criação de bovinos prevalente é o extensivo com animais sendo mantidos a pasto, e muitas vezes sem suplementação alimentar durante as épocas de seca. Desta forma, para amenizar os problemas provocados pelo ET durante as etapas de TE no Brasil, seria interessante a incorporação de genes zebuínos no rebanho. Os animais zebuínos, além de serem mais termotolerantes, apresentam maior resistência a infecções por endo e ectoparasitas e melhor desempenho produtivo quando criados em sistemas pouco tecnificados, como é o caso da maioria dos criadores de gado do nosso país. Mas, para se conseguir melhores resultados, é necessário também que sejam fornecidas condições de manejo em que os animais, mesmo sendo de origem zebuína, possam desempenhar suas funções fisiológicas e reprodutivas dentro de sua zona de conforto térmico, reduzindo as chances do ET interferir nas etapas da TE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABADIA, M. E. N. C. **Transferência de embriões em bovinos: revisão de literatura.** Trabalho monográfico para o curso de pós-graduação “Lato Sensu” em produção e reprodução em bovinos, Universidade Castelo Branco, Goiânia, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE ZEBU (ABCZ). Disponível em: <<http://www.abcz.org.br/>>. Acesso em: 26/04/2011.

ABILAY, T. A.; JOHNSON, H. D.; MADAN, M. Influence of environmental heat on peripheral plasma progesterone and cortisol during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v.58, p.1836-1840, 1975.

ACARO JÚNIOR, I. **Avaliação da influência de ventilação e aspersão em coberturas de sombrite para vacas em lactação.** Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2000.

AHMAD, N.; SCHRICK, F. N.; BUTCHER, R. L.; INSKEEP, E. K.; Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1129-1135, 1995.

ALFURAIJI, M. M.; NOUTY, EL- NOUTY, F. D.; ALIBRAHIM, L. M. Seasonal variations in superovulatory responses of Holstein cows treated with pregnant mare serum gonadotrophin under semi-arid environment. **Journal of Arid Environments**, v.34, p.371-378, 1996.

ALLISTON, C. W.; ULBERG, L. C. Early pregnancy loss in sheep at ambient temperatures of 70 and 90°F as determined by embryo transfer. **Journal of Animal Science**, v.20, p.608-613, 1961.

AMBROSE, J. D.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; THATCHER, M. J.; KASSA, T.; BINELLI, M.; HANSEN, P. J.; CHENOWETH, P. J.; THATCHER, W. W. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2369-2376, 1999.

ANDRADE, J. C. O.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. Use steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã, v.69, n.1-2, p.9-14, 2002.

AZEVEDO, M.; 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 $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ e $\frac{7}{8}$ Holandês-Zebu em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, 2005.

BADINGA, L.; COLLIER, R. J.; THATCHER, W. W., WILCOX, C. J. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environments. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.78-85, 1985.

BAÊTA, F. C.; SOUZA, C. F.; **Ambiência em edificações rurais – conforto animal**. Ed. UFV, p.246, Viçosa, 1997.

BARATI, F.; NIASARI-NASLAJI, A.; BOLOURCHI, M.; SARHADDI, F.; RAZAVI, K.; NAGHZALI, E.; THATCHER, W. W. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. **Theriogenology**, v.66, p.1149-1155, 2006.

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

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1483-1496, 2001.

BARROS, C. M.; MONTEIRO, F. M.; MELLO, D. S.; CARVALHO, L. M.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A.; FREITAS, E. C. **Resistance of *Bos indicus* to heat shock, compared to crossbred or *Bos taurus*, at early stages of in vitro embryo development**. International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants. ed.6, Escócia, p.A4, 2002.

BARROS, C. M.; PEGORER, M. F.; VASCONCELOS, J. L.; EBERHARDT, B. G.; MONTEIRO, F. M. Importance of sperm genotype (*indicus versus taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. **Theriogenology**, v.65, p.210-218, 2006.

