

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

João Felipe Ferreira Lobo

A variação climática afeta a produção *in vitro* de embriões bovinos (*Bos taurus*) na região de Uberlândia, MG, Brasil?

UBERLÂNDIA - MG

2023

João Felipe Ferreira Lobo

A variação climática afeta a produção *in vitro* de embriões bovinos (*Bos taurus*) na região de Uberlândia, MG, Brasil?

Monografia apresentado à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Uberlândia para o
Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA - MG

2023

João Felipe Ferreira Lobo

A variação climática afeta a produção *in vitro* de embriões bovinos (*Bos taurus*) na região de Uberlândia, MG, Brasil?

Monografia apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária. Uberlândia, de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Prof. Dra. Renata Lançoni

Prof. Dra. Ricarda Maria dos Santos

AGRADECIMENTOS

Com imensa gratidão e honra, meu primeiro agradecimento é para o Pai Celestial. O grandioso Deus, que tem me proporcionado a devida força e saúde para continuar seguindo o caminho que Ele me direciona diariamente.

Um agradecimento mais que especial para o meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, que como já bem digo para todos, é um pai que tenho dentro da Universidade, que cumpriu seu papel de professor e orientador com excelência, demonstrando muito amor, profissionalismo, acessibilidade e respeito por todos. Além disso, pela nossa fraterna amizade construída durante os dias da graduação.

Um agradecimento especial para a Prof. Dr. Ricarda Maria, por todo cuidado e dedicação em nos tornar pessoas e profissionais melhores. Além de ser uma excelente profissional, se tornou uma grande conselheira e amiga. Tendo um papel crucial na minha formação, nos preparando para todas as situações cotidianas no mercado de trabalho, entre tantos outros ensinamentos. Costumo dizer que tenho pais na Universidade, com muito carinho a considero minha mãe na graduação.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Biologia da Reprodução, que me proporcionaram muito conhecimento e experiências. Sempre com muita paciência, amor e dedicação em todas as atividades realizadas. A área que decidi trilhar e que sou apaixonado, foi fomentada pela sintonia e influência dos grandes amigos conhecidos no laboratório.

Agradeço a todos os coordenadores dos projetos e grupos de estudo que estive envolvido, como: CONAVET, GEBRA, GEEq, UFU-Corte etc. Em especial para o Prof. Dr. Adriano Pirtouscheg e Prof. Dra Águida Garret, que nos deram total apoio na ideia da fundação de um Grupo de estudos relacionado a Gestão Rural e Análise de Mercado na Pecuária (GERAPEC).

Agradeço a toda comunidade FAMEV-UFU, todos colegas e amigos que trilharam o caminho da graduação juntos.

Em último agradecimento, agradeço a minha família, que me proporcionaram todo o incentivo necessário para que eu me tornasse tudo que sou hoje.

RESUMO

A PIVE (produção *in vitro* de embriões), é uma biotécnica reprodutiva que proporciona um alto ganho genético com multiplicação de características de um produto que seria gerado a partir de apenas uma gestação. Existem vários fatores que podem influenciar a eficiência da PIVE, entre eles, os ambientais e climáticos. O clima pode afetar a qualidade dos oócitos, do sêmen e as etapas laboratoriais da PIVE. Com o presente trabalho, objetivou-se identificar como a variação climática influencia a produção *in vitro* de embriões bovinos (*Bos taurus*) na região de Uberlândia, MG, Brasil, minimizando-se os efeitos oriundos do touro. Para tal foi realizado o teste de correlação de Spearman entre os fatores climáticos (precipitação total, umidade relativa do ar, temperatura do ar, pressão atmosférica e radiação global no dia e durante os 31 dias anteriores à coleta dos oócitos) e os resultados de rotinas de PIVEs (taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de blastocistos) realizadas nos anos de 2019, 2020, 2021 e 2022 em um laboratório de Uberlândia. Todas as rotinas de PIVE foram realizadas com partidas (ejaculados) de sêmen congelado de um mesmo touro, coletadas em um mesmo mês. Os resultados da análise, utilizando-se os dados dos 31 dias anteriores a coleta dos oócitos apresentaram uma correlação positiva significativa com a umidade relativa do ar em relação à taxa de blastocisto e ao desenvolvimento embrionário. Também foi observada uma tendência de correlação positiva na precipitação no dia da coleta dos oócitos com o desenvolvimento embrionário. Esses resultados podem ser justificados porque quando a umidade relativa está muito baixa pode haver estresse, pois os processos de evaporação ocorrem mais rapidamente, o que pode resultar em irritação na pele e desidratação. Já no período chuvoso, quando a umidade do ar é mais elevada na região de Uberlândia, as temperaturas não são tão elevadas, pois são amenizadas pelo clima nublado. Conclui-se que na região de Uberlândia, os fatores climáticos pouco influenciam os resultados da produção *in vitro* de embriões, quando minimizado o efeito touro. No entanto, a coleta de oócitos em períodos com níveis mais elevados de umidade do ar e precipitação de chuva pode beneficiar a eficiência de PIVEs

