

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

RAFAEL ARCENIO DA COSTA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ASTAXANTINA NA
QUALIDADE OOCITÁRIA E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES DE VACAS HOLANDESAS DURANTE O VERÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DOIS VIZINHOS

2021

RAFAEL ARCENIO DA COSTA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ASTAXANTINA NA
QUALIDADE OOCITÁRIA E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES DE VACAS HOLANDESAS DURANTE O VERÃO**

**Effect of astaxanthin supplementation on oocyte quality and *in vitro*
embryo development of Holstein cows during the summer**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Flavia Regina Oliveira de Barros.

DOIS VIZINHOS

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos**



RAFAEL ARCENIO DA COSTA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ASTAXANTINA NA QUALIDADE OOCITÁRIA E
DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE EMBRIÕES DE VACAS HOLANDESAS DURANTE O VERÃO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Produção Animal.

Data de aprovação: 26 de Março de 2021

Prof.a Flavia Regina Oliveira De Barros, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Lindsay Unno Gimenes, Doutorado - Universidade Estadual Paulista - Unesp

Prof Marcelo Tigre Moura, Doutorado - Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 26/03/2021.

A meus Pais Antônio e Vera, aos meus irmãos Marinalda, Débora, Tafaél e Bruna.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Frederico (UTFPR) e seu grupo de pesquisa GEBIOMET pelo apoio na coleta dos dados climáticos e fisiológicos.

Aos Colegas do LAB. BARROS ao qual me orgulho muito em fazer parte, obrigado por todos os sábados que passamos juntos coletando dados.

Ao Laboratório Fertiliza Embryo – Reprodução animal de Chapecó – SC, por não medir esforços em colaborar com nossa pesquisa. Agradeço imensamente Ione, Marcelino e Jorge por toda dedicação e cuidado com nosso trabalho.

Aos proprietários e colaboradores da fazenda CECCON sem o esforço e participação de vocês esse trabalho não sairia do papel.

Aos meus sobrinhos Victor, Luisa e Arthur.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da UTFPR Campus Dois Vizinhos.

Aos amigos do mestrado, obrigado pela convivência e parceria, jamais esquecerei de vocês.

Aos meus familiares que sempre me ajudaram e me auxiliarão.

Aos meus amigos da família Castelo de Madeira, amigos que estão no meu coração.

A DEUS por te me guiado nessa pesquisa e nessa jornada.

A minha super orientadora Dra. Flavia Barros, obrigado por todos os ensinamentos, atenção, prestatividade e acima de tudo experiência que me passou nesses dois anos de convívio.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!”

Mario Sergio Cortella

RESUMO

COSTA, Rafael A. da . Efeito da suplementação com astaxantina na qualidade oocitária e desenvolvimento *in vitro* de embriões de vacas holandesas durante o verão. 77f. (Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2021).

No Brasil, fêmeas bovinas em lactação são frequentemente expostas à altas temperaturas, principalmente durante o verão, ficando sujeitas aos efeitos do estresse térmico, elas desenvolvem problemas relacionados à reprodução como comprometimento do desenvolvimento folicular que impacta negativamente a qualidade oocitária, observado foi em vacas de alta produção da raça holandesa. Desta forma, objetivo é examinar o efeito da suplementação de vacas leiteiras com o antioxidante astaxantina sobre a qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário *in vitro*. Vacas holandesas em lactação (n = 45; \pm 550 kg de peso vivo) de uma fazenda com sistema de confinamento do tipo *Compost Barn*, localizada na região Sudoeste do Paraná – Brasil, receberam astaxantina (0, 0,25 ou 0,50 mg kg⁻¹ dia⁻¹ para animais dos grupos controle, baixa astaxantina ou alta astaxantina, respectivamente) por 75 dias. Ao final da suplementação, todos os animais foram submetidos a três sessões de OPU realizadas com intervalos de 15 dias. Todos os oócitos recuperados foram avaliados quanto morfologia, classificados e submetidos à fertilização *in vitro* para avaliação do desenvolvimento embrionário. A distribuição normal dos dados foi verificada (teste Shapiro-Wilk) assim como a homogeneidade das variâncias (teste F max). Quando as premissas para ANOVA não foram atendidas, os dados foram transformados pela função raiz quadrada e ANOVA de uma via (avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro*; efeito de astaxantina) ou duas vias com mensurações repetidas no tempo (qualidade oocitária; efeito de astaxantina, tempo e interação) seguidas de teste de comparação múltipla de Tukey foram realizadas pelo programa GraphPad Prism vs.7.0 (GraphPad Inc.). Embora tenham sido observadas temperaturas elevadas durante todo o verão, principalmente no período da tarde com temperatura máxima de 29 °C detectada no ambiente no qual os animais estavam confinados, as temperaturas cutânea e retal, frequência cardíaca e respiratória não foram afetadas. Observou-se um efeito claro da estação na taxa de produção de embriões a partir de oócitos aspirados de vacas do grupo controle em diferentes épocas do ano, sendo uma pior taxa observada no verão (p=0,0399). Vacas suplementadas com a dose de 0,50 mg kg⁻¹ dia⁻¹ de astaxantina ofereceram uma melhor taxa de recuperação de oócitos totais comparado com grupo controle (p=0,0395) e 0,25 mg kg⁻¹ dia⁻¹ de astaxantina (p=0,0279). Contudo tal efeito somente foi observado na primeira OPU após a suplementação, perdendo-se com o tempo. A suplementação com a maior dose de astaxantina permitiu a coleta de maior número de oócitos viáveis comparado com o grupo controle e o que recebeu a menor dose de astaxantina (p=0,0452). Finalmente, as taxas de clivagem (D3) e blastocisto (D7) não foram afetadas pela suplementação com astaxantina, assim como a taxa de desenvolvimento e eclosão. É possível concluir que, a suplementação com astaxantina em vacas holandesas em lactação por 75 dias no verão melhora a taxa de recuperação de oócitos viáveis sem afetar a produção de embriões *in vitro*. Assim, mais estudos associando manejo, sistema de confinamento e ambiência e suplementação com o antioxidante astaxantina são necessários para contribuir com a melhora do sucesso reprodutivo na bovinocultura leiteira nas estações mais quentes. **Palavras-chave:** Produção *in vitro* de embriões. OPU. Estresse térmico. Carotenoide.

ABSTRACT

COSTA, Rafael A. da. Effect of astaxanthin supplementation on oocyte quality and *in vitro* embryo development of Holstein cows during the summer. 77f. Dissertation (Master's Degree in Animal Sciences – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2021).

Lactating cows in Brazil are frequently exposed to high temperatures, especially during the summer. Subjected to the effects of heat stress, they develop reproductive problems like impaired follicular growth, negatively impacting oocyte quality. This is particularly relevant for high-yielding Holstein cows. In this manner, this study aimed to examine the effect of daily supplementation of milk cows with astaxanthin on oocyte quality and *in vitro* embryo developmental potential. Lactating Holstein cows ($n = 45$; ± 550 kg of body weight) from a Compost Barn in the Southwest region of Paraná – Brazil were treated with astaxanthin (0, 0.25 or 0.50 mg kg⁻¹ day⁻¹ for control, low astaxanthin or high astaxanthin group, respectively) for 75 days. Upon the end of the supplementation period, three OPU with a 15-day interval were conducted for oocyte quality analysis in all females. All oocytes were then subjected to *in vitro* fertilization to assess their developmental potential. Data were tested for normality of residues (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (F max test), and square root-transformed when premises for ANOVA were not met. One-way ANOVA (embryo development data; effect of astaxanthin) or two-way repeated-measures ANOVA (oocyte quality, effect of astaxanthin, time, and interaction) followed by Tukey's multiple comparisons test were performed using GraphPad Prism vs.7.0 (GraphPad Inc.). Although elevated temperatures were observed during all summer, mainly on afternoons with the maximum temperature of 29 °C detected in the compost barn, skin and rectal temperatures, heart, and respiratory rates were not significantly affected. Nevertheless, a clear effect of the season was observed on *in vitro* embryo production when oocytes were aspirated from control females at different times of the year. A lower blastocyst rate was obtained during the summer ($p=0.0399$). A higher total oocyte recovery rate was obtained when cows supplemented with 0.50 mg kg⁻¹ day⁻¹ astaxanthin ($p<0.05$) were aspirated compared to control ($p=0.0395$) and 0.25 mg kg⁻¹ day⁻¹ astaxanthin ($p=0.0279$) groups. However, such effect was only detected on the very first OPU, diminishing with time after astaxanthin supplementation ended. Moreover, a higher dose of astaxanthin allowed the collection of more morphologically viable oocytes when compared to the low astaxanthin group ($p=0.0452$). Finally, cleavage (D3) and blastocyst (D7) rates were not affected by astaxanthin supplementation. The same was observed for development and hatching rates. In conclusion, although the supplementation of lactating Holstein cows with astaxanthin for 75 days in the summer can improve the total and viable oocyte recovery rates, it could not bring the embryo production rates closer to the higher rates observed in the winter. Therefore, further studies associating animal handling, confinement systems, environment management, and the use of the antioxidant astaxanthin are needed to contribute to the improvement of reproductive success rates in dairy cows in the summer.

Keywords *In vitro* production of embryos. OPU. Heat stress. Carotenoids..

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula estrutural da astaxantina.....	27
Figura 2 – Croqui da instalação de confinamento de vacas leiteiras no sistema <i>Compost Barn</i>	34
Figura 3 – Vista externa da instalação de confinamento de vacas leiteiras no sistema <i>Compost Barn</i>	35
Figura 4 - Temperatura do ar (TAR) nos períodos de verão e inverno. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.....	43
Figura 5 - Umidade relativa (UR) nos períodos de verão e inverno. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.....	44
Figura 6 - Índice de temperatura e umidade do ar (ITU) nos períodos de verão e inverno. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.....	46
Figura 7 - Oócitos totais (média ± EPM) por animal suplementados com diferentes doses de astaxantina em relação a data a aspiração folicular guiada (OPU). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.	53
Figura 8 – Efeito de data de OPU e astaxantina sobre o total de oócitos viáveis por animal (média ± EPM) após suplementação com diferentes doses de astaxantina. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021	54
Figura 9 – Taxa de clivagem e taxa de blastocisto (média ± EPM) obtidas na produção <i>in vitro</i> de embriões a partir de oócitos de fêmeas tratadas com diferentes doses de astaxantina. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.....	55
Figura 10 - Desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões obtidos a partir de oócitos aspirados de vacas holandesas suplementadas com diferentes doses de astaxantina (média ± EPM). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.....	57
Figura 11 – Taxas de recuperação de oócitos (oócitos totais e oócitos viáveis) por OPU de vacas holandesas em diferentes estações do ano. Dados não transformados (média + EPM). Nível de significância estatística: * para $p < 0,05$).....	58
Figura 12 – Taxas de clivagem e blastocisto de embriões obtidos a partir de oócitos do grupo controle, aspirados de fêmeas em diferentes estações do ano. (Dados não transformados: média + erro padrão da média). Nível de significância estatística: * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Temperatura superficial da pele (média ± EPM) (°C) em relação ao tempo de suplementação com duas doses de astaxantina (0,25 ou 0,50 mg kg ⁻¹ dia ⁻¹) e controle. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.....	47
Tabela 2 - Temperatura retal (média ± EPM) (°C) em relação ao tempo de suplementação com duas doses de astaxantina (0,25 mg kg ⁻¹ dia ⁻¹ e 0,50 mg kg ⁻¹ dia ⁻¹) e controle. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.....	48
Tabela 3 - Frequência cardíaca (média ± EPM) (bat min ⁻¹) em relação ao tempo de suplementação com duas doses de astaxantina (0,25 e 0,50 mg kg ⁻¹ dia ⁻¹) e controle. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.....	49
Tabela 4 - Frequência respiratória (média ± EPM) (mov min ⁻¹) em relação ao tempo de suplementação com duas doses de astaxantina (0,25 ou 0,50 mg kg ⁻¹ dia ⁻¹) e controle. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

BEN	Balanco energético negativo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
D10	Dia dez
D3	Dia três
D7	Dia sete
DEL	Dias em leite
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITU	Índice de temperatura e umidade
IU	Unidades internacionais (1 IU = 0,3 microgramas de vitamina A)
LH	Hormônio luteinizante
NRC	<i>National Research Council</i>
OPU	<i>Ovum pick-up</i> - aspiração folicular guiada por ultrassom
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
TAR	Temperatura do ar
Tbs	Temperatura do bulbo seco
Tbu	Temperatura do bulbo úmido
TC	Temperatura cutânea
TR	Temperatura retal
UR	Umidade relativa do ar
VG	Vesícula germinativa

LISTA DE UNIDADES

μL	Microlitros
kg	Quilo
mg	Miligrama
$\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	Miligramas por quilo por dia
mov min^{-1}	Movimento por minuto
nM	Nanomolar
ppm	Partes por milhão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 FATORES QUE INTERFEREM NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS	16
3.2 INFLUÊNCIA DO MICROCLIMA NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS	18
3.3 INFLUÊNCIA DA DIETA NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS	22
3.3.1 Uso de Antioxidantes em Dietas para Bovinos	24
3.3.1.1 Astaxantina	26
3.4 IMPORTÂNCIA DAS BIOTÉCNICAS DE REPRODUÇÃO EM BOVINOS DE LEITE	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 LOCAL E ANIMAIS	33
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
4.3 PARÂMETROS AVALIADOS	36
4.3.1 Dados Microclimáticos	36
4.3.2 Variáveis fisiológicas	37
4.3.3 <i>Ovum pick-up</i>	38
4.3.4 Análise da Morfologia Oocitária	38
4.3.4.1 Classificação dos oócitos	38
4.3.4.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões – teste de competência oocitária	39
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DO MICROCLIMA	42
5.2 VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS	47
5.3 QUALIDADE E POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO	51
6 CONCLUSÕES	60
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICES	76
APÊNDICE A – Variáveis microclimáticas (média ± EPM) nos meses de janeiro a março e de julho a setembro de 2020, para as variáveis índice de temperatura e umidade do ar (ITU), temperatura do ar (TAR) e umidade relativa (UR). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021	77

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os dez maiores produtores de leite do mundo segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (ZOCCAL, 2017). A produção de leite cresceu 131% entre os anos de 1990 e 2019 (CARVALHO; ROCHA, 2020). Desse modo, a tecnificação no país vem revolucionando e potencializando a produção, transporte, industrialização e comercialização (ZOCCAL, 2017). Como resultado desse processo de tecnificação, a produção de leite aumentou de 30,7 bilhões para 34,8 bilhões de litros de leite produzidos por ano entre 2010 e 2019, o que denota um crescimento de 13,3% (IBGE, 2019). Em 2018, o Paraná com 4.375 milhões de litros de leite produzido, foi o principal produtor de leite do Sul do país e o segundo no ranking dos estados produtores, atrás apenas de Minas Gerais (ZOCCAL, 2020).

Outro dado que merece destaque é a quantidade de litros produzidos por vaca, o qual apresentou um crescimento de 26% entre 2014 até 2017, passando de 1.340 litros para 1.693 litros por vaca por lactação. Além dos dados expostos, é importante mencionar que o aumento de produção em 2017 ocorreu com menos vacas ordenhadas, sendo que a diminuição foi de 26% quando comparado a 2014, conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019).

A produtividade média de leite na Região Sudoeste do Paraná em 2018 foi de 13 litros de leite por vaca por dia, sendo que a Região tem destaque como uma das principais bacias leiteira do Paraná, além de grande importância econômica (ALVES et al., 2020). Dessa forma, os produtores de leite desta região vem investindo em tecnologia e estruturas para sistemas de produção voltados a entregar maior conforto e bem-estar aos animais (PILATTI et al., 2019).

O sistema de produção de confinamento *Compost Barn* tem sido o modelo preferido por produtores Brasileiros (MOTA et al., 2019). Esse sistema é baseado em um espaço coletivo com superfície de descanso macia e confortável, que permite que os animais se movimentem livremente. A implantação desse sistema tem como objetivo melhorar o bem-estar animal, em que sua construção reduz a exposição dos animais à radiação solar, bem como utiliza sistema de resfriamento, por meio de ventilação artificial e aspersores, mitigando os efeitos climáticos adversos aos animais

(PERISSINOTO et al., 2009; RADAPELLI, 2018).

A produção e a reprodução do rebanho leiteiro sofrem influência direta do ambiente, da alimentação e da raça. Quando os animais passam por estresse, relacionado à altas temperaturas, esses passam a apresentar disfunções nos parâmetros fisiológicos, afetando o consumo de alimentos e as funções reprodutivas (SENEDA et al., 2006; ARROYO, 2008).

As funções reprodutivas são afetadas pela redução da fertilidade causada pelo estresse térmico durante o verão, em função das alterações na dinâmica folicular, secreção hormonal, fluxo sanguíneo uterino e função endometrial (HANSEN, 2009). Alguns estudos demonstram que o oócito bovino e o embrião recém-formado são muito susceptíveis à temperaturas elevadas, causando comprometimento da maturação do oócito, fertilização e desenvolvimento embrionário (HANSEN, 2009; DO et al., 2013). Todavia, um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais o estresse térmico afeta oócitos em crescimento permitirá o desenvolvimento de estratégias que minimizem os efeitos deletérios do estresse térmico sobre a fertilidade.

O estresse térmico pode gerar vários distúrbios nas funções reprodutivas. Ao associar a dieta, suplementos que possam reduzir os efeitos do estresse térmico, como a astaxantina, um carotenoide extremamente comum, pode ser utilizado por ser um antioxidante solúvel em gordura típico que combate as espécies reativas de oxigênio (ERO) e bloqueia a peroxidação lipídica, levando a uma redução nos efeitos negativos do calor na reprodução. Além disso, foi demonstrado que a astaxantina melhora o desenvolvimento de embriões expostos ao estresse por calor por meio da redução dos genes induzíveis por estresse (DO et al., 2013).