BILBY, T. R.; TATCHER, W. W.; HANSEN, P. J. Estratégias farmacológicas, nutricionais e de manejo para aumentar a fertilidade de vacas leiteiras sob estresse térmico. In: **XIII Curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos**. Uberlândia, MG, p.59-71, 2009.

BLOCK, J.; CHASE, C. C.; HANSEN, P. J.; Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to the heat shock: relative importance of the maternal vs. paternal contribution. **Molecular Reproduction and Development**, v.63, p.32-37, 2002.

BRACKETT, B. G. Reprodução em mamíferos do sexo masculino. In: DUKES. **Fisiologia dos animais domésticos**. Ed. Guanabara Koogan, ed.12, Rio de Janeiro, capítulo 38, p.625, 2006.

BRITO, L. F.; SILVA, A. E.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred, and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v.61, p.511-528, 2004.

BUTLER, W. R. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. In: **Fertility in the high-producing dairy cow**, ed. Diskin MG, v.26, p.133-145, 2001.

CAMPOS, C. K.; PIACENTI, C. A.. **Agronegócio do leite: Cenário atual e perspectivas**. XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, 2007.

CAVESTANY, D.; EL-WHISHY, A. B.; FOOT, R. H.; Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.1471-1478, 1985.

CHEBEL, R. C.; DEMÉTRIO, D. G. B.; METZGER, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. **Theriogenology**, v.69, p.98-106, 2008.

CRUZ, L. V.; ANGRIMANI, D. S. R.; RUI, B. R.; SILVA, M. A. Efeitos do estresse térmico na produção leiteira: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX, n.16, 2011.

DE RENSIS, F.; MARCONI, P.; CAPELLI, T.; GATTI, F.; FACCIOLONGO, F.; FRANZINI, S.; SCARAMUZZI, R. J. Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrus synchronization and fixed time AI after the induction of an LH surge with GnRH or hCG. **Theriogenology**, v.58, p.1675-1687, 2002.

DUNCAN, R. F.; HERSHEY, J. W. B. Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. **The Journal of Cell Biology**, v.109, p.1467-1481, 1989.

EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2899-2905, 1993.

EALY, A. D.; ARÉCHIGA, C. F.; BRAY, D. R.; RISCO, C. A.; HANSEN, P. J. Effectiveness of short-term cooling and vitamin E for alleviation of infertility induced by heat stress in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.3601-3607, 1994.

EBERHARDT, B. G.; SATRAPA, R. A.; CAPINZAIKI, C. R. L.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.54-61, 2009.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p. 138-145, 1997.

ELVINGER, F.; NATZKE, R. P.; HANSEN, P. J. Interactions of heat stress and bovine somatotropin affecting physiology and immunology of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.449-462, 1992.

FERNANDES, C. E.; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v.70, p.1560-1568, 2008.

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, D. P. Production systems – An example from Brazil. **Meat Science**, v.84, p.238-243, 2010.

FERRO, F. R. A.; NETO, C. C. C.; FILHO, M. R. T.; FERRI, S. T. S.; MONTALDO, Y. C. Efeito do estresse calórico no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. **Revista verde**, v.5, p.01-25, Mossoró, RN, 2010.

FIGUEIRA, E. L. M.; RIGOLON, L. P.; PRADO, I. N.; CAVALIERI, F. L. B.; SCOMPARIN, V. X.; NASCIMENTO, W. G.; JUNIOR, I. C. C. Efeito da condição corporal sobre as alterações metabólicas, hormonais, produção e viabilidade de embriões em vacas nelore recebendo flushing nutricional. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.27, p.11-16, Maringá, 2005.

GANGWAR, P. C.; BRANTON, C.; EVAS, D. L. Reproductive and physiological response of Holstein heifers to controlled and natural climatic conditions. **Journal of Dairy Science**, v.48, p.222-227, 1965.

GILAD, E.; MEIDAN, R.; BERMAN, A.; GRABER, Y.; WOLFENSON, D.; Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.99, p.315-321, 1993.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, cap.14, p.261-290, 2002.