Palavras-chave: FIV, PIVE, clima, fotoperíodo, umidade, oócitos

ABSTRACT

IVEP (*in vitro* embryo production) is a reproductive biotechnology that provides a high genetic gain by multiplying characteristics of a product that would be generated from just one gestation. There are several factors that can influence the efficiency of IVEP, including environmental and climatic factors. Climate can affect the quality of oocytes, semen, and the laboratory stages of IVEP. With the present study, the aim was to identify how climatic variation influences the *in vitro* production of bovine embryos (*Bos taurus*) in the region of Uberlândia, MG, Brazil, minimizing the effects from the bull. For this purpose, the Spearman correlation test was conducted between climatic factors (total precipitation, relative air humidity, air temperature, atmospheric pressure, and global radiation on the day and during the 31 days prior to oocyte collection) and the results of IVEP routines (cleavage rates, embryonic development, and blastocyst rates) performed in the years 2019, 2020, 2021, and 2022 in a laboratory in Uberlândia. All IVEP routines were performed with ejaculate from the same bull, collected in the same month. The results of the analysis using data from the 31 days prior to oocyte collection showed a significant positive correlation with relative air humidity regarding blastocyst rate and embryonic development. There was also a trend of positive correlation with precipitation on the day of oocyte collection and embryonic development. These results can be justified because when relative humidity is very low, there may be stress due to faster evaporation processes, which can result in skin irritation and dehydration. In the rainy season, when air humidity is higher in the Uberlândia region, temperatures are not as high because they are mitigated by cloudy weather. It is concluded that in the Uberlândia region, climatic factors have little influence on the results of *in vitro* embryo production when minimizing the bull effect. However, oocyte collection during periods with higher levels of air humidity and rainfall can benefit IVEP efficiency.

Keywords: IVF, IVEP, climate, photoperiod, humidity, oocytes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 Ovogênese.....	10
2.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	10
2.3. Fatores que influenciam a produção <i>in vitro</i> de embriões.....	11
2.4. Influência das estações do ano na qualidade de oócitos.....	12
3. OBJETIVO.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Dados das PIVEs.....	13
4.1.1. Obtenção e seleção de oócitos.....	13
4.1.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	14
4.1.3. Seleção espermática.....	14
4.1.4. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	14
4.1.5. Cultivo <i>in vitro</i>	15
4.2. Dados meteorológicos.....	15
4.3. Avaliação estatística.....	17
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSSÃO.....	20
7. CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, em 2022, todo o ramo pecuário (incluindo criação, indústria, serviços e insumos) foi responsável por 6,93% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, segundo dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), da Esalq/USP, com enorme potencial de crescimento, uma vez que as biotecnologias que exigem mais tecnologias e operações relacionadas à produção e reprodução, possuem custos iniciais maiores na implantação, dificultando economicamente sua aplicação para parte de produtores rurais.

Algumas biotécnicas aplicadas à reprodução de bovinos, foram criadas com o intuito de potencializar e acelerar resultados relacionados ao ganho de valor genético, pois permite o uso de oócitos de fêmeas saudáveis com alto valor genético para produção *in vitro* de embrião para serem transferidos para receptoras com valor genético inferior (Mello *et al.*, 2016), permitindo que uma vaca com parâmetros genéticos excepcionais, limitada a um parto por ano, possa gerar mais de uma centena de descendentes.

O Brasil, foi considerado o 2º maior produtor de embriões em 2022 e referência comercial na área (Viana, 2022). A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), foi iniciada na década de 90 (Vizoná *et al.*, 2020). A PIVE em bovinos ganha destaque nas pesquisas em biotecnologia da reprodução buscando potencializar a produção de carne e leite, setor que apresenta grande importância socioeconômica no Brasil (Beletti, 2013). Tal biotécnica se baseia na utilização de uma doadora dos gametas femininos, sêmen do reprodutor com os gametas masculinos e uma receptora dos embriões. A produção *in vitro* de embriões tem como principais fases a coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) e transferência de embriões (TE) produzidos *in vitro* (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A produção de embriões, requer cuidados e conhecimentos para que se chegue a bons resultados. O sucesso da PIVE depende diretamente da qualidade dos oócitos (Swain; Pool, 2008), dos espermatozoides utilizados na fertilização (Hansen, 2006) e das condições de cultivo *in vitro* (controle do pH,

osmolaridade, temperatura e tensão de CO₂) (Lonergan; Fair, 2008). Mesmo com o grande número de pesquisas e o avanço nas metodologias, a produção de blastocisto na primeira década do século 21, apresentava um índice de sucesso baixo (30-45%) e o sucesso de implantação de embriões transplantados também baixo (40-60% dos blastocistos transferidos) (Kane, 2003; Rubin, 2006). Zanin (2013), trabalhando com diferentes raças e mais de 3500 oócitos viáveis obteve taxa de blastocistos de 26,9% e sucesso de implantação de embriões transplantados de 28,9%. Isso demonstra a dificuldade de obtenção de bons resultados na utilização desta biotecnologia.