Dessa forma, a nutrição também afeta a qualidade do oócito, através do estresse oxidativo na célula, que é desencadeado pelo desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Esse desequilíbrio ocorre devido à alta demanda metabólica de animais com alta produção, pela baixa disponibilidade de antioxidantes via dieta ou animais em condições de estresse térmico, ambos os eventos tendem a potencializar as atividades de enzimas pró-oxidantes e aumentar assim, as ERO da célula (SOUZA; FERREIRA, 2007).

Ainda no que se refere às consequências do estresse oxidativo nas células

germinativas, pode-se citar a diminuição no potencial de embriões viáveis tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Nesse sentido, é interessante salientar que, segundo Rumpf (2007), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) potencializa e favorece a rápida difusão de genes de animais com alto valor zootécnico. Contudo, mesmo a PIVE sendo uma técnica inovadora com rápida multiplicação de fêmeas no plantel, a obtenção de oócitos com qualidade ainda é um gargalo da técnica.

O uso de antioxidantes favorece a defesa do organismo e podem ser utilizados juntos a formulação de dietas ou administrado de forma a suplementar a dieta (CELLI; ROBINSON, 2010; SANTOS, 2016). O uso pode se tornar essencial no que se refere a manutenção da qualidade da reprodução, já que o estresse térmico pode afetar o desenvolvimento folicular, a ovulação, a qualidade do oócito, a fertilização, a sobrevivência embrionária e o estabelecimento da gestação (ROBINSON et al., 2006; MAGGIONI et al., 2008; ABREU et al., 2018).

Diante do exposto, justifica-se a necessidade de identificar e estudar novos parâmetros em relação à busca dos fatores que afetam diretamente a atividade ovariana em relação ao recrutamento e produção de oócitos. A hipótese do trabalho é que vacas holandesas suplementadas com astaxantina no verão apresentam oócitos com maior potencial para o desenvolvimento *in vitro* do que animais não suplementados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Testar a suplementação de vacas holandesas durante o verão com astaxantina na qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o microclima em vacas holandesas mantidas em sistema de confinamento do tipo *Compost Barn*, por meio da temperatura do ar, umidade relativa do ar e índice de umidade do ar.

Avaliar as condições fisiológicas do animal durante o período de suplementação com o antioxidante astaxantina.

Avaliar a qualidade oocitária e a produção *in vitro* de embriões subsequente em resposta a diferentes doses de astaxantina fornecidas como suplementação da dieta, após a recuperação dos oócitos por meio de OPU.

Avaliar a condição de estação verão e inverno na recuperação de oócitos e PIVE para o grupo controle.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FATORES QUE INTERFEREM NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS

Os ganhos genéticos advindos da seleção de animais na raça holandesa para a característica de produção de leite, em conjunto com o manejo nutricional para a alta produção gerou um antagonismo com a fertilidade. Como resultado, nota-se que a eficiência reprodutiva dos rebanhos leiteiros diminuiu consideravelmente. Esse fato pode ser explicado em virtude da baixa herdabilidade estimada para fertilidade (<5%) (SILVEIRA et al., 2018).

Estudos indicam que a nutrição exerce papel importante na manutenção e concentração dos substratos celulares disponibilizados, desempenhando, ainda, funções de estímulos ou inibição na concentração de hormônios neuroendócrinos, os quais afetam diretamente a função reprodutiva dos ruminantes (MADELLA-OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, deve-se salientar a importância de uma nutrição de precisão com um maior equilíbrio nutricional possível dentro de uma fazenda, sendo que é essencial saber a correlação entre nutrição e reprodução, posto que são elementos determinantes no planejamento de um rebanho.

Outra observação pertinente é a tendência de vacas leiteiras de alta produção entrar em balanço energético negativo (BEN), o qual pode ser considerado um período crítico da produção, geralmente associado ao baixo peso corporal e alta mobilização de reservas de gordura. Segundo Maggioni et al. (2008), vacas que perdem intensamente a condição corporal no início da lactação, bem como aquelas com altas concentrações séricas de triglicerídeos hepáticos, os quais são indicativos de mobilização excessiva de gordura, produzem oócitos de qualidade inferior, podendo ser observado tal fato pela redução no desenvolvimento do mesmo tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Além do mais, após o parto, o sistema reprodutivo da fêmea bovina passa por uma série de adaptações fisiológicas, com o intuito de restabelecer a capacidade reprodutiva o mais rápido possível.

Um manejo nutricional inadequado, ou seja, aquele caracterizado por um descompasso entre a relação de energia, proteína e minerais, nesta fase é considerado um fator crítico determinante para o reinício do ciclo reprodutivo dessas

vacas (FUNSTON, 2004).

Além da nutrição, outros fatores podem exercer influência sobre a taxa de concepção de um plantel. Têm-se, como exemplos, a fertilidade da vaca e do touro, anomalias puerperais, observação de cio e o estresse térmico. Em países tropicais, o verão exerce importante influência sobre a reprodução das vacas holandesas especializadas em leite, sendo que a taxa de concepção tende a cair drasticamente. Durante a estação verão, perdas na detecção do estro podem chegar a 75% em decorrência da menor duração e intensidade do estro, as quais advêm da redução plasmática de estradiol sanguíneo circulante no pró-estro (FREITAS; GUERREIRO, 2019).

Os bovinos são animais homeotérmicos que regulam a temperatura interna do corpo pelo balanço entre a quantidade de calor metabólico produzido e a dissipação de calor para o ambiente para manter a temperatura corporal constante. Destarte, é possível conceituar o estresse térmico como a soma de forças externas a um animal homeotérmico que altera a temperatura corporal normal causando mudanças fisiológicas, metabólicas, celulares e moleculares (HANSEN, 2009).

É nítida a influência direta que o ambiente exerce sobre o comportamento reprodutivo e a produção para a raça holandesa. Esses animais, quando fora da sua zona de termoneutralidade, podem apresentar disfunções nos parâmetros fisiológicos, aumento nas concentrações de cortisol circulante, diminuição do consumo alimentar e funções reprodutivas. Para essa raça, a zona de conforto representa uma variação na temperatura ambiente entre 1 e 16 °C, proporcionando uma condição para que a temperatura do corpo se mantenha constante com o mínimo de esforço do sistema termorregulador (AZEVEDO; ALVES, 2009).

A exposição de vacas lactantes à altas temperaturas e umidade relativa do ar, leva ao aumento de sua temperatura interna do corpo, resultando no estresse térmico e redução das taxas de prenhez. Em estudos conduzidos na Flórida (EUA), as taxas de concepção em vacas lactantes (Pardo-Suíço, Jersey e Holandesa) diminuiu de 52 para 32 % de acordo com o aumento da temperatura do ar de 23,9 para 32,2 °C durante o verão (PIRES et al., 2002).

Dessa forma, o aumento da temperatura ambiente observado durante os meses quentes do ano está diretamente relacionado ao aumento da temperatura

corporal em vacas produtoras de leite, o que resulta em hipertermia. Quando esta situação ocorre, o desempenho ovariano é comprometido, com alteração da dominância folicular e esteroidogênese, em conjunto com a diminuição da secreção de gonadotrofinas e redução da competência oocitária (OLIVEIRA et al., 2012).

A viabilidade dos oócitos bovinos é altamente afetada em animais sob estresse e esta susceptibilidade à altas temperaturas podem ser detectada na fase de vesícula germinativa (VG) e na maturação oocitária. A exposição de vacas holandesas ao estresse térmico reduz a competência de oócitos em VG conforme observado pela redução do desenvolvimento embrionário (OLIVEIRA et al., 2012).

Assim, o desenvolvimento de modificações no manejo, com o intuito de mitigar os efeitos negativos da temperatura e umidade elevadas, é essencial para potencializar o aproveitamento da capacidade produtiva no país.

3.2 INFLUÊNCIA DO MICROCLIMA NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS

O clima quente do Brasil gera problemas relacionados ao ambiente para animais em sistemas de produção, seja intensivo ou extensivo, podendo afetar a produtividade e o bem-estar animal, o que também prejudica a geração de renda ao produtor. Para contornar o cenário é preciso que sejam adotadas medidas de prevenção e redução desses danos (PIRES, 2003).

O sistema de alojamento pode afetar o bem-estar e o desempenho de vacas leiteiras, sendo necessário que o ambiente de confinamento possua instalações com controle de todas as variáveis microclimáticas, o que muitas vezes não é totalmente possível. Ao se sentir desconfortável, o animal inicia o processo de termorregulação para manter a temperatura corporal (PILATTI; VIEIRA, 2017).

Bovinos são animais homeotérmicos cuja temperatura corporal fisiológica é de aproximadamente 38 °C, independentemente das variações de temperatura ambiente. A regulação da temperatura corporal é realizada através de processos de produção e perda de calor por meio da condução, convecção e radiação em que ocorrem perdas de sensíveis de calor, sem que o animal tenha controle sobre tais processos e evaporação, em que ocorre um controle fisiológico da temperatura (NÄÄS, 1989; KLEIN, 2014).

Para raças europeias a temperatura ideal para manutenção do conforto térmico é de 10 a 20 °C; já para raças zebuínas a temperatura pode variar de 10 a 27 °C (AZEVEDO; ALVES, 2009). Para vacas em lactação a temperatura deve estar entre 4 a 24 °C (NÄÄS, 1989), pois como estão em processo de produção, uma redução de 5 °C da temperatura do ar pode afetar a produção de leite em 10 litros por dia, pois esses animais são mais suscetíveis a altas temperaturas, bem como está associado a alta ingestão de alimentos para a manutenção da produção (AZEVEDO; ALVES, 2009; BERMAN et al., 2016).

Quando a temperatura corporal aumenta, inicia-se um processo de resfriamento através de vasodilatação periférica, aumento da frequência respiratória associada ao aumento de perdas energéticas, mudança de comportamento, redução no consumo de alimento ou a seletividade, que acarretam a redução da taxa metabólica e aumento no consumo de água, redução na produção de leite e problemas relacionados a reprodução (ROBINSON, 2004; AZEVÊDO; ALVES, 2009; SPENCER, 2011).

Quando a dissipação de calor não é eficiente, o animal entra em estado de estresse térmico (BERNABUCCI, 2014). O estresse causa efeitos deletérios a saúde animal, causando alteração e distúrbios nos processos fisiológicos (HANSEN, 2009). Altas temperaturas afetam mais animais de raça europeia (*Bos taurus taurus*) em comparação com as raças zebuínas (*Bos taurus indicus*), mais adaptadas a temperaturas tropicais (FERREIRA, 2005). Essa característica se dá em virtude da maior capacidade das raças zebuínas de transpirar e apresentar menor taxa de metabolismo (MELO et al., 2016).

Para a manutenção de condições de conforto para o animal, sistemas de confinamento são desenvolvidos e aprimorados para garantir a máxima produção de leite e performance reprodutiva. O controle do microclima através de índices de temperatura e umidade auxiliam o produtor no processo de tomada de decisão para obter resultados satisfatórios para a sua produção e reprodução.

O estresse térmico pode ser monitorado através de dados microclimáticos. O índice de temperatura e umidade (ITU) utiliza esses dados com a finalidade de avaliar os efeitos negativos que o estresse por calor pode causar no animal (BERMAN et al., 2016). A avaliação do ITU foi primeiramente estudada por Thom (1959), com objetivo

de avaliar o conforto térmico em humanos, passando então a ser utilizado em animais, com o desenvolvimento de modelos que incluem temperatura em bulbo seco, temperatura em bulbo úmido, velocidade do vento e radiação solar, até o método de desenvolvido por Berman et al. (2016), que considera a interação de temperatura em bulbo seco e umidade relativa.

O primeiro sinal de que os animais estão sobre estresse pode ser observado por meio da frequência respiratória, que aumenta ou diminui de acordo com a intensidade e o tempo de estresse ao qual os animais estão submetidos (HAHN et al., 1997). Segundo Hahn et al. (1997), a frequência respiratória ideal no bovino é de 60 movimentos respiratórios por minuto (mov min^{-1}) que indicam que o animal não está sobre estresse, quando superior a 120 mov min^{-1} , o calor excessivo causa sofrimento ao animal, enquanto a observação de valores acima de 160 mov min^{-1} requer a tomada de medidas de emergência para amenizar o estresse. Para a frequência cardíaca o ideal é seja mantida entre de 60 a 80 batimentos por minuto (bat min^{-1}) (FEITOSA, 2008).

A temperatura cutânea de vacas da raça holandesa alojadas em locais climatizados pode variar entre $31,6 \text{ }^\circ\text{C}$ as 6 horas da manhã e $34,7 \text{ }^\circ\text{C}$ as 13 horas, sem que estas temperaturas indiquem que o animal está sofrendo estresse pelo calor. A temperatura pode variar de acordo com as condições do ambiente, umidade, radiação solar e velocidade do vento (MARTELLO et al, 2004), já em relação as condições fisiológicas, ela varia de acordo com a vascularização e a evaporação pelo suor (CUNNINGHAM, 1999).

Vacas holandesas sofrem alteração da temperatura cutânea em virtude da pelagem que apresenta duas colorações, branca e preta, em que a pelagem preta absorve mais radiação em comparação com a branca (SILVA et al., 2003). Segundo Façanha et al. (2010) a temperatura entre as duas colorações pode variar em $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e animais avaliados no semiárido brasileiro.

A temperatura corporal de vacas leiteiras pode ser avaliada por meio da temperatura retal, vaginal ou da pele do úbere (KAUFMAN et al., 2018). A temperatura retal (TR) indica o estresse térmico, sendo influenciada por fatores como a hora do dia, ingestão de alimentos e água, estação do ano, velocidade do vento, além de idade, raça e estado fisiológico dos animais, ela também é utilizada como forma de

avaliar a adaptabilidade fisiológica dos animais a ambientes quentes. O aumento da TR indica que os mecanismos de liberação de calor tornaram-se insuficientes para manter a homeotermia, tornando-se um parâmetro indispensável de avaliação do estresse térmico (MARTELLO et al., 2004; PERISSINOTTO et al., 2009).

Os principais efeitos do estresse por calor estão relacionados a perdas na produção de leite de vacas (BOHMANOVA et al., 2007), qualidade espermática dos bovinos em reprodução (MENEGASSI et al., 2016), diminuição da expressão do cio, comprometimento da maturação dos folículos ovarianos e ovulação (HANSEN, 2004), e a saúde das vacas leiteiras (BERNABUCCI et al., 2010).

Sobre o oócito e o embrião, o estresse térmico causado pela elevação da temperatura atua sobre a função celular, que implica na maturação do oócito, fertilização e o potencial de desenvolvimento do embrião (HANSEN, 2004). Dessa forma, o desenvolvimento e a maturação folicular são influenciados pelo aumento na produção de cortisol, afetando a liberação do hormônio luteinizante (LH) e atraso ou bloqueio de receptores para hormônio folículo estimulante (FSH) e ondas pré-ovulatórias de estradiol. No hipotálamo ocorre a redução da secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), afetando negativamente a reprodução (SHIMIZU et al., 2005; MENEZES, 2010; SILVA et al., 2010).

Estudos relacionados ao efeito do estresse térmico em oócitos têm sido realizados ao longo dos anos. O excesso de calor leva a redução da fertilidade já que afeta as funções das gonadotrofinas e endometrial, com isso ocorre a redução da manifestação do estro de 14 para 8 horas (PAULA-LOPES et al., 2008).

Ferreira et al. (2011) observaram que houve efeito significativo em relação ao número de oócitos totais e viáveis coletados de novilhas, vacas de alta produção e vacas múltiparas na estação verão e inverno, em que o total de oócitos coletados foi superior no inverno em relação ao verão. Para as novilhas o total de oócitos coletados em relação a viabilidade e estação do ano não foi significativa, já para os animais lactantes, houve diferença em que para animais em lactação o número de oócitos recuperados foi de 10,86 no inverno e 6,30 no verão, sendo viáveis 8,00 e 4,32 oócitos para o inverno e verão, respectivamente. Da mesma forma animais com mais de uma gestação apresentaram 15,14 no inverno e 6,51 no verão oócitos recuperados sendo viáveis 12,87 e 5,15 oócitos para o inverno e verão, respectivamente.

Para tentar reverter e minimizar os efeitos do estresse é necessário que os animais permaneçam em locais com conforto térmico de acordo com a necessidade de cada raça ou clima ao qual o animal está inserido. Para isso, sistemas de resfriamento, com a presença de aspersores e nebulizadores de água e até o uso de ventiladores, se faz necessário (BACCARI Jr., 1998), da mesma forma que o sombreamento do local para a redução dos efeitos da radiação, contribuem para a redução de problemas reprodutivos, já que mantem os processos fisiológicos e metabólicos em bom funcionamento (SOUZA et al., 2010).

3.3 INFLUÊNCIA DA DIETA NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS

Além da genética e fatores ambientais, a nutrição tem grande influência na expressão das diversas características reprodutivas (FERNANDES, 2016). A nutrição animal pode afetar o desempenho reprodutivo por meio de falhas no ajuste entre a disponibilidade de nutrientes e as necessidades do animal para a reprodução ou para o início da vida reprodutiva (FERNANDES, 2016; VALENTIM et al., 2019).

A nutrição deficiente afeta o BEN, tornando-o negativo, pois a energia consumida não supre o gasto para produção e manutenção, gerando perda no escore corporal das fêmeas bovinas. Como consequência do BEN negativo observamos a redução da fertilidade (VIEIRA, 2011).