GUZELOGLU, A.; AMBROSE, J. D.; KASSA, T.; DIAZ, T.; THATCHER, M. J.; THATCHER, W. W. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.15-34, 2001.

GWAZDAUSKAS, F. C.; THATCHER, W. W.; KIDDY, C. A.; PAPE, M. J.; WILCOX, C. J. Hormonal pattern during heat stress following PGF₂ α -tham salt induced luteal regression in heifers. **Theriogenology**, v.16, p.271-285, 1981.

HANSEN, P. J. Effects of environment on bovine reproduction. In: YOUNGQUIST, R. S. **Current therapy in large animal theriogenology**, ed. W. B. Saunders, p. 403, Filadélfia, 1997.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 349-60, 2004.

HANSEN, P. J. To be or not be – Determinants of embryonic survival following heat shock. **Theriogenology**, v.68, p.40-48, 2007.

HANSEN, P. J. Effects of Heat Stress on Mammalian Reproduction. **Philosophical Transactions of Royal Society B: Biological Sciences**, v.364, p.3341-3350, 2009.

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

HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, III C. E.; CHASE, J. R. C. C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v.55, p.91-103, 2001.

HEIN, K. G.; ALLRICH, R. D. Influence of exogenous adrenocorticotrophic hormone on estrous behavior in cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p.243-247, 1992.

HELDMAIER, K. E. M.; ORTMANN, S. E. ELVERT, R. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v.141, p.317-329, 2004.

JOHNSTON, J. E.; NAELAPAA, H.; FRYE JR. J. B. Physiological responses of Holstein, Brown Swiss and Red Sindhi Crossbred Bulls Exposed to High Temperatures and Humidities. **Journal of Animal Science**, v.22, p.432-436, 1963.

KHATIB, H.; MALTECCA, C.; MONSON, R. L.; SCHUTZKUS, V.; WANG, X.; RUTLEDGE, J. J. The fibroblast growth factor 2 gene is associated with embryonic mortality in cattle. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2063-2067, 2008.

KRININGER, C. E.; STEPHENS, S. H.; HANSEN, P. J. Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of pre-implantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.63, p.335-340, 2002.

LOVEN, D. P. A role for reduced oxygen species in heat induced cell killing and induction of thermotolerance. **Medical Hypotheses**, v. 26, p.39-50, 1988.

MAATJE, K.; LOEFFLER, S. H.; ENGEL, B. Optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1098-1105, 1997.

MADALENA, F. E.; LEMOS, A. M.; TEODORO, R. L.; BARBOSA, R. T.; MONTEIRO, J. B. N. Dairy production and reproduction in Holstein-Friesian and Guzera crosses. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.1872-1886, 1990.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; ROBINSON, R. S.; WATHES, D. C. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.54, p.317-328, 1999.

MARTINEZ, I. N.; SOUZA, L. C. **Transferência de embrião e fertilização “in vitro” (FIV) em bovinos**. Trabalho monográfico de conclusão de curso, Universidade Castelo Branco, Centro de Ciências Agrárias, Rio de Janeiro, 2007.

MONTY, D. E.; RACOWSKY, C. In vitro evaluation of embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. **Theriogenology**, v.28, p.451-465, 1987.

MORAES, J. C. F.; JAUME, C. M.; SOUZA, C. J. F. **Controle da reprodução em bovinos de corte**. Comunicado técnico 58, Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, 2005.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D.; FREITAS, V. J. F.; JÚNIOR, E. S. L. Controle do estro e da ovulação em ruminantes. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução Animal**. Ed.2, capítulo 3, p. 41, 2002.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised in under tropical conditions. **Theriogenology**, v.66, p.822-828, 2006.

NILES, D.; RISCO, C. A. Seasonal evaluation of artificial insemination and natural service pregnancy rates in dairy herds. Compêndio, **Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.24, p.44-48, 2002.