Quando levamos em consideração a grande extensão do Brasil, há diferentes climas e as estações não são bem definidas, pois a localização geográfica está situada, em sua totalidade, a oeste do meridiano de Greenwich; a linha do equador passa no extremo norte do Brasil, sendo 7% no hemisfério setentrional e 93% hemisfério meridional. Cortado ao sul pelo trópico de Capricórnio, apresenta 92% do território na zona intertropical; os 8% restantes estão na zona temperada do Sul (Francisco, 2022). Dessa forma, caracteriza-se em grande parte do Brasil, estação “chuvosa” e “seca”, variando em cada região. Essas características interferem na temperatura e umidade ambiente, fotoperíodo, qualidade e disponibilidade de pasto, entre outras variáveis.

Todas estas variáveis podem interferir na qualidade dos oócitos produzidos, o que pode influenciar a reprodução a campo e principalmente, a PIVE (Rivera et al., 2000; Maya-Soriano *et al.* 2013; Rensis *et al.* 2017; Báez *et al.*, 2022). Além da qualidade dos oócitos o clima pode influenciar diretamente à diversas etapas da PIVE (Lonergan; Fair, 2008).

Portanto, conhecer como as características climáticas e ambientais influenciam às PIVEs realizadas na região do Triângulo Mineiro é importante para conceber possíveis ações que poderiam minimizar os efeitos ambientais negativos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovogênese

A ovogênese é o processo de desenvolvimento das células germinativas primordiais (CGPs) até o estágio de oócito haploide fecundado (Rüsse, 1983). Este processo inicia-se no desenvolvimento embrionário da fêmea, quando as CGPs migram do saco vitelínico para a crista gonadal I (Peters, 1970) pela influência de fatores como o fator transformador de crescimento β (TGF β) e proteínas morfogenéticas ósseas (Ying *et al.*, 2001; Sánchez; Smitz, 2012). Após chegarem às cristas gonadais, as CGPs passam por várias divisões celulares, dando origem a duas linhagens celulares: uma que se torna ovogônia (Gordon, 1994) e outra que continua em interfase, periodicamente se dividindo para formar novas CGPs (Hirshfield, 1991).

As ovogônias são chamadas de oócitos primários quando realizam a primeira divisão meiótica e interrompem o processo no estágio de diplóteno na prófase I, onde os cromossomos se encontram descompactados e localizados na vesícula germinativa (VG) (Picton *et al.*, 1998; Smitz; Cortvrindt, 2002). Essas células permanecem em diplóteno até que a fêmea alcance a puberdade e, sob a influência do hormônio luteinizante (LH), o oócito retoma a meiose (Betteridge *et al.*, 1989; Figueiredo *et al.*, 2008).

Na puberdade, o pico pré-ovulatório de LH leva ao rompimento da VG e à continuação da meiose, progredindo para a metáfase I e telófase I, resultando na extrusão do primeiro corpúsculo polar e na formação do oócito secundário (Betteridge *et al.*, 1989). Nesse estágio, há uma segunda interrupção na meiose. Quando o oócito é fertilizado por um espermatozoide, ele completa a segunda divisão meiótica, resultando na liberação do segundo corpúsculo polar (Moore; Persaud, 1994).

2.2. Produção *in vitro* de embriões bovinos

A PIVE, é uma biotecnologia da reprodução que promove alto ganho genético em curto espaço de tempo. Caracteriza-se pela obtenção (*in vivo* ou *post-mortem*) e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos de doadoras; após a preparação dos mesmos segue a fertilização *in vitro* (FIV) dos oócitos maturados

e cultura (CIV) de embriões, que dessa forma podem ir para transferência a fresco ou criopreservação. Esse processo, mesmo com muitos estudos recentes, envolve fatores desconhecidos, o que reflete no potencial e eficiência dessa biotecnologia (Costa *et al.*, 2021). Desta maneira, existe um grande potencial de crescimento, levando em consideração que ainda há margem para crescimento. Na pecuária, tais biotecnologias reprodutivas são essenciais para aumentar e potencializar o melhoramento genético do rebanho, ligados intrinsecamente à eficiência produtiva e reprodutiva.

2.3. Influência da temperatura na produção *in vitro* de embriões

Durante o desenvolvimento, o embrião é de certa forma suscetível ao estresse por calor principalmente durante o período pré-implantação (Garcia *et al.*, 2006; Biggers *et al.*, 1987). Estudos mostram que o calor pode influenciar em oócitos de vacas que foram submetidas a fertilização *in vitro*, que foram menos capazes de suportar o desenvolvimento para o estágio de blastocisto quando coletados durante os períodos quentes do ano em comparação com os períodos frios (Gendelman, 2010). Aliado a isso, estudos mostraram que o principal efeito do estresse por calor que irá comprometer esses embriões, sobre o seu crescimento, ocorreu antes do 17º dia após ocorrer a fecundação, é nesse período em que a produção de interferon-tau é essencial para a inibição da secreção de PGF2, que causaria a prevenção de uma possível luteólise (Robinson *et al.*, 2008), dessa forma ocorrendo a manutenção da gestação.