Para evitar problemas como esse é necessário que alimentação seja balanceada com consumo adequado de energia, proteína, vitaminas e minerais. Assim como as reservas nutricionais dos animais são utilizadas primeiramente para a sua manutenção, ou seja, são utilizados no metabolismo basal e crescimento, depois são utilizadas no desempenho reprodutivo para a lactação, acúmulo de reservas corporais, ciclo estral e início da gestação (MAGGIONI et al., 2008; PIRES, 2011).

Após suprir as necessidades fisiológicas, o animal direciona suas reservas para a reprodução. Quando o animal não recebe a quantidade de nutrientes específicos necessários para os processos relacionados a reprodução, como desenvolvimento folicular, ovulação, qualidade do oócito, maturação oocitária, fertilização, sobrevivência embrionária e estabelecimento da gestação, esses processos não ocorrem ou possui baixa taxa de sucesso como, por exemplo,

estabelecimento da prenhez (ROBINSON et al., 2006; MAGGIONI et al., 2008; ABREU et al., 2018).

A má nutrição afeta o potencial reprodutivo a médio e a longo prazo, pois além de afetar os diferentes estados fisiológicos, pode também causar alterações do funcionamento do sistema endócrino, em especial o eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, e com isso desregular a fisiologia reprodutiva do animal (ALMEIDA et al., 2007; MAGGIONI et al., 2008).

O correto desenvolvimento folicular precisa de quantidades adequadas de nutrientes (VALENTIM et al., 2019). O FSH e o LH atuam na maturação dos folículos ovarianos, sendo o FSH responsável pelo crescimento e desenvolvimento folicular inicial e o LH pela maturação final do folículo (HAFEZ; HAFEZ, 2004). À medida que os folículos crescem, as células da granulosa iniciam o processo de especialização e conseqüentemente há quantidades maiores de estradiol sintetizado, que levam a um pico hormonal que, em ambiente de baixa concentração de progesterona, contribui para um pico de LH desencadeando a ovulação (DELLA-FLORA et al., 2010).

Após a ovulação, os efeitos do déficit de nutrientes podem ser observados no desenvolvimento subsequente do oócito, pois a alteração do metabolismo do animal pode comprometer a sobrevivência do embrião (ALMEIDA et al., 2007).

A suplementação da dieta acima das exigências do animal, tem como função estimular a taxa de ovulação, o tamanho dos folículos ovarianos e a sobrevivência embrionária (VALENTIM et al., 2019). O uso da suplementação para a disponibilização de nutrientes melhora índices produtivos, e tais resultados estão alinhados a fertilidade, fecundidade e sobrevivência das crias (CEZAR; SOUSA, 2006). A utilização de β -caroteno na suplementação, por exemplo, apresenta efeitos benéficos para a reprodução, pois aumenta a intensidade do estro, a taxa de concepção, redução na mortalidade embrionária, entre outros (LANA, 2005).

Assim, uma dieta adequada na reprodução de vacas leiteiras traz inúmeros benefícios, incluindo melhora na qualidade de oócitos obtidos por aspiração de folículos ovarianos auxiliando no processo de reprodução *in vitro*, além de aumentar a eficiência na transferência de embriões (ALMEIDA et al., 2007).

3.3.1 Uso de Antioxidantes em Dietas para Bovinos

Animais que são expostos a dietas desequilibradas e períodos de estresse em virtude de altas temperaturas podem desenvolver problemas relacionados a reprodução, afetando a fertilidade. O estresse oxidativo, provocado por ERO pode provocar efeitos deletérios sobre as funções celulares no sistema reprodutor de fêmeas, afetando o processo de maturação dos oócitos até à gestação (AGARWAL et al., 2005).

As ERO são derivadas do oxigênio, são instáveis eletronicamente e apresentam pelo menos um elétron não compartilhado na camada de valência, dando a característica de reatividade, podendo atuar como agentes oxidantes e como agentes redutores, a depender do ganho ou da perda de elétrons. Dessa forma as ERO são formadas por radicais livres e não livres, sendo s principais o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a hidroxila (OH^-) (AGARWAL et al., 2005; SILVA et al., 2011; PHANIENDRA et al., 2015).

O efeito negativo das ERO ocorre quando há um aumento excessivo na sua produção ou quando há diminuição de agentes antioxidantes (PENA et al., 2009). Nas fêmeas, as ERO atuam em diferentes aspectos da fisiologia reprodutiva pois estão presentes nos ovários, nos ovidutos e nos embriões, como maturação dos oócitos, esteroidogênese, nas funções do corpo lúteo ovulação, desenvolvimento de embriões e induzir a apoptose (GUERIN et al., 2001; AGARWAL et al., 2005). Uma forma de manter, por exemplo, o desenvolvimento embrionário, é por meio da manutenção do equilíbrio de ERO, para que ocorra a adequada expressão gênica e metabólica (TAKAHASHI, 2012).

O equilíbrio ou a redução do efeito deletério de espécies reativas de oxigênio pode ser feita através do uso de antioxidantes. Os antioxidantes têm como principal função impedir a formação descontrolada de ERO ou mesmo inibir a reação com as estruturas biológicas, sendo capazes de converter ERO em água e oxigênio, evitando o aumento de concentração desses radicais e eventual estresse oxidativo (KHAN et al., 2019).

Andrade et al (2010), cita como os principais antioxidantes envolvidos na reprodução são: o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o ácido α -lipoico. Alguns antioxidantes podem ser utilizados no meio de cultivo na maturação *in*

vitro de oócitos para reduzir os efeitos das ERO como a quercetina e cisteamina (GUEMRA et al., 2013). A glutathione e melatonina podem ser utilizados na criopreservação do sêmen bovino (REITER et al., 2013).

O uso de antioxidantes é estudado nas etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos, sendo que estes auxiliam na qualidade e no aumento das taxas de produção de blastocistos, reduzindo o estresse oxidativo e o número de células apoptóticas no embrião (MORAIS, 2020).

O estresse oxidativo ocorre quando há uma mudança no equilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes, comumente relacionado ao aumento do desafio metabólico (BARBOSA et al., 2010). O resultante acúmulo de fatores oxidantes nas células gera estresse celular impactando o desenvolvimento folicular e oocitária, afetando negativamente vacas holandesas, especialmente aquelas de alta produção leiteira. Sabe-se que distúrbios na homeostasia do líquido folicular desencadeada pelo estresse oxidativo resulta em recrutamento e ovulação de oócitos de menor qualidade.

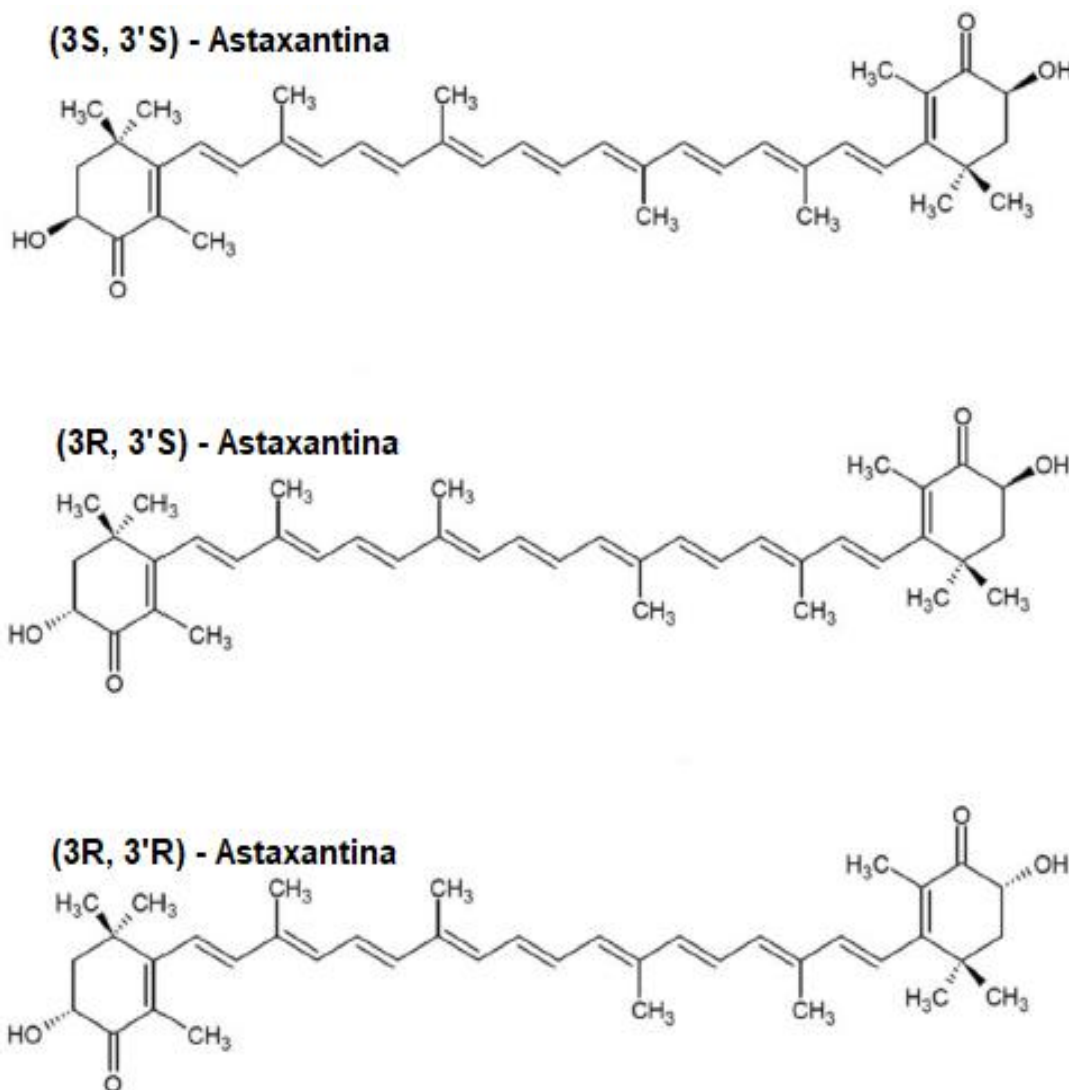
A suplementação da dieta por meio da ingestão de antioxidantes permite que ocorra a redução dos efeitos citotóxicos causados pelas espécies reativas de oxigênio. Ikeda et al. (2005) citam que o uso de betacaroteno é benéfico para a proteção contra os efeitos de citotoxicidade causados por ERO tanto em células foliculares quanto em oócitos.

3.3.1.1 Astaxantina

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β' -caroteno-4,4'-diona) é um carotenoide oxigenado que contém em sua estrutura um grupo hidroxil e uma cetona para cada uma de suas extremidades moleculares. A molécula possui dois carbonos assimétricos localizados nas posições 3 e 3' nos dois anéis de benzeno presentes nas extremidades da molécula. A união de grupos hidroxila a átomos de carbono, formam diferentes enantiômeros, essa formação está representada na Figura 1, em que os grupos hidroxila se unem no plano da molécula, ficando dessa forma na configuração R e quando os grupos hidroxila se unem sob o plano da molécula, eles estão na configuração S, os três enantiômeros possíveis são designados R, R'; S, S' e R, S' (meso) (CAMACHO KURMEN et al., 2013; YANG et al., 2013).

Os carotenoides compõem uma classe de mais de 600 pigmentos naturais que conferem coloração que varia do amarelo ao vermelho intenso. A astaxantina possui cor vermelho brilhante (AGHAJANPOUR et al., 2017). Este composto apresenta a capacidade química e física de inibir a atividade de ERO e conseqüentemente o estresse oxidativo. Possui atividade antioxidante, atuando no sequestro de radicais livres e inativação dos mesmos, com ação inibidora da peroxidação de lipídios e danos causados pela oxidação das membranas celulares e tecidos (FERREIRA et al., 2014; FIEDOR; BURDA, 2014; AHMADINEJAD et al., 2017).

Figura 1 - Fórmula estrutural da astaxantina



Fonte: Adaptado de Li et al. (2020).

O antioxidante astaxantina é amplamente utilizado em alimentos, pois os carotenoides não são sintetizados por animais, sendo seu uso categorizado como alimento funcional. Por atuar com função antioxidante dentro e fora das células do tecido, a astaxantina possui grande valor para a saúde humana e na nutrição animal (LI et al., 2020). A astaxantina possui várias propriedades bioativas benéficas, incluindo a prevenção de doenças cardiovasculares, a promoção de respostas imunológicas e ações antioxidantes (HUSSEIN et al., 2006).

Este composto também é utilizado na indústria de cosméticos e farmacêutica, além da aquicultura, pois confere coloração vermelha a alguns peixes, crustáceos, bem como em aves e micro-organismos (FERREIRA et al., 2014; SHAH et al., 2016).

A astaxantina pode ser obtida de fontes naturais ou sintéticas. As formas sintéticas não são aceitas na indústria de alimentos por conter resíduos que podem ser prejudiciais à saúde. Além disso, sua estabilidade e atividade antioxidante são menores do que as obtidas naturalmente, fomentando assim a cadeia produtiva desse composto (LIM et al., 2002).

De forma natural, pode-se obter o composto por meio de micro-organismos, como microalgas do gênero *Haematococcus*, de levedura como *Phaffia rhodozyma*, e o invertebrado *Euphausia superba* (Krill) (LIM et al., 2002). Uma das fontes de extração da astaxantina é a microalga *Haematococcus pluvialis*, que é capaz de sintetizar grandes quantidades de carotenoides quando fornecidas condições ambientais e de luminosidade adequadas (OKADA et al., 2009). Segundo Passinato et al (2012) cerca de 4% de toda astaxantina encontrada na natureza, é proveniente desta microalga.

O cultivo de *H. pluvialis* é realizado em tanques ou reatores, e por ser uma microalga de coloração verde deve passar por duas fases no processo de produção. A primeira fase é móvel verde em que o meio de cultivo está repleto de nutrientes o que fornece em condições favoráveis de crescimento; e a segunda não móvel de coloração vermelha, obtida através do esgotamento de nutrientes. O estresse nutricional, transforma as células vegetativas verdes em hematocisto, sendo então realizada a obtenção da astaxantina por meio de secagem em *spray dryer* ou liofilização (HAN et al., 2013; LI et al., 2020).

A produção de astaxantina de forma natural ou biológica tem como vantagens a alta atividade antioxidante, o baixo impacto ambiental, por ser sustentável, renovável e ecológica, bem como é segura para consumo humano. Como principal desvantagem está o custo de produção que é elevado, além de apresentar baixa vida útil da *H. pluvialis* e necessitar de sistema de cultivo complexo (KHOO et al., 2019).

Na produção animal, este composto é usado principalmente na composição da ração de galinhas poedeiras, com o objetivo de atribuir mais coloração a gema do ovo, o que atrai os consumidores e na ração de peixes para conferir cor à musculatura do pescado, principalmente em salmão (FERREIRA et al., 2014).

Estudos realizados indicam os benefícios da astaxantina na reprodução animal, melhorando a saúde reprodutiva. O uso da astaxantina já foi testado para

produção *in vitro* de embriões bovinos (JANG et al., 2010) em que houve promoção no desenvolvimento de embriões pela promoção dos efeitos antioxidante e redução em genes de apoptose em suínos (DO et al., 2013), no qual melhorou significativamente a maturação, fertilização e desenvolvimento do embrião.

O uso de antioxidantes em meios de cultivo tem como principal objetivo reduzir os efeitos deletérios causados pelas ERO. A reprodução *in vitro* possui restrições por si só, por exemplo, a taxa de blastocisto em meios de cultura simples varia de 20 a 40% na cultura de embriões bovinos (LONERGAN; FAIR, 2008). Os efeitos benéficos da astaxantina também estão relacionados a proteção contra os efeitos do calor em oócitos e embriões (MAYA-SORIANO et al. 2013). Quando o antioxidante é utilizado, as taxas de desenvolvimento são superiores, pois possuem efeito termoprotetor.

Ispada et al. (2018), avaliaram o efeito do uso da astaxantina na produção de oócitos e no desenvolvimento de oócitos. Nesse sentido, os autores observaram que a suplementação teve efeito protetor contra o choque térmico em oócitos e que doses de 12,5 e 25nM de astaxantina permitiram a redução nos níveis de ERO no desenvolvimento de oócitos.

3.4 IMPORTÂNCIA DAS BIOTÉCNICAS DE REPRODUÇÃO EM BOVINOS DE LEITE

A bovinocultura desenvolve constantemente técnicas de obtenção de embriões para a produção *in vivo* e *in vitro*, essas técnicas aumentam a eficiência dos rebanhos e auxiliam no processo de melhoramento animal (OLIVEIRA et al., 2014). Os objetivos de técnicas como inseminação artificial, transferência de embriões e produção *in vitro* é maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas bovinas e melhorar os indicadores de produtividade (MELO et al., 2016).

A produção *in vitro* é considerada a terceira geração de biotécnicas aplicadas ao melhoramento de animais, sendo a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) as duas primeiras (MARIANO et al., 2015).

Desde os anos de 1980, a PIV é realizada em bovinos em que se observou essa técnica poderia ser totalmente realizada sob condições artificiais e ano após ano ocorre a expansão e aprimoramento dessa técnica (GONÇALVES et al., 2008). O

grande diferencial dessa técnica é que ela permite que os embriões obtidos podem ser distribuídos em todas as partes do país, até nas mais longínquas, o que permite que o rebanho possua alta qualidade tanto na produção de leite como na produção de carne (ABCZ, 2014).