NOVER, L.; SCHARF, K. D. Heat shock proteins. In: NOVER, L. **Heat shock response**. Ed. CRC Press, Boca Raton, p.41-128, 1991.

OTT, R. S. Breeding soundness examination in bulls. In: MORROW, D. A. **Current therapy of therionenology**, ed.2^a, ed. W. B. Saunders Co., Filadélfia, 1986.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE JR, C. C.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER III, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSON, T. A.; HANSEN, P. J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v.125, p.285-294, 2003.

PEGORER, M. F.; VASCONCELOS, J. L. M.; TRINCA, L. A.; HANSEN, P. J.; BARROS, C. M. Influence of sire and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactating Holstein cows during summer heat stress. **Theriogenology**, v.67, p. 692-697, 2007.

PERALTA, O. A.; PEARSON, R. E.; NEBEL, R. L. Comparison of three estrus detection systems during summer in a large commercial dairy herd. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.59-72, 2005.

PIMENTEL, P. G.; MOURA, A. A. A. N.; NEIVA, J. N. M.; ARAÚJO, A. A.; TAIR, R. F. L. Consumo, produção de leite e estresse térmico em vacas da raça Pardo-Suíça alimentadas com castanha de caju. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1523-1530, 2007.

PIRES, M. F. A. **Manejo nutricional para evitar o estresse calórico**. Comunicado técnico 52, Embrapa, Juiz de Fora, Minas Gerais, p.1-4, 2006.

PIRES, M. F. A.; CAMPOS, A. T. **Modificações ambientais para reduzir o estresse calórico em gado de leite**. Comunicado técnico 42, EMBRAPA, Juiz de Fora, Minas Gerais, p.1-6, 2004.

PORFÍRIO-DA-SILVA, V. **Arborização de pastagens: procedimentos para introdução de árvores em pastagens convencionais**. Comunicado técnico 155, Embrapa, Colombo, Paraná, p.1-8, 2006.

PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenology**, v.31, p.765-778, 1989.

RAY, D. E.; HALBACH, T. J.; ARMSTRONG, D. V. Season and lactation number effects on milk production and reproduction in dairy cattle in Arizona. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2976-2983, 1992.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; ANDRADE, J. C. O.; FILHO, F. T.; SANTOS, M. H. B.; FILHO, B. D. O.; MEIRINHOS, M. L. G.; FILHO, A. S. S. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, cap.12, p.206,218, 2002.

RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow – a review. **Theriogenology**, v.60, p.1139-1151, 2003.

RHYNES, W. E.; EWING, L. L. Testicular endocrine function in Hereford bulls exposed to high ambient temperature. **Endocrinology**, v.92, p.509-515, 1973.

RIGOLON, L. P.; PRADO, I. N.; CAVALIERI, F. L. B.; NASCIMENTO, W. G.; BETINI, C. M.; CANALLI, I. C. **Efeito do nível de ingestão de energia na dieta na produção de embriões em novilhas de corte: resultados preliminares**. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS – Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões. v.28, n.1, p.321, 2000.

RISCO, C. A. Management and economic of natural service sires on dairy herds. In: CHENOWETH, P. J. **Topics in bull fertility**. ed. Internal veterinary information service, Ithaca, Nova Iorque, 2000.

RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v.121, p.107-115, 2001.

RIVERA, R. M.; KAREN, L. K.; GREGORY, W. E.; HANSEN, P. J. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically relevant heat shock. **Biology of Reproduction**, v.69, p.2068-2077, 2003.

ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEL, J. D.; 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.

RODRIGUES, E. Fisiologia da homeotermia. In: **Conforto térmico das construções**, 2006. Disponível em: <http://www.ufrjrj.br/institutos/it/dau/profs/eduardo/Cap%EDtulo3-Homeotermia.pdf> Acesso em: 03/06/2011.

ROMAN-PONCE, H.; THATCHER, W. W.; CANTON, D.; BARRON, D. H.; WILCOX, C. J. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.46, p.175-180, 1978.