Além dos fatores ambientais que influenciam a fisiologia dos animais doadores de gametas, também existem importantes fatores laboratoriais que podem comprometer as etapas *in vitro* da produção de embriões. Tais fatores também podem ser influenciados pelo ambiente, pois apesar de em boa parte da PIVE os gametas e embriões estarem em incubadoras com concentração de CO₂, temperatura e umidade controlados, existem momentos em que as atividades são realizadas em capela de fluxo laminar, cujo ambiente (CO₂, temperatura e umidade) não é controlado (Lonergan; Fair, 2008). Portanto, o clima também pode influenciar as etapas laboratoriais da PIVE.

2.4. Influência das estações do ano na qualidade de oócitos

Ao se observar as variedades de temperatura no decorrer dos meses do ano, onde no outono e inverno predomina temperatura mais frias, umidade baixa e dias mais curtos; no verão e primavera temperaturas mais quentes, umidade mais alta e dias mais longos, percebemos a importância de entender os fatores que influenciam na qualidade dos oócitos, uma vez que esses serão os carreadores do genoma da fêmea, em forma dos gametas femininos. De acordo com alguns autores a fertilidade diminuída relacionada ao estresse por calor no verão é um problema de variadas causas; a hipertermia, por exemplo, pode afetar a função celular em vários tecidos do aparelho reprodutor feminino (Wolfenson *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2001).

Ao ser comparado a qualidade de oócitos bovinos durante a estação quente versus a estação fria do ano, foi-se notado um declínio acentuado nessa qualidade ovocitária (Rocha *et al.*, 1998). Alguns estudos demonstram que as concentrações de esteróides plasmáticos foram reduzidas durante o estresse por temperaturas mais altas em vacas em lactação e novilhas com aptidão leiteira (Wilson *et al.*, 1998). Há relatos que demonstram que estresses relacionados ao calor, podem reduzir o crescimento do folículo dominante (Badinga *et al.*, 1993) e podendo causar também dominância incompleta, que podem resultar na ovulação de um folículo mais envelhecido e menos viável (Mihm *et al.*, 1999), aumentando também o crescimento de folículos subordinados (Wolfenson *et al.*, 1995).

Relacionando ao fotoperíodo, o declínio da fecundidade durante a estação quente pode não somente ser associado com altas temperaturas, mas também há uma queda da fecundidade nos países onde as vacas leiteiras estão dentro do conforto térmico, podendo haver conexão com o fotoperíodo (Rensis *et al.*, 2017). Em fêmeas bovinas de corte durante a estação quente, o fotoperíodo modificou o desempenho reprodutivo. Uma das teorias é devido a diminuição da secreção da melatonina durante o verão, que poderia reduzir a frequência dos pulsos de GnRH e conseqüentemente reduzindo a atividade do eixo hipotálamo-hipofisário-ovariano reprodutivo (Garel *et al.*, 1987). No geral, a melatonina pode ter relação na queda de fertilidade do verão (Rensis *et al.*, 2017).

3. OBJETIVO

Com o presente trabalho, objetivou-se identificar como a variação climática influencia a produção *in vitro* de embriões bovinos (*Bos taurus*) na região de Uberlândia, MG, Brasil, minimizando-se os efeitos oriundos do touro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Dados das PIVes

Foram utilizados os resultados de PIVes realizadas do Laboratório de Biologia da Reprodução, sob coordenação do Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti em Uberlândia, de outubro de 2019 a maio de 2022. Nas diversas rotinas realizadas no laboratório, foram utilizados milhares de oócitos. No entanto, para o presente trabalho foram utilizados apenas os dados das rotinas realizadas com sêmen congelado de um único touro (touro padrão) e de partidas coletadas em um único mês. Desta forma, foi minimizada a influência ambiental sobre o macho, sendo, portanto, o efeito ambiental sobre a fêmea (qualidade de oócitos) e sobre a técnica de realização das PIVes, os principais fatores que influenciaram os resultados e que foram avaliados.

4.1.1. Obtenção e seleção de oócitos

Os ovários foram coletados em dois abatedouros comerciais nas cidades de Uberlândia e Araguari e transportados em uma garrafa térmica com soro fisiológico a 37 °C até o momento da aspiração, cerca de 30 minutos após a coleta do último ovário. No momento da aspiração folicular, os ovários eram lavados em solução salina e mantidos em um banho maria a 37 °C durante todo o procedimento. Através de seringas de 5 mL acopladas com agulhas de 18G, aspirou-se o fluido folicular oriundo dos folículos antrais, exceto os que visualmente eram classificados como possíveis folículos dominantes. Assim o fluido foi transferido para tubos falcon de 50 mL, onde passaram por um processo de sedimentação por cerca de 15 minutos. Em seguida, o sedimento foi depositado em placas específicas e foi realizado o rastreamento de oócitos.