Da mesma forma que a técnica de PIV permite a distribuição a longas distâncias dentro do território brasileiro, o tempo que leva para ocorrer a distribuição interfere na viabilidade dos embriões, e conseqüentemente, nas taxas de gestação (MARINHO et al., 2012).

A produção *in vitro* (PIV) tem sido utilizada em escala comercial no Brasil e no mundo e promove a interação entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo. Essa técnica permite a produção de embriões de qualidade e que auxiliam na melhoria do potencial reprodutivo de fêmeas e machos dentro de programas de melhoramento genético (GONÇALVES et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2013).

Os objetivos da PIV são: obter embriões viáveis a partir de fêmeas saudáveis de alto valor genético; determinar o sexo dos embriões; aumento da eficiência dos programas de reprodução; facilitar a importação e exportação de material genético da fêmea, formar de bancos de gametas congelados, aumentar a eficiência do sêmen congelado de alto valor (GONÇALVES et al., 2008).

Como vantagens, o processo permite que fêmeas a partir dos seis meses já possam ser utilizadas como doadoras de oócitos, não há necessidade do uso de hormônios para a recuperação dos oócitos e permite o uso de sêmen sexado, por exemplo (MELO et al., 2016). O processo envolve as etapas de coleta e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias, esses processos substituem o que ocorreria *in vivo* (GONÇALVES et al., 2008).

O primeiro passo para a PIV de bovinos inicia com a obtenção de oócitos pode ser realizada de duas formas, *post mortem* ou *in vivo*. No *post mortem*, em que os oócitos são obtidos a partir da punção folicular de animais abatidos ou de alto valor genético que venham a óbito, já no *in vivo*, a obtenção é realizada por meio de laparotomia ou laparoscopia ou pela aspiração folicular guiada por ultrassom (VARAGO et al., 2008).

A aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick up* - OPU) é uma técnica não invasiva de recuperação de oócitos de fêmeas vivas, largamente utilizada em bovinos. A OPU interfere na quantidade e morfologia do complexo cumulus-oócito (CCO) recuperado, e conseqüentemente, na competência para o desenvolvimento *in vitro* (PONTES et al., 2011; STROUD; CALLESEN, 2012).

O CCO é o oócito dentro do folículo, recoberto de células da granulosa. Os oócitos produzem substâncias reguladoras que participam do seu crescimento e maturação, esses podem ser classificados em viáveis, quando o oócito apresenta citoplasma homogêneo com uma ou mais camadas de células de cúmulos, sendo divididos em grau I, II e III, conforme o número de camadas; desnudo, e que a camada de cúmulos é ausente ou incompleta; degenerado, com citoplasma heterogêneo independentemente do número de camadas; e atrésico, com células de cúmulos já expandida (GONÇALVES et al., 2008).

Como vantagem a técnica possibilita a rápida reprodução, já que pode ser realizada a cada 15 dias resultando em média a três gestações por procedimento (GRAFF et al., 1999; PONTES et al., 2011). A aspiração pode ser feita a partir dos seis meses de idade da fêmea, além de animais com prenhez até o terceiro mês e após duas a três semanas do parto (HASLER et al., 1995), permitindo assim, que ocorra um número maior de gestações em fêmeas de alto potencial genético (BALDASSARE et al., 1996).

Outras vantagens em relação ao uso da OPU é que a técnica pode ser utilizada em animais de alto valor genético que não correspondem a outros tratamentos de coleta de embrião, essa técnica consiste na coleta de oócitos que na maior parte das vezes sofreriam atresia ainda na fase de recrutamento. É possível realizar a coleta em animais inférteis cuja causa deriva de patologias no trato reprodutivo (BOLS et al., 2012).

As características morfológicas como diâmetro do folículo de origem e a integridade das células do cumulus sugerem a qualidade do oócito e influenciam a competência oocitária (SIRARD, 2017).

O próximo passo é realizar a maturação *in vitro*. Nesse processo o oócito torna-se capaz de fecundado posteriormente, desde que a coleta seja feita de maneira adequada e que sejam utilizados meios de maturação que permitam essa capacidade.

A maturação de oócitos ocorre após mudanças estruturais e bioquímicas permitem que o gameta feminino seja fecundado (SILVA et al., 2017).

Com a maturação ocorre a ruptura da vesícula germinativa (VG) por meio da modificação do núcleo com a condensação da cromatina e a dissolução da membrana nuclear (PALMA, 2001). Passando assim para o processo de fertilização *in vitro*.

A fertilização *in vitro* (FIV) é utilizada para a multiplicação rápida dos rebanhos, principalmente no que diz respeito a animais de interesse e valor zootécnicos superiores de fêmeas (PONTES et al., 2011).

A fecundação é realizada no dia zero (D0), para que os oócitos sejam capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto e ocorre por meio da penetração do espermatozoide nas diferentes capas celulares e não celulares que rodeiam o oócitos formando pró-núcleos (PALMA, 2001; GONÇALVES et al, 2007).

No cultivo *in vitro*, que ocorre 24 horas após o oócitos ter sido fecundado, ocorre o desnudamento que consiste na remoção de células do cumulus, em que ocorre a lavagem com meio de cultivo e transferidos para placas de Petry em que permanecem por um período de sete dias (SILVA et al., 2017).

Durante o período de sete dias ocorrem avaliações de taxa de clivagem (D3) que é a contagem de zigotos que se desenvolveram até o estágio de quatro células. No quinto dia (D5) ocorre a troca do meio de cultivo, assim como ocorre no D3. No sétimo dia após a fecundação, ocorre o envasamento para transferência, congelados ou vitrificação (SILVA et al., 2017).

No D7 também ocorre a classificação dos embriões como mórula e blastocisto, sendo esse dividido em inicial, evidente, expandido e eclodido, sendo necessário que o embrião esteja no estágio de blastocisto para serem considerados aptos para as próximas etapas (GALLI et al., 2003). Quando fecundados *in vitro*, a taxa de blastocisto, prenhez e criopreservação obtidas de oócitos maturados e fecundados *in vitro* são reduzidos em relação ao *in vivo* (RIZOS et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos utilizados neste experimento foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, presentes no protocolo CEUA 2019-29, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, Brasil (CEUA-UTFPR).

4.1 LOCAL E ANIMAIS

Para o presente estudo foram utilizadas vacas holandesas de uma propriedade comercial localizada no município de Verê, na Região Sudoeste do Paraná (latitude de 25° 53' 1" Sul e Longitude de 52° 55' 11" Oeste). A altitude média do local é de 514 metros. O município apresenta clima subtropical úmido mesotérmico, classificado como Cfa (ALVARES, 2013).

A fazenda comercial conta com um rebanho de 370 fêmeas, com 210 em lactação, sendo todos da raça holandesa com uma produção média aproximada de 40 litros de leite por vaca por dia no inverno e 36 litros por vaca por dia no verão. A fazenda adota o sistema de confinamento *Compost Barn* para o alojamento das vacas em lactação e sistema semiextensivo para recria.

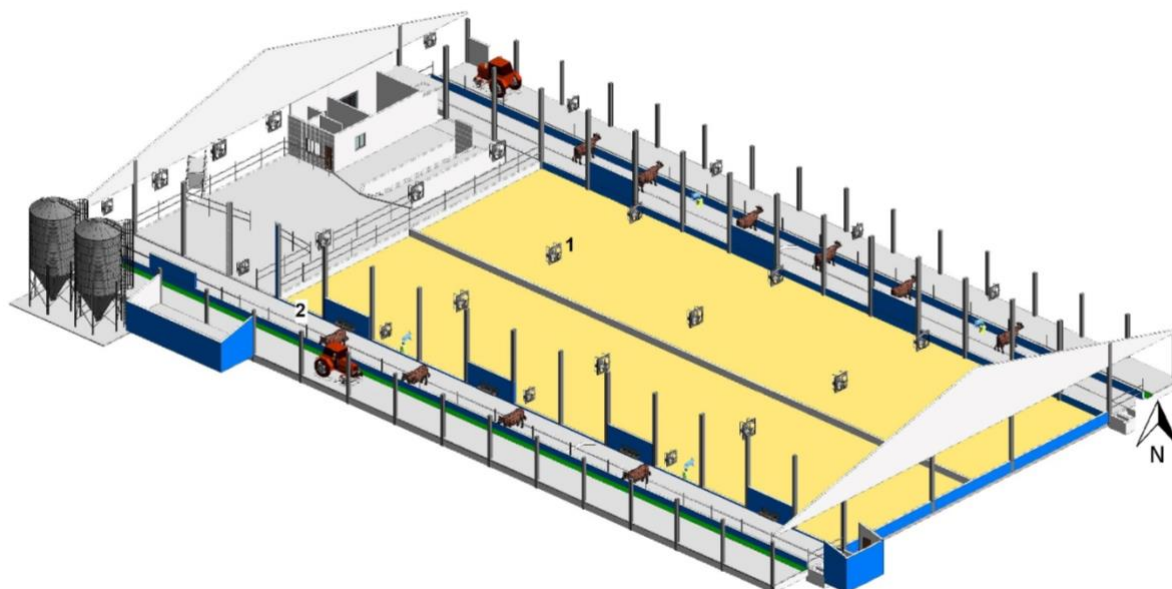
Os animais selecionados na propriedade para o estudo foram alocados em apenas um lote único durante todo o período experimental, chamado de lote 1. Para estes animais foi fornecida dieta a base de silagem de milho (52%), pré-secado de azevém (12%), ração comercial Primato 22% (19%), núcleo mineral extra plus DSM (0,7%), farelo de soja Alfa 46% (5%), milho moído (3%), gordura de palma Vaccinar (0,4%), carroço de algodão (4,4%) e bicarbonato de sódio (0,5%).

A fazenda adota três ordenhas diárias alocando as vacas em 5 lotes (lote 1; lote 2; primíparas, vacas seca e pré-parto) de acordo com seu status produtivo. Cada lote da fazenda recebe uma dieta balanceada que supre suas exigências conforme recomendações do National Research Council (NRC, 2001). Todos os lotes e a sala de espera da fazenda foram projetados para oferecer aos animais o melhor manejo e visando o bem-estar, com dimensionamento do sistema de resfriamento e bebedouros

de água (acesso *ad libitum*) que atenda e garanta a necessidade de todos os animais do lote.

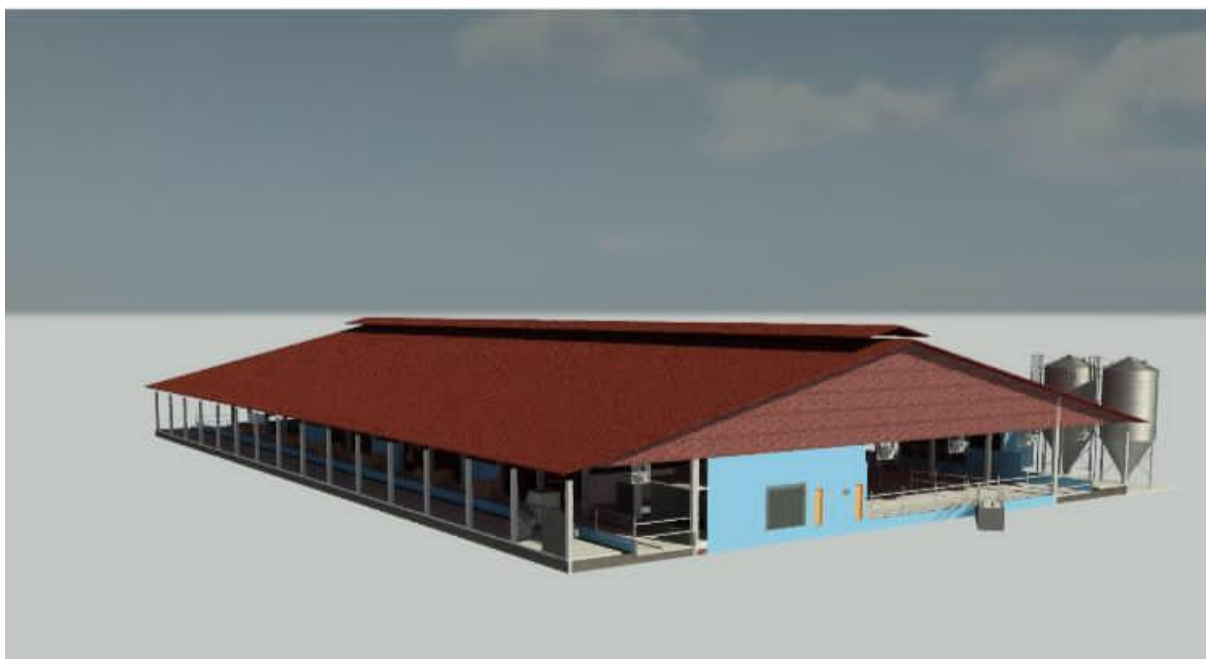
O sistema de confinamento *Compost Barn* foi construído em barracão de estrutura metálica com intuito de alojar vacas de alta produção e proporcionar bem-estar (Figuras 2 e 3). A estrutura possui 5500 m² de estrutura construída sendo que 3000 m² área de cama. Com pé direito lateral de 3,5 m de altura, a estrutura ainda conta com um segundo pé direito com 6,5 m fechando no lanternim com 13,5 m de altura da cama com uma abertura de 1,4 m. A climatização é feita com 36 ventiladores e três linhas de aspersão (pista de alimentação e sala de espera) para minimizar os efeitos do verão no rebanho da propriedade. Nas linhas de cocho são 7 ventiladores 6 pas 8X18 modelo DF1250 Dellaval 1,5cv alta rotação, na cama, a climatização é feita com 4 linhas de 3 ventiladores 3 pas modelo DCF78 Dellaval 1,5cv. A sala de espera e sala de ordenha contam com outros 10 ventiladores iguais os da linha de cocho para climatizar o ambiente durante as ordenhas.

Figura 2 – Croqui da instalação de confinamento de vacas leiteiras no sistema *Compost Barn*



Legenda: 1 – Ventilador; 2 – Linhas de aspersão
Fonte: Autoria própria

Figura 3 – Vista externa da instalação de confinamento de vacas leiteiras no sistema *Compost Barn*



Fonte: Autoria própria

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento de suplementação foi realizado em vacas holandesas em lactação ($n=45$); com peso corporal de aproximadamente 550 kg, primíparas e pluríparas, com quatro a oito anos de idade, com média de 2,6 lactações e 203 dias em leite (DEL) médio no início do experimento. A média de produção de leite por vaca por dia no início do experimento foi de 36 litros.

Os animais foram alocados aleatoriamente em três grupos experimentais ($n=15$ por grupo) visando uma constância e uniformidade padrão em cada grupo, sendo considerados o desempenho dos animais por meio de indicadores como: dias em leite (DEL), número de lactações, peso, idade, produção de leite e status reprodutivo.

Foram testadas duas doses do antioxidante astaxantina, 0,25 mg (grupo astaxantina baixa) ou 0,50 mg (grupo astaxantina alta) por kg de peso vivo por dia, via oral, além do grupo controle em que foram utilizados animais do mesmo lote sem nenhum tipo de suplementação. As doses foram administradas durante 75 dias no

verão (janeiro-março de 2020), por meio de cápsulas manipuladas de 1,5 cm x 5 mm de diâmetro disponibilizada de forma íntegra, garantindo assim o consumo das dosagens propostas pelo estudo. A astaxantina não apresenta nenhum tipo de reação adversa quando administrada nas dosagens propostas (KUMAR; SINGH, 2019).

Cada grupo foi identificado por brinco na orelha esquerda. O grupo controle foi identificado pela cor branca, o grupo astaxantina baixa (0,25 mg kg⁻¹ dia⁻¹) recebeu brinco da cor laranja e o grupo astaxantina alta (0,50 mg kg⁻¹ dia⁻¹) recebeu brinco na cor vermelha, conforme o Quadro 1.

Quadro 1 - Grupos experimentais. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.

Grupos	Nº lactações	Nº animais	DEL*	Prod. Leite (L)
Controle	1º	5	201	34
	2º	6	220	36
	3 ou mais	4	201	37
Astaxantina baixa(0,25 mg)	1º	5	244	33
	2º	5	215	37
	3 ou mais	5	179	38
Astaxantina alta (0,50 mg)	1º	5	203	34
	2º	6	156	36
	3 ou mais	4	211	39

*DEL: dias em lactação.

Fonte: A autoria própria

A astaxantina fornecida foi um isômero de astaxantina 3S proveniente da microalga *Haematococcus pluvialis* manipulada em cápsulas pelo Laboratório de Manipulação Fórmula Ativa.

4.3 PARÂMETROS AVALIADOS

4.3.1 Dados Microclimáticos

Para caracterizar o microclima aos quais os animais foram expostos durante o período de suplementação, as variáveis temperatura do ar (TAR, °C) e umidade relativa do ar (UR, %) foram obtidas diariamente de janeiro a março pela instalação de dois aparelhos do tipo *data logger* (AKSO-AK172), com leituras realizadas a cada

10 minutos. Tais dados foram utilizados para o cálculo do índice de temperatura e umidade do ar (ITU) através da fórmula descrita por Berman et al. (2016).

$$ITU = 3,43 + 1,058 \times Tbs - 0,293 \times UR + 0,0164 \times Tbs \times UR + 35,7$$

Em que:

Tbs: temperatura do bulbo seco;

Tbu: Temperatura do bulbo úmido;

Tpo: Temperatura do ponto de orvalho;

UR: umidade relativa do ar.

O índice descrito por Berman et al. (2016) considera a interação existente entre a temperatura e umidade (*Tbs* x *UR*), de forma a indicar o potencial impacto dessas variáveis na termorregulação dos bovinos.