ROMAN-PONCE, H.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Hormonal interrelationships and physiological responses of lactating dairy cows to a shade management system in a subtropical environment. **Theriogenology**, v.16, p.139-154, 1981.

RONCHI, B.; STRADAIOLI, G.; VERINI SUPPLIZI, A.; BERNABUCI, U.; LACETERA, N.; ACCORSI, P. A., et al. Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17 β , LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. **Livestock Production Science**, v.68, p.231-241, 2001.

ROSENBERG, M.; FOLMAN, Y.; HERZ, Z.; FLAMENBAUM, I.; BERMAN, A.; KAIM, M. Effect of climatic conditions on peripheral concentrations of LH, progesterone, oestradiol-17 β in high milk-yielding cows. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.66, p.139-146, 1982.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; TAL-BRAW, 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 & Fertility**, v.120, p.83-90, 2000.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; BRAW-TAL, R., WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **Reproduction**, v.121, p.745-751, 2001.

RUTLEDGE, J. J. Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. **Theriogenology**, v.55, p.105-111, 2001.

SATRAPA, R. A. **Influência dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e II), seus receptores (IGFR-I e II), proteínas ligantes (IGFBP-2 e 4) e PAPP-A na aquisição de tolerância ao estresse térmico calórico de embriões bovinos (Nelore vs Holandês) produzidos *in vitro***. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2011.

SCHMITT, E. J. P.; DIAZ, T.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1084-1091, 1996.

SETCHELL, B. P.; Heat and the testis. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.114, p.179-194, 1998.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle. **Journal of Applied Physiology**, v.21, p.1784-1790, 1966.

SILVA, R. G. **Introdução à bioclimatologia animal**. Ed.1, São Paulo, p.286, 2000.

SMITH, L. C.; ALCIVAR, A. A. Cytoplasmic inheritance and its effects on development and performance. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.48, p.1244-1250, 1993.

SMITH, J. W.; ELY, L. O.; GILSON, W. D.; GRAVES, W. M. Effects of artificial insemination vs. natural service breeding on production and reproduction parameters in dairy herd. **The Professional Animal Science**, v.20, p.185-190, 2004.

SOUZA, S. R. L. **Análise do ambiente físico de vacas leiteiras alojadas em sistema free stall**. Dissertação (Mestrado em engenharia agrícola), Universidade Federal de Campinas, Campinas, São Paulo, 2003.

STAPLES, C. R. Alimentação de vacas leiteiras sob estresse térmico. In: **XIII Curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos**. Uberlândia, MG, p.42-48, 2009.

THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J. Environment and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, Amesterdã, ed. Elsevier World Animals Science Series, v.9, p.433-457, 1993.

THIBIER, M. Transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. In: **International Embryo Transfer Society Newsletter**, 2006.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PIRES, M. F. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FOLHADELLA, I. M.; POLISSENI, C. F.; CLEMENTE, C. A. A.; SÁ FILHO, M. F.; PAULA-LOPES, F. F.; BARUSELLI, P. S. Effect of materna heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.69, p.155-166, 2008.

TROUT, J. P.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Characteristics of the oestrus cycle and antioxidant status of lactating Holstein cows exposed to stress. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1244-1250, 1998.

WALKER, W. L.; NEBEL, R. L.; MCGILLIARD, M. L. Time of ovulation relative of mounting activity in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1555-1561, 1996.

WILSON, S. J.; MARION, R. S.; SPAIN, J. N.; SPIERS, D. E.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Effect of controlled heat stress on ovarian function in dairy cattle: I. Lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.1, p.2124-2131, 1998.

WOLFENSON, D.; FLAMENBAUM, I.; BERMAN, A. Hypertermia and body energy store effects of estrous behavior, conception rate and corpus luteum function in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.3497-3504, 1988.

WOLFENSON, D.; LEW, B. J.; THATCHER, W. W.; GRABER, Y.; MEIDAN, R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cow. **Animal Reproduction Science**, v.77, p.9-19, 1997.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.535-547, 2000.