4.1.2. Maturação *in vitro* (MIV)

Foram selecionados os oócitos classificados como grau I (ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração escura, com ausência de vacúolos, e células do cúmulo compactas com várias camadas) e grau II (ooplasma com pequenas áreas não homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração escura, com ausência de vacúolos, e células do cúmulo compactas com pelo menos mais de 5 camadas) de acordo com a classificação de STOJKOVIC *et al* (2001), pois representam os melhores oócitos em qualidade para PIVEs.

Os oócitos rastreados foram depositados em uma placa de poliestireno de 35 x 10mm, contendo meio de lavagem TCM – 199 HEPES (0,2 mM piruvato sódico, 10 mM HEPES ácido, 10 mM de HEPES sódico, 5 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino), e a partir dessa placa foram selecionados segundo a classificação de Stojkovic (2001), sendo contados e depositados em uma nova placa com meio de lavagem. Uma terceira lavagem foi realizada em microgotas de 100 µL de meio de lavagem, e após foram divididos entre 6 gotas de 100 µL de meio de maturação TCM 199 com bicarbonato (0,2 mM piruvato sódico, 26 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL FSH, 5 µg/mL LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino).

Finalmente, foram transferidos de 15 a 20 oócitos por gota de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de Petri de poliestireno de 60 x 15 mm, e mantidos por cerca de 22h em estufa na temperatura de 38,5°C, umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂, para sua maturação.

4.1.3 Seleção espermática

A fim de selecionar os espermatozoides móveis, uma dose de sêmen foi descongelada em banho maria a 37°C por 30 segundos e foi depositada sobre um gradiente de Percoll, preparado previamente, dessa forma formando um sedimento com os espermatozoides com melhor motilidade.

4.1.4. Fertilização *in vitro* (FIV)

Os oócitos maturados foram lavados três vezes em meio Fert-TALP e foram transferidos para gotas de 100 µL.

Do sedimento previamente separado, como descrito anteriormente, foram retiradas duas alíquotas de 5 µL para determinar a motilidade progressiva e a concentração em câmara de Neubauer, depositando o pellet coletado em contato com os oócitos maturados para que ocorra a fertilização. A contagem da clivagem foi realizada 48 horas após a FIV.

4.1.5 Cultivo *in vitro*

Aproximadamente 24 horas após a fertilização *in vitro*, os prováveis zigotos foram desnudados mecanicamente por pipetações sucessivas e foram lavados por 3 vezes em gotas de 100µL de meio SOF e transferidos para gotas de 100 µL do mesmo meio e cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm, onde foram cultivados por 6 dias em estufa, com atmosfera de 5% de CO₂, umidade saturada e temperatura de 38,5°C.

A taxa de clivagem foi determinada 48 horas após a fertilização *in vitro* por meio de contagem dos zigotos que apresentavam duas ou mais células com o auxílio de microscópio estereoscópico.

A contagem dos blastocistos foi realizada no sétimo dia após a fecundação de acordo com as normas preconizadas pela “International EmbryoTransfer Society”. A taxa de blastocisto foi determinada em relação ao número de oócitos iniciais e que chegaram a este estágio de desenvolvimento. Também foi calculada a taxa de desenvolvimento embrionário, a qual foi determinada em relação ao número de oócitos que iniciaram a clivagem e chegaram a blastocisto.

4.2. Dados meteorológicos

Tendo em vista que os ovários coletados dos animais foram oriundos de frigoríficos de Uberlândia e região, os dados meteorológicos de Uberlândia, Minas Gerais, foram coletados no site do Instituto Nacional de Meteorologia Ministério da Agricultura e Pecuária (INMET), onde é possível se obter dados de diversas cidades com estações meteorológicas.

Esses dados são disponibilizados em planilhas no programa Microsoft "EXCEL", cada planilha é intitulada de INMET_SE_MG_A507_UBERLANDIA_01-01-201x_A_31-12-201x, ilustrado na figura 1. Dentro das planilhas foram analisados por volta de 178.560 dados. A cada hora os dados eram coletados pelas estações e dispostos nas planilhas, eram disponibilizados os dados relacionados com precipitação total (mm); pressão atmosférica ao nível da estação (mb); radiação global (kj/m²); temperatura do ar - bulbo seco (°C) e umidade relativa do ar (%). Foram processadas as planilhas dos anos de 2019, 2020, 2021 e 2022. Para que o processamento fosse feito, de acordo com cada índice, foram aplicados alguns conceitos estatísticos. Foram realizadas avaliações do dia e avaliações do mês, de acordo com as rotinas no laboratório, ilustrado figura 2.