4.3.2 Variáveis fisiológicas

Com o objetivo de contribuir com a caracterização do microclima foi realizada a cada 14 dias a aferição das seguintes variáveis fisiológicas: temperatura cutânea (TC), temperatura retal (TR), frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) foram coletados a partir do início da suplementação para a determinação do perfil fisiológico dos animais do estudo, totalizando seis coletas na estação verão.

A temperatura cutânea foi determinada por meio de termômetro infravermelho em cinco pontos da superfície do animal: garupa, costela, lombo, paleta e pescoço.

A temperatura retal foi determinada com auxílio de termômetro de mercúrio inserido junto à parede do reto do animal por um minuto.

A frequência cardíaca foi determinada por auscultação utilizando estetoscópio e cronômetro por um período de 30 segundos, sendo o resultado posteriormente multiplicado por dois e o valor obtido expresso em número de batimentos por minuto.

A frequência respiratória é expressa em número de movimentos respiratórios por minuto, e foi determinada a partir da observação dos movimentos do flanco por 1 min.

4.3.3 *Ovum pick-up*

A aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU, do inglês *ovum pick-up*) foi realizada de forma estratégica em congruência com o delineamento experimental. Foram três sessões de OPU iniciando aproximadamente quinze dias após o término da suplementação e respeitando o intervalo mínimo de quinze dias entre cada sessão.

A aspiração folicular foi realizada por profissional capacitado com mais de dez anos de experiência, utilizando aparelho de ultrassom Mindray DP 2200 com probe microconvexa Mindray acoplada sob a guia de aspiração (WTA) para bovinos. Foi utilizado sistema de pressão negativa para a colheita dos oócitos por bomba de vácuo, da marca WTA (modelo BV-003D) com controle de temperatura digital ligados a rolha (WTA) acoplada em tubo Falcon de 50 mL. A cada animal aspirado todo o sistema era substituído. Para OPU o meio utilizado foi a solução fosfato tamponada modificada por Dulbecco (DMPBS-FLUSH - Nutricell) junto de 100 UI de heparina sódica suína diluída no meio.

4.3.4 Análise da Morfologia Oocitária

4.3.4.1 Classificação dos oócitos

Esse procedimento foi realizado ao término de cada sessão de aspiração folicular. Todos os oócitos foram avaliados e classificados de acordo com sua morfologia. Foram utilizados meios prontos comerciais (Botupharma, Botucatu, SP) para produção *in vitro* de embriões desde manipulação, maturação, fecundação e no cultivo *in vitro*.

Após a aspiração dos oócitos dos ovários das doadoras de cada grupo (controle, astaxantina baixa e astaxantina alta), estes foram lavados com meio solução fosfato tamponada modificada por Dulbecco (DPBS - Nutricell) com auxílio de um filtro de coleta (WTA) com o objetivo de clarear o líquido e facilitar sua visualização. Em seguida os oócitos foram colocados em placa de Petri de 60 mm e classificados em Grau I: oócitos recobertos por células do cúmulus compactas com mais de três camadas de células; Grau II: menos de três camadas de células do cumulus envoltas

no oócito; Grau III: apenas uma camada de células do cumulus, nessa classificação o citoplasma do oócito também é avaliado conforme sua homogeneidade. Ao término da classificação, os oócitos foram acondicionados em meio de lavagem aquecido a 36 °C e permaneceram até o fim da seleção. Ao final das aspirações, foi realizada a soma total dos oócitos aspirados e definida a divisão dos oócitos destinados para a fertilização *in vitro* (FIV).

4.3.4.2 Produção *in vitro* de embriões – teste de competência oocitária

Posteriormente a essa classificação os oócitos foram acondicionados independente de sua classificação em criotubo (Corning) de 2 mL com meio de maturação. Os oócitos destinados a FIV foram lavados em 2 gotas com 50 uL de meio de lavagem, 1 gota de 50 uL meio de maturação e transferidos para criotubos com 500 µL de meio de maturação, em seguida passou uma mistura de gás especial contendo 90% N₂ (v/v), 5% O₂ (v/v) e 5% CO₂ (v/v) por 30 segundos em cada criotubo e armazenados em um transportador de oócitos a uma temperatura de 38 °C e encaminhados ao laboratório. Os criotubos foram transportados em equipamento transportador de oócitos WTA TREO até o laboratório de fertilização *in vitro* Fertiliza Embryo LTDA de Chapecó – Santa Catarina para serem submetidos à fertilização *in vitro*. No laboratório, os oócitos foram transferidos para uma placa de Petri de 35 mm com 70 uL de meio de maturação imerso em óleo mineral, utilizando uma placa para cada grupo (controle, baixa e alta astaxantina) onde os oócitos foram distribuídos em gotas contendo no máximo 30 estruturas por gota. A maturação *in vitro* teve duração de 24 horas em estufa a 38,5 °C com controle automático de 5% CO₂ (v/v) e umidade saturada.

Após a maturação de 24 horas foi realizada a fertilização, quando os oócitos foram lavados em uma gota de 50 uL de meio de fertilização (FIV) e transferidos para uma nova placa de Petri de 35 mm com 50 uL de meio FIV imerso em óleo mineral. Foi utilizado sêmen sexado do touro holandês Caleb para todos os grupos, sendo a dose descongelada em água a 37 °C e posteriormente foi realizada a técnica de separação por gradiente de Percoll em centrifuga de Eppendorf®. Os espermatozoides foram avaliados quanto à motilidade espermática através de microscópio e utilizado

3,0 uL por gota de cada grupo. Em seguida a placa foi armazenada em incubadora a 38,5 °C com controle automático de 5% CO₂ (v/v) e umidade saturada.

O cultivo foi realizado após 18 horas da fertilização, quando os oócitos foram lavados em 4 gotas de 50 uL de meio de cultivo, até que as células somáticas fossem totalmente removidas com auxílio de pipetas. Em seguida, os oócitos foram transferidos para placas de Petri de 35 mm com 70 uL de meio de cultivo imerso em óleo mineral e levados a estufa onde permaneceram até o dia de avaliação da taxa de clivagem (D3, sendo o dia da fertilização *in vitro* considerado D0). No D7 foi avaliada a quantidade de embriões e estes foram observados até D10 para observação da porcentagem de eclosão.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados climáticos e fisiológicos foi utilizada uma análise descritiva, com a elaboração dos gráficos por meio do Programa R, para as variáveis TAR, UR e ITU.

Para as variáveis dependentes frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura cutânea e temperatura retal os dados foram submetidas ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias antes de serem analisados por ANOVA de duas vias, considerando o fatorial 3 x 5 (doses de astaxantina x tempo). Para comparação entre os grupos foi utilizando o pós-teste de Tukey com um nível de significância de 5%. Dados que não apresentaram normalidade foram transformados utilizando a função raiz quadrada e submetidos à ANOVA de duas vias. Dados que mesmo após transformação não atenderam às premissas para análise de variância foram analisados utilizando o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para comparação entre grupos, também utilizando um nível de significância de 5%. A análise estatística e a confecção dos gráficos foram realizadas com auxílio do software Prism GraphPad versão 7.0 para MacOS.

As variáveis dependentes oócitos totais, oócitos viáveis, taxa de clivagem (embriões clivados/ oócitos totais), taxa de blastocistos (blastocistos/ oócitos totais), taxa de desenvolvimento (blastocistos/ embriões clivados) e taxa de eclosão (embriões clivados/ oócitos totais) foram testadas quanto à normalidade dos resíduos

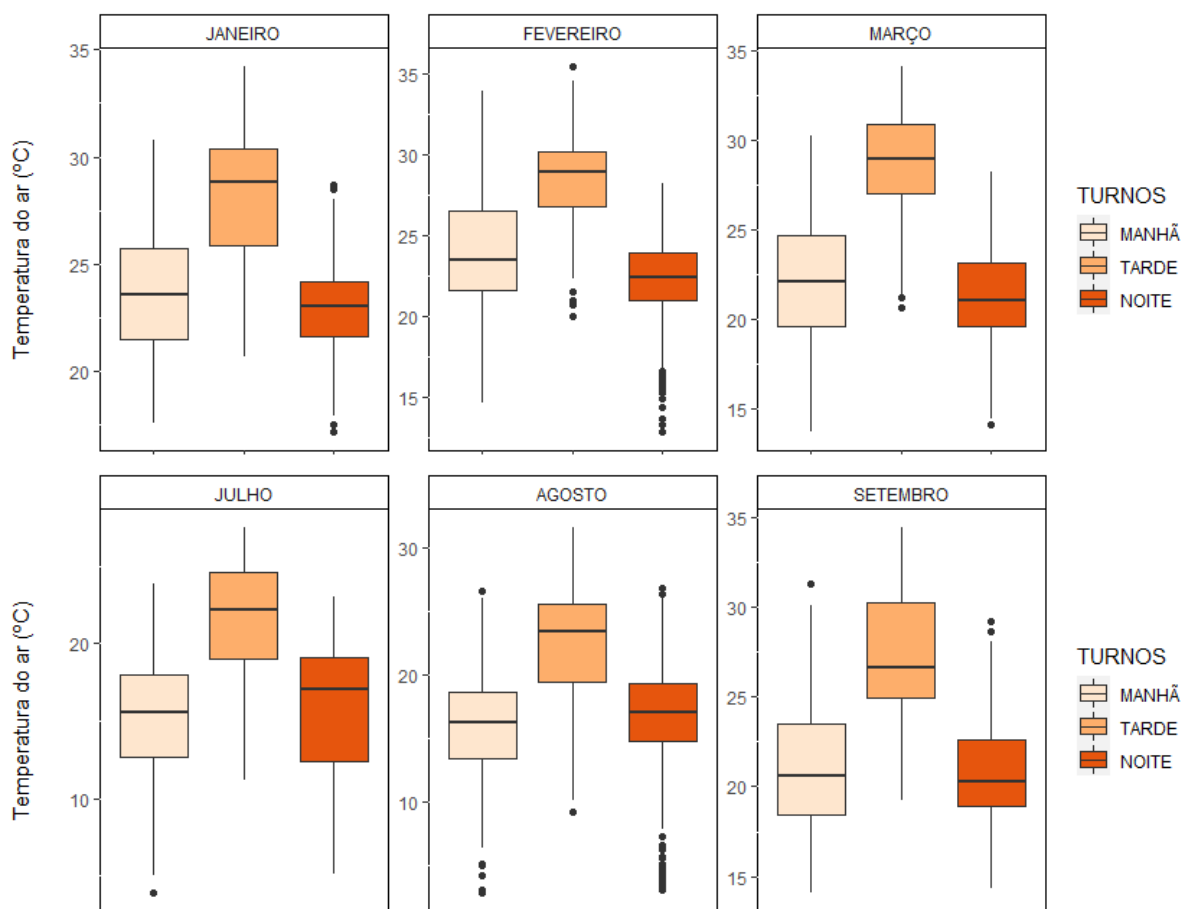
(teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste F máx) e transformados pela função raiz quadrada quando as premissas da ANOVA não foram atendidas. ANOVA unilateral (dados de desenvolvimento embrionário) ou ANOVA de medidas repetidas bidirecional (qualidade do oócito) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foram realizados usando GraphPad Prism com nível de significância de 5%. Foram consideradas variáveis independentes: dose de astaxantina e data da OPU. Foram verificados efeitos individuais e interação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DO MICROCLIMA

A manutenção de temperaturas amenas que favorecem o bem-estar animal pode ser feita por meio da utilização de estruturas de confinamento que visam o conforto dos animais principalmente no verão. Um exemplo de tal sistema é o *Compost Barn*, que possui, entre outros atributos, ventiladores que são utilizados na circulação de ar, retirando a umidade e o excesso de calor do ambiente, mantendo o ambiente agradável para os animais (ENDRES; BARBERG, 2007). Assim, os dados microclimáticos foram obtidos e calculados com o objetivo de verificar as condições do ambiente da instalação em modelo *Compost Barn* e se esta condição contribui para o conforto animal de vacas leiteiras durante o verão. As variáveis temperatura do ar (TAR), umidade relativa (UR) e índice de temperatura e umidade do ar (ITU) foram determinados nos meses de janeiro a março de 2020 (verão) e de julho a setembro (inverno). Na Figura 4, constam os dados de temperatura do ar determinadas no verão e inverno. A maior variação na temperatura do ar observada no verão foi de 21,48 °C a 28,78 °C, sendo essas temperaturas registradas em março, nos períodos da noite e da tarde, respectivamente. Assim, a amplitude térmica máxima observada entre a média da temperatura máxima e mínima registrada no verão foi de 7,3 °C. No verão, a temperatura média não ultrapassou 29 °C no período da tarde que foi o mais quente em ambas as estações. Já no inverno a temperatura máxima a qual os animais foram expostos foi de 27,10 °C, no mês de setembro, mês este em que as temperaturas do ambiente já começam a ficar mais elevadas. A mínima registrada no período foi de 15,32 °C pela manhã no mês de julho.

Figura 4 - Temperatura do ar (TAR) nos períodos de verão e inverno. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.



Fonte: o Autor (2021).

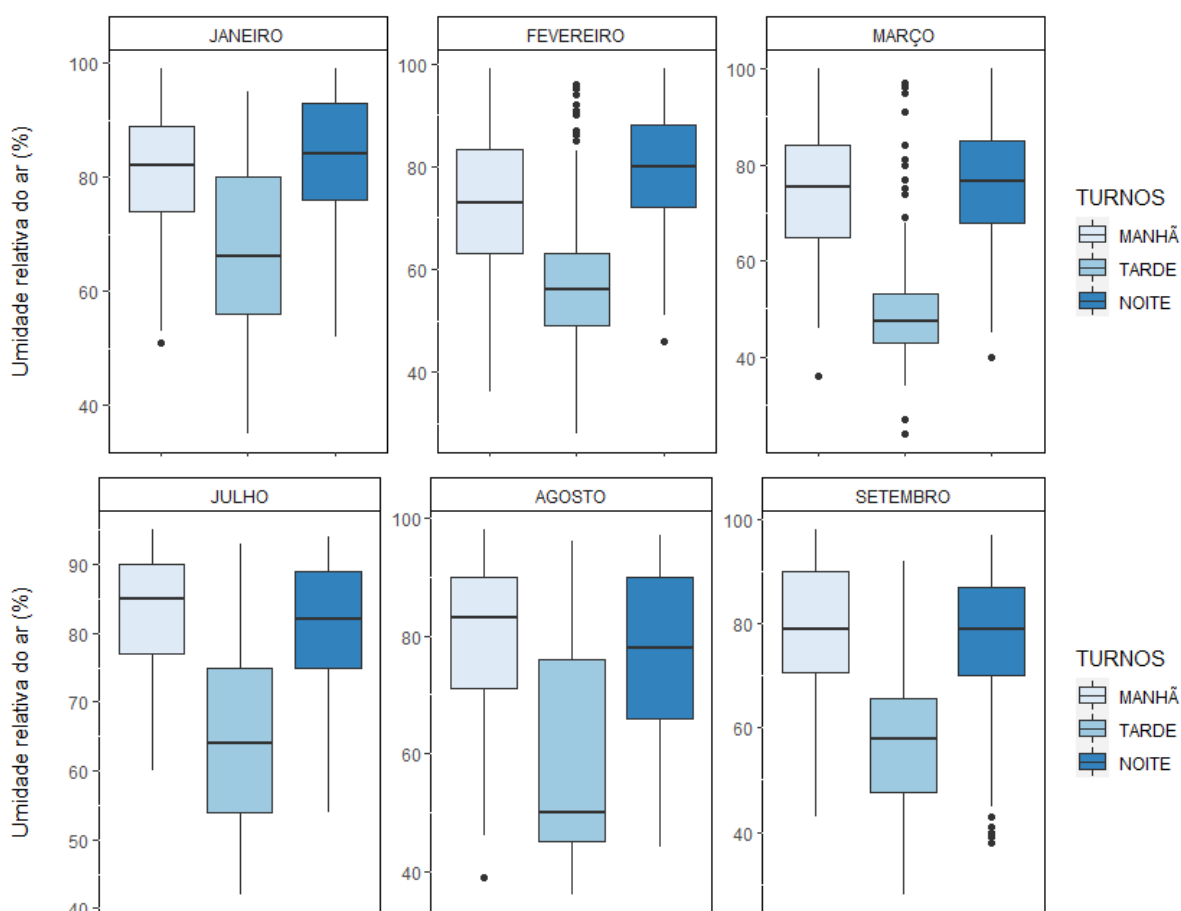
As temperaturas observadas estão acima do que é considerado ideal para bovinos de leite da raça holandesa, já que estas têm seu bem-estar promovido em temperaturas mais amenas. Temperaturas mais amenas contribuem para o conforto térmico dos animais, sendo que para vacas holandesas, temperaturas entre 10 e 20 °C são ideais (AZEVEDO; ALVES, 2009). As altas temperaturas observadas em regiões de clima subtropical úmido (ALVARES, 2013) tendem a comprometer o rendimento dos animais nas estações mais quentes o que leva à elevação da temperatura corporal e afeta o rendimento do animal ou a sua saúde, principalmente quando esse período de exposição é prolongado.

Ao aumentar a temperatura do ambiente, os animais reduzem a produção de calor via metabolismo basal, o que leva a redução no consumo de alimentos e alteração das atividades metabólicas que interferem na produção de leite e

reprodução (SILVA et al., 2012).

A umidade relativa (Figura 5) tendeu a apresentar valores mais baixos no período da tarde em ambas as estações, sendo que quanto maior a temperatura do ar, menor a umidade relativa do ar observada.

Figura 5 - Umidade relativa (UR) nos períodos de verão e inverno. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.



Fonte: Autoria própria

No verão, a umidade relativa é maior no período da noite, porém não varia muito em relação ao período da manhã. O verão apresentou grande número de dados com valores discrepantes, principalmente para umidades mais elevadas (Figura 5; Apêndice A).

A umidade relativa (UR) do ar variou de 51,39 a 83,53%, no verão com variação de 32,14% entre a umidade relativa máxima e mínima, sendo o mês de março o mês com a menor UR observada. No inverno, o mês de julho teve a média de

76,27%, sendo a maior média para a estação em relação a UR, enquanto em agosto e setembro as médias foram entre 71,80 e 71,08%. O período da tarde apresentou os menores valores de umidade para todos os meses avaliados (Figura 5; Apêndice A).

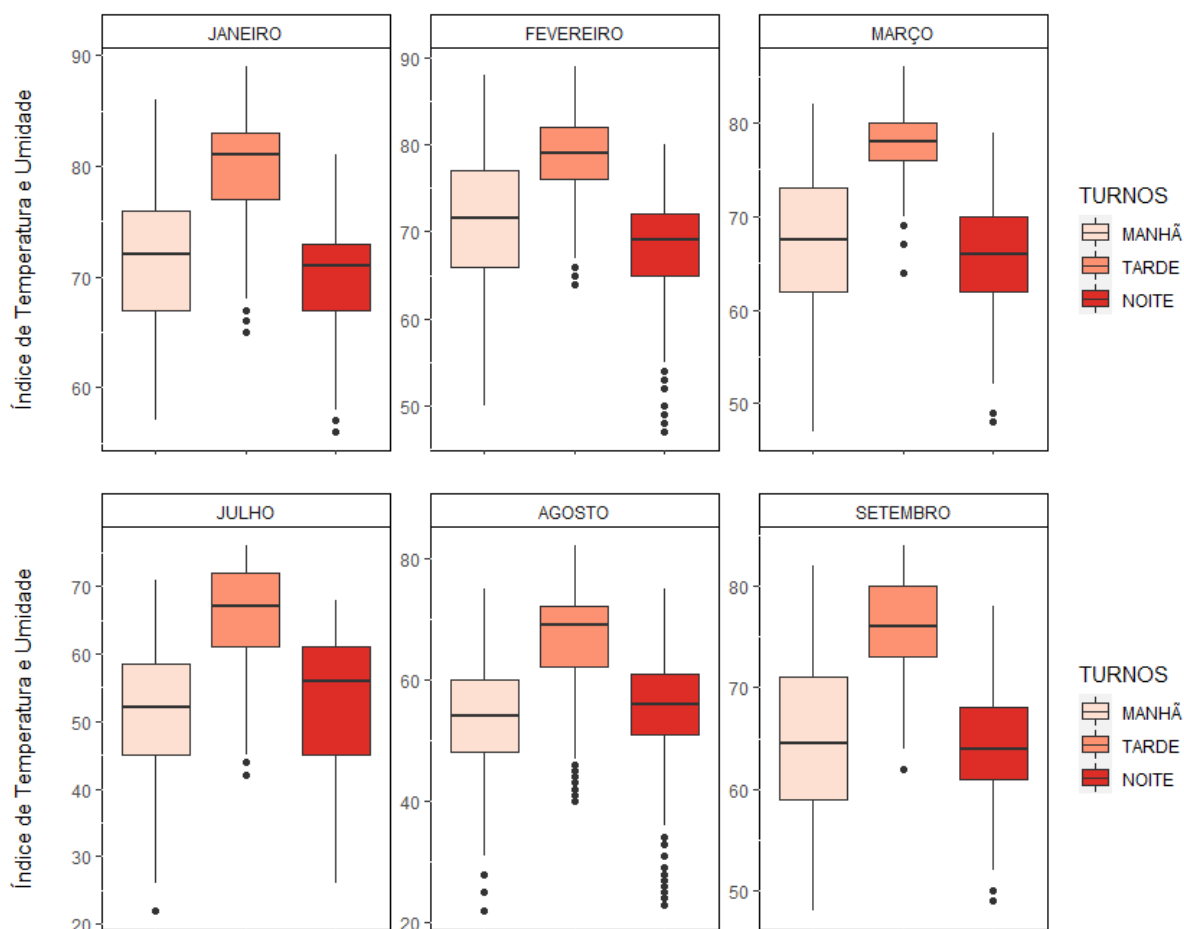
Quando a temperatura do ar elevada é associada à umidade, observa-se intensificação dos efeitos da temperatura que levam à hipertermia, causando desconforto para o animal, reduzindo a capacidade que este tem de dissipar calor (COLLIER et al., 2017). O aumento do estresse afeta negativamente a reprodução de vacas leiteiras, pois pode, por exemplo, comprometer a quantidade e a qualidade dos óocitos, bem como de embriões, causando diminuição dos índices de gestação (AL-KATANANI et al., 1999; PEREIRA et al., 2017).

A umidade contribui para a redução da troca de calor do animal com o ambiente, pois a evaporação é uma das formas que o animal utiliza para perder calor através da sudorese ou respiração (PERANO et al., 2015). Por este motivo o uso de ventiladores permite que ocorra a estabilização dessa troca, dessa forma é possível descrever os efeitos do ambiente em relação a habilidade que os animais possuem em dissipar calor (WEST, 1999).

O índice de temperatura e umidade (Figura 6) indica que para ambas as estações o período da tarde apresentou os valores mais altos. Essa tendência é esperada tendo em vista que a tarde é o período mais quente do dia, e a variável temperatura tem grande relevância para cálculo do índice.

Para verificar os pontos críticos do índice em relação ao bem-estar animal, Thom (1959) classificou valores abaixo de 70 como confortáveis para o animal, de 70 a 74 como desconfortáveis, de 75 a 79 como muito desconfortáveis e acima de 80 como seriamente desconfortáveis.

Figura 6 - Índice de temperatura e umidade do ar (ITU) nos períodos de verão e inverno. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.



Fonte: Autoria própria

O ITU no verão (Figura 6) variou entre 79,95 no período da tarde no mês de janeiro a 65,92 no período da noite no mês de março. Dessa forma, os dados médios obtidos no verão indicam que, para o mês de janeiro, os animais estiveram expostos a condições de muito desconforto, principalmente no período da tarde evoluindo para desconfortáveis nos demais períodos. Isso foi observado mesmo em um ambiente idealizado para oferecer melhor conforto térmico e, portanto, maior bem-estar animal. A mesma classificação pode ser atribuída para os meses de fevereiro em março em relação ao período da tarde.

No inverno, os índices calculados foram menores, variando entre 51,61 e 64,68 no mês de julho, em que os animais permanecem em conforto térmico considerado confortável, da mesma forma que para o mês de agosto. Apenas o mês de setembro em que naturalmente ocorre a elevação da temperatura os animais

passaram para a condição de muito desconfortável. Entre os três meses, a amplitude do ITU foi de 24,05, maior em relação ao verão (14,30), em que a temperatura foi uma variável utilizada para o cálculo que variou menos.

A caracterização do ambiente ao qual os animais estão inseridos auxilia no processo de manejo, bem com a oferecer ao animal condições de desenvolvimento e reprodução.

5.2 VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS

Variáveis fisiológicas como as frequências cardíaca e respiratória e a temperatura corporal são utilizadas para verificar a adaptação dos bovinos e diagnosticar ambientes de alta temperatura. Dessa forma o acompanhamento de tais parâmetros é essencial para a manutenção do bem-estar de vacas leiteiras (CARDOSO et al., 2015; PILATTI, VIEIRA, 2017).

A avaliação da temperatura cutânea não demonstrou efeito significativo da dose de astaxantina administrada aos animais ($p=0,7513$). Contudo, foi observado efeito de tempo de suplementação ($p<0,0001$) e interação astaxantina x tempo de suplementação ($p=0,0001$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Temperatura superficial da pele (média \pm EPM) ($^{\circ}\text{C}$) em relação ao tempo de suplementação com duas doses de astaxantina (0,25 ou 0,50 mg kg^{-1} dia^{-1}) e controle. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.

	Tempo de Suplementação (dias)				
	14	28	42	56	70
Controle	33,25 \pm 0,32 ^{aA}	32,57 \pm 0,57 ^{aA}	32,30 \pm 0,19 ^{aA}	33,60 \pm 0,18 ^{aA}	33,60 \pm 0,44 ^{aA}
0,25	33,22 \pm 0,24 ^{aA}	32,41 \pm 0,27 ^{aA}	32,63 \pm 0,22 ^{aA}	33,56 \pm 0,27 ^{aA}	33,56 \pm 0,40 ^{aA}
0,50	34,14 \pm 0,27 ^{bA}	32,80 \pm 0,63 ^{abA}	32,23 \pm 0,31 ^{aA}	33,50 \pm 0,50 ^{abA}	33,50 \pm 0,31 ^{abA}

Efeito de Tempo ($p<0,0001$); Interação Astaxantina x Tempo ($p=0,0001$)

Letras minúsculas sobrescritas representam diferença estatística entre colunas (tempo de suplementação); letras maiúsculas sobrescritas representam diferença estatística entre linhas (dose de astaxantina).

Fonte: A autoria própria

Para o grupo controle e para a dose de 0,25 mg kg^{-1} dia^{-1} (Tabela 1), não houve diferença significativa para a temperatura cutânea sendo que a maior média numérica observada foi aos 56 e 70 dias de suplementação para as duas condições, em que a

temperatura da pele o animal foi de 33,60 °C para o grupo controle e de 33,56 °C para os animais receberam a dose de 0,25 mg kg⁻¹ dia⁻¹ de astaxantina. O resultado obtido acompanha a elevação da temperatura do ar no mês de março (Tabela 1).

O dia 42 de suplementação, foi o que apresentou menor média para a temperatura cutânea, diferindo significativamente porém somente da primeira avaliação (p=0,0002) (Tabela 1).

A temperatura cutânea ideal para vacas leiteiras manterem a sua produtividade e sobrevivência deve ficar entre 38,0 e 39,0 °C (PIRES et al., 1999). Como a temperatura cutânea se manteve abaixo do que é considerado condição de estresse, verifica-se que os animais conseguiram manter a termorregulação de maneira eficiente.

A temperatura retal (Tabela 2) teve influência das doses de astaxantina (p=0,0205) mas não do tempo de suplementação (p=0,3015) assim como não houve efeito significativo na interação entre os fatores (p=0,1633). Na análise múltipla pós-teste, somente observou-se diferença entre os grupos controle e 0,25 mg kg⁻¹ dia⁻¹ de astaxantina (p=0,0195).

Tabela 2 - Temperatura retal (média ± EPM) (°C) em relação ao tempo de suplementação com duas doses de astaxantina (0,25 mg kg⁻¹ dia⁻¹ e 0,50 mg kg⁻¹ dia⁻¹) e controle. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.

	Tempo de Suplementação (dias)				
	14	28	42	56	70
Controle	38,83 ± 0,08 ^{aA}	38,96 ± 0,13 ^{aA}	38,91 ± 0,04 ^{aA}	38,77 ± 0,12 ^{aA}	38,77 ± 0,13 ^{aA}
0,25	38,69 ± 0,06 ^{aB}	38,71 ± 0,12 ^{aB}	38,67 ± 0,06 ^{aB}	38,68 ± 0,07 ^{aB}	38,68 ± 0,09 ^{aB}
0,50	38,82 ± 0,05 ^{aAB}	38,95 ± 0,12 ^{aAB}	38,77 ± 0,05 ^{aAB}	38,74 ± 0,12 ^{aAB}	38,74 ± 0,07 ^{aAB}

Letras minúsculas sobrescritas representam diferença estatística entre colunas (tempo de suplementação); letras maiúsculas sobrescritas representam diferença estatística entre linhas (dose de astaxantina).

Fonte: Autoria própria

Como a temperatura retal é um parâmetro de avaliação de grande importância para o bem-estar animal, juntamente com a frequência respiratória, o ideal é que a temperatura retal dos bovinos leiteiros varie de 38 °C a 39,3 °C, com média de 38,6 °C, quando a temperatura fica acima de 39,1 °C, os animais começam a sofrer com o desconforto térmico (PIRES; CAMPOS, 2004; ROBINSON, 2004; COSTA et al. 2015).

Berman et al. (1985) afirmam que temperaturas acima de 26 °C em locais de

sombra ou ventilação forçada, afetam a temperatura retal. O aumento da temperatura retal interfere em todo o trato reprodutor das vacas leiteiras, gerando um comprometimento de processos ligados à reprodução como a expressão do estro, a produção e qualidade oocitária, a taxa de concepção, aumento do cortisol circulante entre outros (ORIHUELA, 2000; ROBINSON et al., 2006; MAGGIONI et al., 2008; ABREU et al., 2018).

Embora os animais tenham sido expostos a temperaturas acima de 26 °C nos períodos da tarde durante todo o verão (Apêndice A), não foi observado aumento de temperatura retal significativo. Além disso, não foi observado efeito de suplementação ou tempo de suplementação sobre esta variável ficando a temperatura retal dentro da preconizada como ideal durante todo o verão.

Ao manter a temperatura corporal e retal dentro do ideal, se evidencia a qualidade do sistema de confinamento *Compost Barn* que mantém os animais em conforto térmico apesar das altas temperaturas registradas na estação verão.

A análise de frequência cardíaca indicou que não houve diferença estatística os grupos experimentais quanto à dose de astaxantina ($p=0,3479$), contudo houve efeito de tempo de suplementação das vacas holandesas avaliadas ($p=0,0344$) (Tabela 3). Observou-se que frequência cardíaca aferida no dia 70 foi superior da observada no dia 14 de suplementação ($p=0,0232$). Não foi observada interação entre dose de astaxantina e tempo de suplementação ($p=0,3102$).

Tabela 3 - Frequência cardíaca (média \pm EPM) (bat min^{-1}) em relação ao tempo de suplementação com duas doses de astaxantina (0,25 e 0,50 $\text{mg kg}^{-1} \text{dia}^{-1}$) e controle. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.

	Tempo de Suplementação (dias)				
	14	28	42	56	70
Controle	52,00 \pm 1,39 ^{aA}	53,00 \pm 1,37 ^{abA}	52,29 \pm 1,27 ^{abA}	54,33 \pm 0,98 ^{abA}	54,91 \pm 1,09 ^{bA}
0,25	52,00 \pm 1,55 ^{aA}	53,71 \pm 1,44 ^{abA}	54,77 \pm 1,21 ^{abA}	52,83 \pm 0,80 ^{abA}	55,17 \pm 0,72 ^{bA}
0,50	51,60 \pm 1,62 ^{aA}	54,43 \pm 1,71 ^{abA}	55,85 \pm 1,09 ^{abA}	52,44 \pm 1,09 ^{abA}	55,20 \pm 0,61 ^{bA}

Letras minúsculas sobrescritas representam diferença estatística entre colunas (tempo de suplementação); letras maiúsculas sobrescritas representam diferença estatística entre linhas (dose de astaxantina).

Fonte: Autoria própria

Segundo Detweiler e Erickson (2004), a frequência cardíaca (FC) em bovinos

em repouso varia de 48 a 84 bat min^{-1} . Os resultados obtidos nesse estudo indicam que os animais avaliados não apresentaram batimentos cardíacos elevados, ficando entre o que é considerado normal.

Os dados para frequência respiratória (Tabela 4) indicam que houve efeito significativo das doses de astaxantina ($p=0,0392$) utilizadas na suplementação da mesma forma que para o tempo de suplementação dos animais avaliados ($p=0,0040$) e interação entre as variáveis independentes ($p=0,0478$). Na análise múltipla entre os grupos, observou-se diferença significativa entre os dias 28 e 42 ($p=0,0319$). Ainda, observou-se aumento da frequência respiratória no grupo tratado com $0,50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de astaxantina comparado com o grupo controle ($p=0,0327$).

Tabela 4 - Frequência respiratória (média \pm EPM) (mov min^{-1}) em relação ao tempo de suplementação com duas doses de astaxantina ($0,25$ ou $0,50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e controle. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.

	Tempo de Suplementação (dias)				
	14	28	42	56	70
Controle	$46,13 \pm 1,35$ ^{abA}	$45,86 \pm 1,04$ ^{aA}	$48,57 \pm 0,88$ ^{bA}	$47,50 \pm 0,70$ ^{abA}	$49,82 \pm 1,22$ ^{abA}
0,25	$48,93 \pm 1,47$ ^{abAB}	$47,14 \pm 1,22$ ^{aAB}	$49,23 \pm 0,92$ ^{bAB}	$47,50 \pm 0,89$ ^{abAB}	$48,83 \pm 0,52$ ^{abAB}
0,50	$48,67 \pm 1,43$ ^{abB}	$50,13 \pm 2,12$ ^{aB}	$51,69 \pm 1,08$ ^{bB}	$48,00 \pm 1,27$ ^{abB}	$50,60 \pm 0,99$ ^{abAB}

Letras minúsculas sobrescritas representam diferença estatística entre colunas (tempo de suplementação); letras maiúsculas sobrescritas representam diferença estatística entre linhas (dose de astaxantina).

Fonte: Autoria própria

Para a frequência respiratória (FR) são considerados os seguintes valores: ideal quando abaixo de 56 mov min^{-1} (conforto alto); entre 56 e 64 mov min^{-1} (conforto médio); e superiores a 64 mov min^{-1} (conforto baixo) (PERISSINOTTO et al., 2009). Já de acordo com Hahn et al. (1997), FR de 60 mov min^{-1} indica que os animais não estão expostos ao estresse térmico ou estão expostos a um estresse mínimo. Garcia e colaboradores (2015) observaram que a frequência respiratória de animais em conforto térmico, registraram em média 38 mov min^{-1} , quando em estresse essa frequência passou para 80 mov min^{-1} em animais múltiparos da raça holandesa.