Na avaliação diária coletamos os dados de precipitação acumulada no dia, sendo feita a somatória de precipitação a cada hora; na pressão atmosférica foi realizada a média das 24 horas do dia; a radiação global foi realizada a somatória da radiação que se incidiu durante as 24 horas do dia; na temperatura, foi realizado a média do dia; e umidade relativa do ar, foi realizado a média do dia.

Nas coletas mensais, foi padronizado a coleta de 31 dias antes até o dia da rotina no laboratório. Dessa forma os dados coletados foram: precipitação acumulada no mês, sendo feita a somatória de precipitação a cada hora durante os 31 dias; na pressão atmosférica foi realizada a média dos 31 dias; na radiação global foi realizada a média da somatória da radiação diária durante os 31 dias; na temperatura, foi realizado a média do mês; e umidade relativa do ar, foi realizado a média do mês.

Spearman) com as taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário obtidos no laboratório em suas respectivas datas. Para realizar estas análises foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0.1. Neste software quando realizada a correlação de Spearman, é fornecido o coeficiente de correlação, bem como, o valor de p. No presente trabalho, foi considerado significativo o R (coeficiente de correlação) que apresentou valor de $P \leq 0,05$ e considerado com tendência a significativo aqueles que apresentaram valor de P entre 0,05 e 0,10.

5. RESULTADOS

As variáveis climáticas no período utilizado para as análises estão representadas na Tabela 1 na forma de mínima, máxima, média e mediana.

Tabela 1: Média, mediana, mínima e máxima das variáveis climáticas no período experimental.

	Média	Mediana	Mínima	Máxima
Precipitação (mm)	3,2	0,0	0,0	28,2
Pressão atmosférica (mB)	917,1	916,6	913,8	923,5
Radiação (KJ/m²)	18535,3	18519,4	8957,8	25551,1
Temperatura (°C)	23,6	23,3	16,6	30,0
Umidade relativa (%)	54,5	56,0	20,4	83,4

As taxas de clivagem e de formação de blastocistos foram empregadas para representar a eficiência da PIVE e para verificar as diversas influências climáticas na qualidade dos oócitos, utilizando-se para isso os coeficientes de correlação de Spearman dos fatores climáticos dos 31 dias anteriores à coleta (Tabela 2) e os coeficientes de correlação de Spearman do dia da coleta (Tabela 3).

Tabela 2: Coeficiente de correlação de Spearman entre os resultados das PIVEs e os fatores climáticos dos 31 dias anteriores à coleta.

	Taxa de clivagem	Taxa de blastocisto	Taxa de desenvolvimento embrionário
Precipitação	0,19	0,24	0,19
Pressão			
atmosférica	-0,16	-0,18	-0,12
Radiação	0,19	-0,08	-0,14
Temperatura	0,02	-0,11	-0,10
Umidade relativa	0,25	0,36**	0,32**

*= 0,10>P>0,05; **= p<0,05

Quando associamos as taxas de clivagem, blastocistos e desenvolvimento embrionário com os demais índices climáticos dos 31 dias anteriores a coleta, observou-se uma correlação positiva na umidade relativa do ar na taxa de blastocisto e taxa de desenvolvimento embrionário. Não havendo significância nos outros índices avaliados.

Tabela 3: Coeficiente de correlação de Spearman entre os resultados das PIVEs e os fatores climáticos do dia

	Taxa de clivagem	Taxa de blastocisto	Taxa de desenvolvimento embrionário
Precipitação	-0,14	0,20	0,28*
Pressão			
atmosférica	0,08	-0,13	-0,18
Radiação	0,31*	-0,01	-0,13
Temperatura	0,16	-0,05	-0,09
Umidade relativa	0,12	0,31*	0,29*

*= 0,10>P>0,05; **= p<0,05

Quando associamos as taxas de clivagem, blastocistos e desenvolvimento embrionário com os demais índices climáticos nas avaliações do dia, observamos uma tendência de correlação positiva na precipitação (período chuvoso), associado com o desenvolvimento embrionário. Houve também tendência de correlação positiva na incidência de radiação solar com a taxa de clivagem. Observou-se também que a umidade relativa do ar, semelhante à avaliação dos 31 dias anteriores a coleta, teve uma tendência de correlação positiva na taxa de blastocisto e taxa de desenvolvimento embrionário; a avaliação dos 31 dias anteriores a coleta apresentou correlação positiva quando se avalia o conjunto dos dados, relacionado a umidade relativa do ar.