Assim, podemos dizer que os animais participantes do estudo não apresentaram sinais de desconforto térmico de acordo com avaliação da frequência respiratória, visto que não foram observados valores acima de 52 mov min^{-1} durante as coletas de dados, realizadas no verão. Estes dados diferem bastante de outro

trabalho realizado na região. Pizzatto et al. (2017) avaliaram a frequência respiratória de vacas holandesas e $\frac{3}{4}$ holandesas em sistema *compost* na cidade de Dois Vizinhos, Paraná que possui características de clima semelhante as do presente estudo. A frequência respiratória observada foi de 75 mov min^{-1} e 74 mov min^{-1} , para as vacas holandesas e $\frac{3}{4}$ holandesas, respectivamente. Esses dados demonstram que esses animais estavam sob condições de estresse no outono, quando o estudo foi realizado.

Dalcin et al. (2016), avaliaram a temperatura retal, frequência cardíaca a respiratória em vacas leiteiras manejadas em sistema *free stall*, no mês de março, sendo divididas em holandesas puras e girolando ($\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$), submetidos ao estresse térmico. Os autores determinaram que a frequência respiratória é um bom parâmetro para avaliar o estresse e que as vacas holandesas puras são mais sensíveis ao calor em relação mestiças.

Os dados referentes a variáveis fisiológicas indicam que os animais confinados no sistema *Compost Barn* não apresentaram alterações referentes a temperatura cutânea, temperatura retal, frequência cardíaca e frequência respiratória característicos de estresse térmico no período de avaliação em que as temperaturas são mais elevadas. Dessa forma, estes dados sugerem que o sistema da propriedade, apesar de manter as temperaturas elevadas conforme verificado por meio das variáveis microclimáticas TAR, UR e ITU avaliadas no período, principalmente da tarde, os animais mantiveram suas funções fisiológicas estáveis e dentro de intervalos normais.

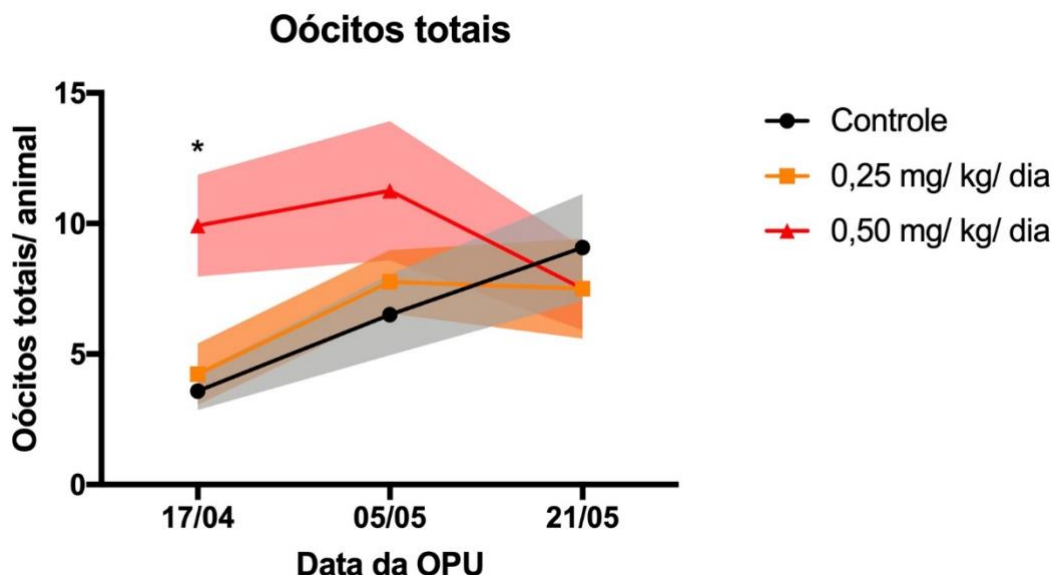
5.3 QUALIDADE E POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO

Embora a avaliação de variáveis fisiológicas não tenha demonstrado quadro de estresse durante o verão, as variáveis microclimáticas indicam que os animais estavam sob condições consideradas desconfortáveis ou muito desconfortáveis. Assim, para verificar o efeito da suplementação na qualidade e potencial de desenvolvimento oocitário de vacas holandesas no verão, foram realizados protocolos de fecundação *in vitro* de embriões a partir de oócitos aspirados.

Na Figura 7, que demonstra a quantidade de oócitos totais recuperados por

animal em relação à data da aspiração folicular guiada (OPU) e ao uso de astaxantina na dieta dos animais, podemos observar uma diferença significativa na quantidade de oócitos aspirados em resposta ao tratamento com astaxantina.

Figura 7 - Oócitos totais (média \pm EPM) por animal suplementados com diferentes doses de astaxantina em relação à data de aspiração folicular guiada (OPU). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.

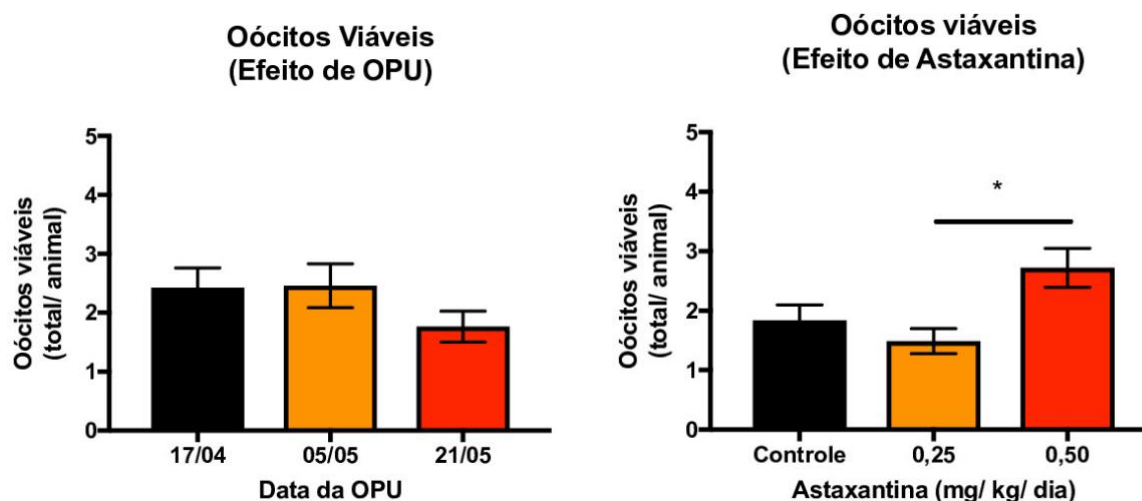


Fonte: Autoria própria

Contudo o número de oócitos totais por animal apresentou diferença significativa apenas na primeira aspiração, ocorrida no dia 17 de abril. Nesta coleta, fêmeas que receberam $0,50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de astaxantina apresentaram maior número de oócitos totais comparado com o grupo $0,25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de astaxantina ($p=0,0279$) e controle ($p=0,0395$). As demais datas não influenciaram a quantidade de oócitos obtida, assim como o efeito com o tratamento com astaxantina passou a não ser mais observado. Não houve efeito de data de OPU ($p=0,01339$) ou interação ($p=0,1873$).

Para a quantidade de oócitos viáveis, não houve efeito significativo de data da OPU ($p=0,3604$) ou interação entre a data de aspiração (OPU) e as concentrações do antioxidante ($p=0,07$), sendo cada um dos fatores avaliados separadamente (Figura 8).

Figura 8 – Efeito de data de OPU e astaxantina sobre o total de oócitos viáveis por animal (média \pm EPM) após suplementação com diferentes doses de astaxantina. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021



Fonte: Autoria própria

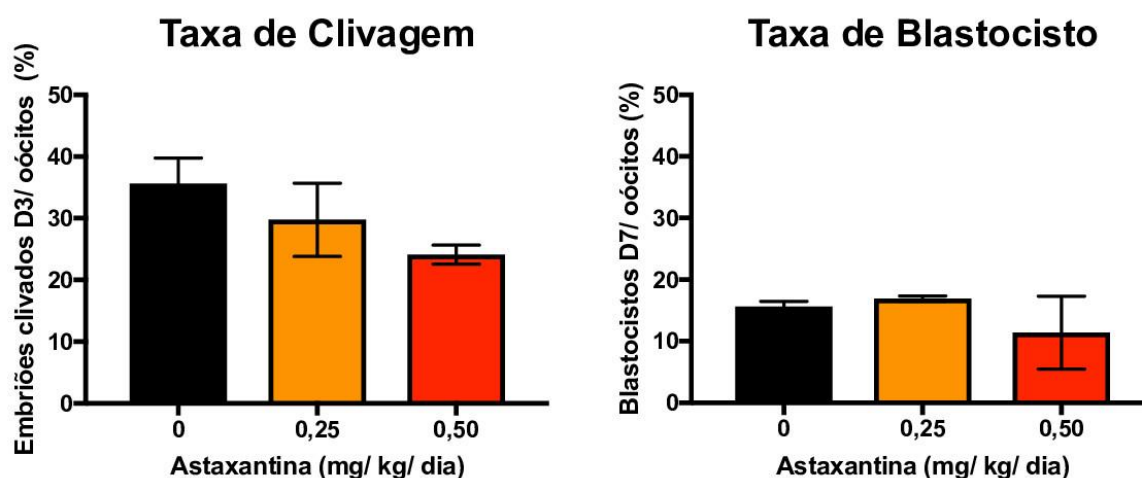
Já a concentração de astaxantina (Figura 8) apresentou efeito significativo, com diferença observada somente entre os grupos de 0,25 e 0,50 mg kg⁻¹ dia⁻¹ de astaxantina ($p < 0,0452$), sendo que a maior dose de astaxantina permitiu a recuperação de mais oócitos viáveis por vaca. O efeito da astaxantina apesar de significativo, permitiu a viabilidade de apenas dois a três oócitos. Esses dados sugerem que a suplementação com astaxantina em vacas holandesas em lactação pode melhorar o número de oócitos morfologicamente viáveis obtidos por OPU.

Hidalgo et al. (2002) avaliaram a ação de 1×10^6 IU (1 UI = 0,3 microgramas de vitamina A) de retinol em novilhas aplicados quatro dias antes da realização da OPU e verificaram que houve aumento no número de oócitos recuperados.

O uso de antioxidantes como os β -carotenos contribui para a melhoria na qualidade dos oócitos e por este motivo Sales et al. (2008) avaliaram o uso de β -caroteno e tocoferol em duas doses de 800 mg de β -caroteno e 500 mg de tocoferol ou 1.200 mg de β -caroteno e 750 mg de tocoferol, aplicados em vacas e novilhas da raça holandesa. Como resposta os autores verificaram que o número de embriões viáveis foi superior para vacas comparado com o grupo de novilhas. Dessa forma os autores não recomendam o uso dessa combinação em novilhas, principalmente a maior dose por reduzir significativamente a viabilidade dos embriões.

A taxa de clivagem obtida a partir do número de embriões clivados no dia três (D3) pelo número de oócitos, assim como a taxa de blastocistos no dia 7 (D7), não apresentou diferença estatística entre os diferentes grupos experimentais (clivagem: $p=0,2536$; blastocisto: $p=0,6286$) (Figura 9).

Figura 9 – Taxa de clivagem e taxa de blastocisto (média \pm EPM) obtidas na produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos de fêmeas tratadas com diferentes doses de astaxantina. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.



Fonte: Autoria própria

A taxa de oócitos que são cultivados *in vitro* que chegam ao estágio de blastocisto pode chegar a 35 - 40% (SIRARD et al., 2006). No presente trabalho, foram observadas taxas de blastocisto inferiores a 20% em todos os grupos experimentais, condizentes com a época do ano. Dessa forma, o uso de suplementação com astaxantina na dieta dos animais não foi suficiente para elevar o potencial de desenvolvimento dos oócitos recuperados chegando ao estágio de blastocisto, embora um maior número de oócitos viáveis tenham sido recuperados com a maior dose de astaxantina administrada.

Watanabe et al. (2017) avaliaram a taxa de blastocisto ao longo do ano e observaram que vacas holandesas tiveram menor taxa de blastocisto entre as estações primavera e verão, aumentando a taxa quando as temperaturas se mantiveram amenas, passando de aproximadamente 20% no verão para 25% no inverno.

Ferreira et al. (2011) avaliaram a taxa de blastocisto 7 dias após fecundação

in vitro em novilhas, vacas de alta produção e vacas com múltiparas da raça holandesa na estação verão e inverno, e verificaram que independente da categoria do animal, estas apresentaram menor taxa de blastocisto na estação verão, sendo que a diferença entre cada categoria foi significativa.

Ispada et al. (2018) verificaram a ação da astaxantina na redução de espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento de complexos cumulus-oócitos (COCs) quando expostos a 41 °C por 14 horas durante a maturação *in vitro*. As concentrações de 12,5 e 25 nM de astaxantina proporcionaram efeito termoprotetor por meio do estímulo da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em células do cumulus no choque térmico, mantendo a capacidade do oócito de clivar e desenvolver-se até o estágio de blastocisto.

Taxas mais baixas de desenvolvimento de oócitos em blastocistos podem ser causados por diversos fatores, entre eles: fatores inerentes à técnica de PIV de embriões; perda de interação do oócito com ambiente folicular após a sua retirada; e condições fisiológicas da doadora (LONERGAN; FAIR, 2008; GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

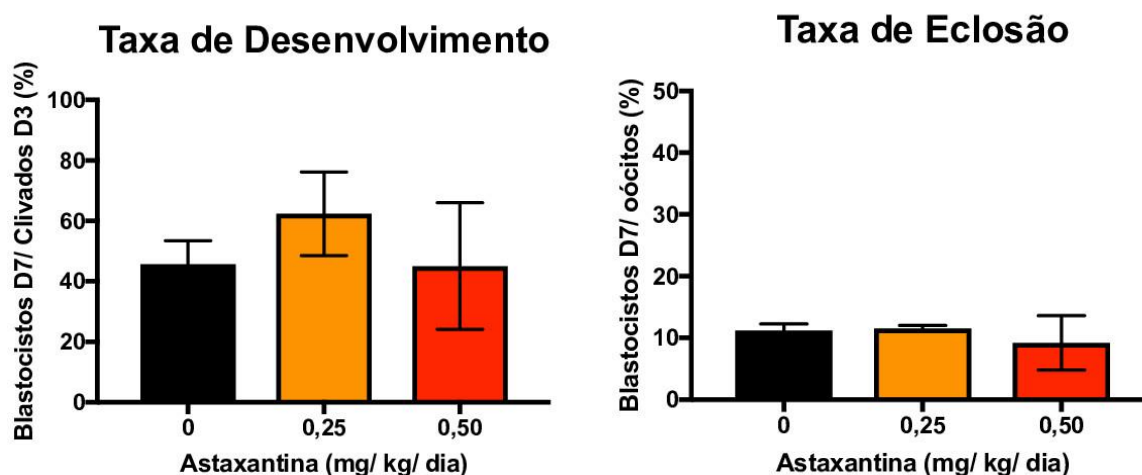
Do et al. (2013) também avaliaram a taxa de clivagem de oócitos suínos que foi de 79,5% para oócitos que maturaram *in vitro* à temperatura de 38,5 °C e concentração de 0,25 ppm de astaxantina. Já sob estresse térmico a taxa de clivagem reduziu para 58,1%. Não houve diferença na taxa de blastocisto em relação as doses de astaxantina ($p > 0,05$) em ambas as condições térmicas de maturação *in vitro*. (38,5 °C), demonstrando ausência de efeito da astaxantina no desenvolvimento até estágio de blastocisto em suínos.

Ao avaliar o uso de astaxantina durante o crescimento *in vitro* de oócitos, em que os CCO foram cultivados por 12 dias com ou sem a presença de astaxantina na concentração de 500 µM, Abdel-Ghani e colaboradores (2018) verificaram que a astaxantina reduziu os níveis de espécies reativas de oxigênio após o crescimento. Já a maturação nuclear e as taxas de clivagem não diferiram entre as duas condições, bem como o uso de astaxantina durante o desenvolvimento aumentou o número total de células em blastocistos, melhorando assim a qualidade dos oócitos bovinos.

No presente trabalho não foi observado efeito da astaxantina sobre o potencial de desenvolvimento *in vitro* dos oócitos, determinado pela relação entre blastocistos

obtidos em D7 e a quantidade de oócitos clivados ($p>0,05$) (Figura 10). Também não foi observada diferença na taxa de eclosão em D10 (Figura 10).

Figura 10 - Desenvolvimento *in vitro* de embriões obtidos a partir de oócitos aspirados de vacas holandesas suplementadas com diferentes doses de astaxantina (média \pm EPM). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021.



Fonte: Autoria própria

É possível que o resultado obtido tenha sido afetado pelo número reduzido de coletas e PIV de embriões, sendo realizadas apenas três em um período de 30 dias.