6. DISCUSSÃO

Buscou-se com este estudo entender as influências das condições climáticas associadas aos processos de clivagem, formação de blastocistos e desenvolvimento embrionário em rotinas de produção *in vitro* de embriões. O clima é uma combinação de elementos que incluem temperatura, umidade, precipitação, movimento do ar, radiação, pressão barométrica e ionização (Johnson, 1987). No presente trabalho avaliou-se esses fatores ambientais, tentando associá-los as condições das doadoras do gameta feminino. Dessa forma, foram utilizadas amostras de sêmen de um touro padrão coletadas em um intervalo de um mês (junho), para minimizar o efeito touro. Portanto, as diferenças encontradas em cada rotina de PIVE foram principalmente, mas não exclusivamente, devido a qualidade do oócito, sendo parcialmente influenciada pelas condições ambientais que as fêmeas estavam inseridas. Tendo em vista que o rebanho brasileiro está mais voltado para linhagens zebuínas, é importante considerar que os zebuínos possuem maior tolerância ao estresse térmico, mantendo sua temperatura constante, mesmo em períodos mais quentes, pois possuem boa capacidade de termorregulação e o estresse térmico induz a produção de proteínas de choque térmico pelo concepto bovino (Putney *et al.*, 1988).

A hipótese considerada era que os animais que tivessem em períodos

de maior desafio, teriam sua qualidade oocitária diminuída e conseqüentemente menor eficiência na PIVE. Os resultados mostraram que quando se utilizou índices climáticos dos 31 dias anteriores a coleta, foi observado uma correlação positiva na umidade relativa do ar em relação às taxas de blastocisto e de desenvolvimento embrionário. Portanto, uma maior umidade relativa do ar durante o mês anterior à coleta de oócitos melhorou a eficiência das PIVEs (taxa de blastocisto), pois melhorou o desenvolvimento embrionário (taxa de desenvolvimento embrionário). Isso pode estar relacionado a dois fatores: (1) as fêmeas sofrem menor estresse climático quando a umidade está alta do que quando está baixa; (2), a maior umidade do ar pode determinar uma melhor qualidade do pasto e conseqüentemente, melhores condições fisiológicas das doadoras. Na primeira hipótese, deve ser considerado que na região de Uberlândia, a umidade do ar é geralmente muito baixa no período mais seco, muitas vezes chegando a umidade semelhante à encontrada em desertos. Quando a umidade relativa está muito baixa, também pode haver estresse, pois os processos de evaporação ocorrem mais rapidamente, o que pode resultar em irritação na pele e desidratação (Silva, 2000; Pereira, 2005), o que justificaria os resultados encontrados. Já no período chuvoso, quando a umidade do ar é mais elevada na região de Uberlândia, as temperaturas não são tão elevadas, pois são amenizadas pelo clima nublado.

Em relação aos índices climáticos do dia da coleta, foi observado uma tendência de correlação positiva da precipitação em relação ao desenvolvimento embrionário. Houve também tendência de correlação positiva na incidência de radiação solar com a taxa de clivagem. Uma correlação positiva entre precipitação e o desenvolvimento embrionário pode ser explicada pelo conforto térmico que a chuva pode exercer sobre os animais em um dia quente, o que poderia levar a produção de oócitos de melhor qualidade. Já uma possível correlação positiva entre a incidência de radiação solar e a taxa de clivagem, poderia ser porque a incidência de radiação solar beneficiaria a produção de oócitos que secretariam maior quantidade de fatores quimiotáticos dos oócitos ou outras características que beneficiariam o processo de fertilização *in vitro* (Umezu *et al.*, 2020).

A umidade relativa do ar, semelhante à avaliação dos 31 dias anteriores a coleta, teve uma tendência de correlação positiva com as taxas de blastocisto e de desenvolvimento embrionário. Isso corrobora com a possibilidade de que em Uberlândia a maior umidade do ar faz com que as fêmeas sofram menor estresse do que quando está baixa, produzindo assim, oócitos de melhor qualidade.

Certamente o fato do rebanho da região das coletadas de oócitos ser constituído basicamente de linhagens zebuínas e dos ovários terem sido coletados de abatedouros que abatem em sua maioria bovinos de corte, contribuiu para a pouca influência do clima nas PIVEs, visto que os zebuínos quais possuem uma tolerância maior ao estresse térmico e menores taxas de metabolismo. É sabido que *B. indicus* é mais resistente a temperaturas elevadas e a umidade do que o gado *B. taurus*. Grande parte dessa adaptação a temperaturas elevadas se deve à habilidade superior das raças termotolerantes em regular a temperatura corporal (Gaughan *et al.*, 1999) bem como à resistência celular intrínseca a temperaturas elevadas (Sartorelli *et al.*, 2006). Provavelmente se as doadoras fossem de raças europeias, os resultados seriam diferentes

7. CONCLUSÃO

Na região de Uberlândia, os fatores climáticos pouco influenciam os resultados da produção *in vitro* de embriões, quando minimizado o efeito touro. No entanto, a coleta de oócitos em períodos com alta umidade do ar e precipitação de chuva pode beneficiar a eficiência de PIVEs.

REFERÊNCIAS

- 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 environment. **J. Dairy Sci**, 1985.
- Beletti, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 92-96, 2013.

- Betteridge, K. J.; *et al.* Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p. 87-98, 1989.
- Biggers, B. G.; Geisert, R. D.; Wetteman, R. P.; Buchanan D. S. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. **J Anim Sci** ; 1987.
- Costa C. B.; *et al.* "Maximizando la producción de embriones *in vitro* en bovinos". 11(2): 96-102. **Spermova**, 2021.
- Fernandes, C. A. C.; *et al.* Weight gain potential affects pregnancy rates in bovine embryo recipients raised under pasture conditions. **Springer Science+Business Media Dordrecht**, 2015.
- Figueiredo, J. R.; Rodrigues, A. P. R.; Amorim, C. A.; Silva, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Roca. cap. 16, p. 303-327, 2008.
- Francisco, W. C. "Localização Geográfica do Brasil". **Brasil Escola**. 2022.
- Gaughan, J.B.; *et al.* Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **J Anim Sci**; 77. 2398-2405, 1999.
- Garcia, I. I.; *et al.* Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. **Theriogenology**, 2006.
- Garel, J.; Gauthier, D.; Petit, M; Thimonier, J. Influence of photoperiod on the postpartum changes in live weight and ovarian function in suckled cow. **Rep Nut Dev**, 1987.
- Gendelman, M.; Aroyo, A.; Yavin, S; Roth, Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. **Reprodução**, 2010.
- Gordon, I. Prenatal Development of the Bovine Ovary. In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. **Cambridge: CAB International: New York, Raven Press**, P; 4349, 1994,
- Hansen, P. J. *et al.* Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, 2001.
- Hansen, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 119-125, 2006.
- Hirshfield, A. N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.
- Johnson, H. D. Bioclimates and livestock. Bioclimatology and the Adaptation of Livestock. **World Animal Science**. (H. D. Johnson, ed.) Elsevier Science Publ. Co., New York. 1987.
- Kane, M.T. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potencial impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**, 2003.
- Lonergan, P.; Fair, T. *In vitro* produced embryo-Dealing with the warts. **Theriogenology**, 2008.
- Mello, R. R. C. *et al.* Produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 58–64, 2016.

- Mihm, M.; *et al* Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. **J. Reprod. Fertil**, 1999.
- Moore, K. L.; Persaud, T.V. Início do desenvolvimento humano. In: Moore KL, Persaud TVN. **Embriologia Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 13-38 1994.
- Oliveira, C. S. *et al*. Biotécnicas da Reprodução em Bovinos. 1. Ed. Juiz de Fora: **Embrapa**, 54 p. 2014.
- Pereira, C.C.J. **Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005.
- Peters, H. Migration of gonocytes in to mammalian gonad and their differentiation. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v.259, p.91-101, 1970.
- Picton, H.; Briggs, D.; Gosden, R.; The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.27-37, 1998.
- Putney, D. J; *et al*. Heat stressed-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. **Biol Reprod**;39:717-728. 1988.
- Rensis, F.; *et al*. Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. **Theriogenology**, v. 91, p. 145–153, 2017.
- Robinson, R. S., *et al* Interações corpo lúteo-endométrio-embrião na vaca leiteira: mecanismos subjacentes e relevância clínica. **Reprod Dom Anim**, 2008.
- Rocha, A.; *et al*. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, 1998
- Roth, Z.; *et al* Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, 2001.
- Rubin, K. C. P. Particularidades reprodutivas da raça Nelore na produção *in vitro* de embriões (PIVE). 53f. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina**. Londrina, 2006.
- Rüsse, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatômica**, v.24, p.77-92, 1983.
- Sartorelli, E. S.; *et al*. Influência do estresse térmico calórico na taxa de apoptose em embriões bovinos (*indicus vs taurus*) produzidos *in vitro* e na capacidade dos mesmos em originarem gestações. **Tese de doutorado**, UNESP, Botucatu, 92 f, 2006
- SILVA, R. G. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo SP: Nobel, 286 p. ISBN: 85-213-1121-4, 2000
- Stojkovic, M.; *et al*. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After *In Vitro* Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After *In Vitro* Fertilization and Culture 1. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904–909, 2001.
- Swain, J. E.; Pool, T.B. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 431-446, 2008.

Umezu, K.; *et al.* Stromal cell-derived factor 1 regulates *in vitro* sperm migration towards the cumulus-oocyte complex in cattle. **Plos One**, v.15, art. e0232536, 2020.

Viana, H. M. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v.40, n.4, p.22-40, 2022.

Vizoná, R. G. *et al.* Genetic analysis of in-vitro embryo production traits in Dairy Gir cattle. **Theriogenology**, v. 148, p. 149–161, 2020.

Wilson, S. J.; *et al.* Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle:1. Lactating cows. **J Dairy Sci**, 1998.

Wolfenson, D; Roth ,Z; Meidan, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim Reprod Sci**, 2000 .

Wolfenson, D., *et al.* Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. **Anim. Reprod. Sci.** 47:9–19. 1997.

Ying, y.; Gi, X.; Zhao, G-Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP-4 and BMP-8b signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.14, p.7858-7862, 2001.