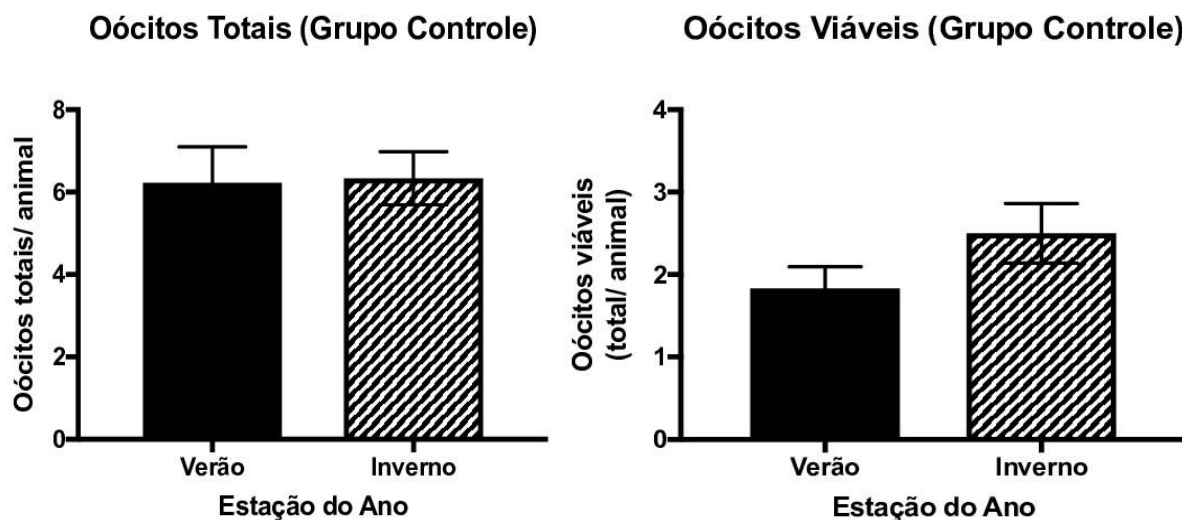
Kukori et al. (2013) avaliaram o efeito da astaxantina no desenvolvimento de blastocistos de embriões coletados no dia 3 após a fertilização e cultivados em meio com astaxantina. Estes embriões foram submetidos ao choque térmico único no dia 4 ou com repetições nos dias 4 e 5, por 10 horas a temperatura de 40,5 °C. Os autores observaram que dois dias de exposição à alta temperatura compromete significativamente o desenvolvimento de blastocisto em relação a uma exposição, sendo que a astaxantina contribuiu para a redução da deficiência que o calor induz sobre os blastocistos.

Como controle para a estação, avaliou-se a qualidade oocitária e potencial de desenvolvimento embrionário após coleta de oócitos no inverno.

Os oócitos foram recuperados e avaliados em relação ao número de oócitos totais e viáveis apenas para a animais não suplementados. Verificou-se que para ambos os parâmetros não houve efeito da estação na quantidade de oócitos

recuperados (Figura 11).

Figura 11 – Taxas de recuperação de oócitos (oócitos totais e oócitos viáveis) por OPU de vacas holandesas em diferentes estações do ano. Dados não transformados (média + EPM). Nível de significância estatística: * para $p < 0,05$).



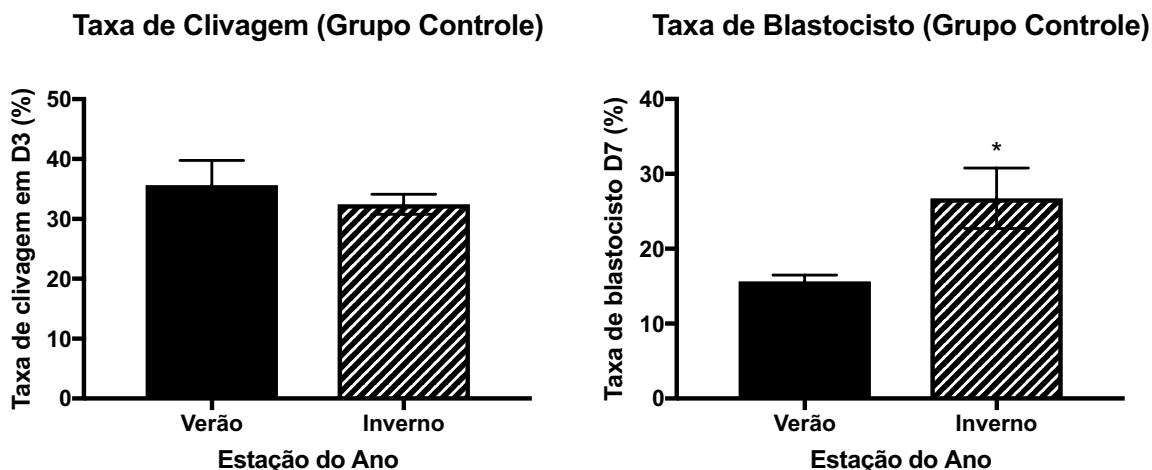
Fonte: Autoria própria

A quantidade de oócitos totais foi similar para o inverno e verão (Figura 11), ambos com recuperação de aproximadamente seis oócitos, desses apenas 1,9 (verão) e 2,5 (inverno) foram considerados viáveis de acordo com avaliação morfológica.

O estresse térmico afeta o desenvolvimento dos oócitos interferindo também na sobrevivência do embrião nos estágios iniciais. Sakatani et al. (2017) expõem que ao passar pelo estresse térmico e chegar ao estágio de blastocisto, ocorrerá redução do número de células totais, principalmente uma redução de células totais do trofoectoderma.

A taxa de clivagem não foi afetada pela estação do ano em que ocorreu a produção *in vitro* de embriões controle (Figura 12).

Figura 12 – Taxas de clivagem e blastocisto de embriões obtidos a partir de oócitos do grupo controle, aspirados de fêmeas em diferentes estações do ano. (Dados não transformados: média + erro padrão da média). Nível de significância estatística: * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$.



Fonte: Autoria própria

Contudo, a taxa de blastocisto foi afetada pela estação do ano, em que o inverno favoreceu a taxa de desenvolvimento do oócito em blastocisto ($p=0,0399$) (Figura 12). No inverno foram observadas próximas a 25%.

Bezerra et al. (2014) avaliaram a produção *in vitro* de embriões ovinos a partir de oócitos coletados durante os períodos seco (julho a janeiro) e chuvoso (fevereiro a junho) no semiárido brasileiro. Os autores verificaram que a época de coleta não interferiu no desenvolvimento embrionário em relação a taxa de oócitos viáveis, clivagem mas o número de embriões no estágio entre 8 e 16 células foi superior no período chuvoso. De modo geral, não houve influência climática sobre a maturação e produção *in vitro* de oócitos.

A variável mais importante em relação ao desenvolvimento embrionário de bovinos, a taxa de blastocisto, foi afetada pela época de coleta dos oócitos. Dessa forma, pode-se concluir que as temperaturas observadas durante o verão de 2020 mesmo em um sistema de confinamento dos animais, afetou o potencial desenvolvimento significativamente.

Mais estudos são necessários para entender melhor como a astaxantina afeta o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos, reduzindo assim os efeitos do ambiente e permitindo a redução de efeitos deletérios do estresse por calor ao qual os animais possam ser expostos.

6 CONCLUSÕES

O monitoramento de variáveis microclimáticas indica que os animais foram expostos a condições desconfortáveis e muito desconfortáveis durante o verão, comparados com o inverno.

Embora em condições consideradas desconfortáveis do ponto de vista microclimático, os animais não apresentaram valores de variáveis fisiológicas fora dos intervalos fisiológicos, sugerindo que não foram afetadas pelo ambiente ao qual os animais estavam mantidos.

A suplementação com $0,50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de astaxantina em vacas holandesas em lactação por 75 dias no verão pode melhorar o número de oócitos morfológicamente viáveis obtidos por OPU. Embora apresente efeito positivo na taxa de recuperação de oócitos viáveis, suplementação com $0,50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de astaxantina em vacas holandesas em lactação por 75 dias no verão não melhorou a taxa desenvolvimento embrionário dos oócitos *in vitro*.

O desenvolvimento embrionário foi melhor em condições amenas de temperatura quando comparada a estação de inverno e verão.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica da PIVE vem revolucionando o melhoramento genético dentro das fazendas leiteiras. Um obstáculo que essa biotecnologia ainda enfrenta é a obtenção de oócitos de boa qualidade, principalmente em épocas mais quentes do ano. A suplementação com o antioxidante astaxantina mostrou uma melhora na taxa de recuperação de oócitos viáveis. O tratamento durante o período experimental custou em média R\$ 100,00 por fêmea e se mostrou totalmente viável em relação custo/benefício. Podemos citar como fruto desses resultados a iniciativa da empresa 3B AGRO LTDA de Toledo – PR, que irá incluir a astaxantina via dieta das suas fêmeas de maior mérito genético e doadoras de embrião. O projeto da fazenda 3B AGRO LTDA é produzir 3000 embriões por ano durante os próximos 5 anos e dobrar o seu plantel de fêmeas.

REFERÊNCIAS

ABCZ - Associação Brasileira de Criadores de Zebu. **Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos**. Controle de Desenvolvimento Ponderal. Uberaba. 2014.

ABDEL-GHANI, M. A.; YANAGAWA, Y. BALBOULA, A. Z.; SAKAGUCHI, K.; KANNO, C.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, M.; NAGANO, M. Astaxanthin improves the developmental competence of in vitro-grown oocytes and modifies the steroidogenesis of granulosa cells derived from bovine early antral follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 2, p. 272-281, 2018.

ABREU, M. S.; SILVA, L. S.; GOTTSCHALL, C. S. Resposta reprodutiva e custo por prenhez em função do escore de condição corporal de novilhas ao acasalamento. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 1, n. 16, 2018.

AGHAJANPOUR, M.; NAZER, M. R.; OBEIDAVI, Z.; AKBARI, M.; EZATI, P.; KOR, N. M. Functional foods and their role in cancer prevention and health promotion: a comprehensive review. *American Journal of Cancer Research*, v. 7, n. 4, p. 740-769, 2017.

AHMADINEJAD, F.; GEIR MØLLER, S.; HASHEMZADEH-CHALESHTORI, M.; GHOLAMREZA BIDKHORI, G.; JAMI, M. S.; Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants*, v. 10, n. 6, p.51-65, 2017.

AGARWAL, A.; SAID, T. M.; BEDAIWY, M. A.; BANERJEE, J.; ALVAREZ, J. G. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 503-512, 2006.

AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90 day non-return rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. **Journal Dairy Science** v. 82, p. 2611-2615, 1999.

ALMEIDA, A. P.; SOUZA, A. L.; MENEZES, E. S. B.; ARRUDA, I. J.; RONDINA, D. Recentes avanços na relação entre nutrição e reprodução em ruminantes. **Revista Brasileira de Nutrição Animal**, v. 1, n. 2, p.34-65, 2007.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728. 2013.

ALVES, L. R.; OSTAPECHEN, L. A. P.; PORCÉ, M.; PARRÉ, J. L. Atividade leiteira no Paraná: uma análise espacial e econométrica. **Redes**, v. 25, p. 2432-2453, 2020.

ARROYO, R. J. O. **Classificação de ovócitos imaturos de bovinos pela utilização do azul cresil brilhante**. 2008. 45 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

AZEVÊDO, D. M. M. R.; ALVES, A. A. **Bioclimatologia aplicada à produção de bovinos leiteiros nos trópicos**. 1ª ed. Embrapa Meio-Norte, Teresina, 2009. 83p.

BACCARI Jr., F. **Adaptação de sistemas de manejo na produção de leite em clima quente**. In: SILVA, I. J. O. *Ambiência na produção de leite*. Piracicaba: FEALQ, p. 24-65, 1998.

BALDASSARRE, H.; FURNUS, C. C.; DE MATOS, D. G.; PESSI, H. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotropin treatments for stimulation of oocytes donors. **Theriogenology**, v. 45, n. 3, p. 707-717, 1996.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BEWLEY, J.; PALMER, R. W.; JACKSON-SMITH, D. B. An overview of experiences of Wisconsin dairy farmers who modernized their operations. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 717-729, 2001.

BERMAN, A.; HOROVITZ, T.; KAIM, M.; GACITUA, H. A comparison of THI indices leads to a sensible heat-based heat stress index for shaded cattle that aligns temperature and humidity stress. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 10, p. 1453-1462, 2016.

BERMAN, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; MAMEN, M.; HERZ, Z.; WOLFENSON, D.; ARIELI, A.; GRABER, Y. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 6, p. 1488-1495, 1985.

BERNABUCCI, U.; BIFFANI, S.; BUGGIOTTI, L.; VITALI, A.; LACETERA, N. NARDONE, A. The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 471-486, 2014.

BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P.; RONCHI, B.; NARDONE, B. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v. 4 n. 7, p. 1167-1183, 2010.

BEZERRA, F. Q. G.; SILVA, J. C. F.; SILVA, P. G. C.; CANTANHÊDE, L. F.; BASTO, S. R. L.; FREITAS NETO, L. M.; MOURA, M. T.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos a partir de oócitos coletados durante os períodos seco e

chuvoso. **Medicina Veterinária**, v. 8, n. 3, p. 17-23, 2014.

BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J. B. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1947-1956, 2007.

BOLS, P. E. J.; JORSSSEN, E. P. A.; GOOVAERTS, I. G. F.; LANGBEEN, A.; LEROY, J. L. M. R. High throughput noninvasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 420-425, 2012.

CAMACHO KURMEN, J. E.; GONZÁLEZ, G.; KLOTZ, B. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. **Nova**, v. 11, n. 19, p. 93-104, 2013.

CARVALHO, G. R.; ROCHA, D. T. Oferta e demanda de leite no Brasil de 1990 a 2019. In: RENTERO, N. **Anuário Leite 2020: leite de vacas felizes**. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2020. p. 14-15.

CELI, P., ROBINSON, A. Effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the performance of dairy calves. **Animal Production Science**, v. 50, n. 6, p. 376-381, 2010.

CEZAR, M.F.; SOUSA, W.H. Avaliação e utilização da condição corporal como ferramenta de melhoria da reprodução e produção de ovinos e caprinos de corte. *Rev. Bras. Zootec.*, v.35, n.esp., 2006.

COLLIER, R. J.; BAUMGARD, L. H.; ZIMBELMAN, R. B.; XIAO, Y. Heat stress: physiology of acclimation and adaptation. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 12-19, 2019.

COLLIER, R. J., RENQUIST, B. J. e XIAO, Y. A 100-year review: stress physiology including 224 heat stress. **Journal Dairy Science**, v. 100, p. 10367-10380, 2017.

COSTA, A. N. L.; FEITOSA, J. V.; MONTEZUMA JR, P. A.; SOUZA, P. T.; ARAÚJO, A. A. Rectal temperatures, respiratory rates, production, and reproduction performances of crossbred Girolando cows under heat stress in northeastern Brazil. **International Journal of Biometeorology**, v. 59, n. 11, p. 1647-1653, 2015.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 454p.

DALCIN, V. C.; FISCHER, V.; DALTRO, D. S.; ALFONZO, E. P. M.; STUMPF, M. T.; KOLLING, . J.; SILVA, M. V. G. B.; MCMANUS, C. Physiological parameters for thermal

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T. A. M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, n. 2, p. 197–204, 1989.

DELLA-FLORA, R. S.; VIU, M. A. O.; LOPES, D. T.; FERRAZ, H. T.; FONTANA, A. C. P.; PIRES, B. C. Relações entre nutrição e reprodução em bovinos de corte. **PUBVET**, v. 4, n. 30, ed. 135, 2010.

DETWEILER, D. K.; ERICKSON, H. H. Regulation of the heart, in dukes' physiology of domestic animals, 12^a ed., Ithaca: Cornell University. 2004. 999p. Disponível em: <https://www.merckvetmanual.com/special-subjects/reference-guides/resting-heart-rates>. Acesso em: 15 dez. 2020.

DO, L. T. K.; LUU, V. V.; SATO, A, Y.; TANIGUCHI, M. ; OTOI, T. Astaxanthin effects on maturation, fertilization, and development of porcine oocytes cultured under heat stress. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 1, p. 193-193, 2013.

ENDRES, M. I.; BARBERG, A. E. Behavior of dairy cows in an alternative bedded-pack housing system. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4192-4200, 2007.

FACANHA, D. A. E.; SILVA, R. G.; MAIA, A. S. C.; GUILHERMINO, M. M.; VASCONCELOS, A. M. Variação anual de características morfológicas e da temperatura de superfície do pelame de vacas da raça Holandesa em ambiente semiárido. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 837-844, 2010.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária. A arte do diagnóstico**. 2ed. São Paulo: Rocca, 2008. 792p

FERNANDES, C. C. L. **Efeito do plano alimentar e da utilização de alimentos alternativos sobre a qualidade dos oócitos e produção de embriões *in vitro* em cabras**. 2016. 171f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.

FERREIRA, R. A. **Maior produção com melhor ambiente para aves, suínos e bovinos**. 1.ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2005. 371p.

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M. R.; FERRAZ, M. L.; ARAÚJO, A. B.; RODRIGUES, C. A.; BARUSELLI, P. S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2383-2392, 2011.

FERREIRA, M. M.; ZAMITH, H. P. S.; ABRANTES, S. Astaxantina: seu uso como corante natural alimentício. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 1, p. 1-8, 2014.

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

FIEDOR, J., AND K. BURDA. Potential role of carotenoids as antioxidants in human

health and disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014.

FREITAS, B. G. de; GUERREIRO, B. M. Protocolos de IATF para aumentar a taxa de concepção de vacas de leite, 2019. Disponível em: <https://www.ourofinoaudeanimal.com/ourofinoemcampo/categoria/artigos/protocolos-iatf-aumentar-taxa-concepcao/>. Acesso em: 27 dez. 2020.

FUNSTON, R. N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, v. 82, suppl., p. 154-161, 2004.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599-616, 2003.

GARCIA, A. B.; ANGELI, N.; MACHADO, L.; CARDOSO, F. C.; GONZALEZ, F. Relationships between heat stress and metabolic and milk parameters in dairy cows in Southern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, p. 889-894, 2015.

GRAFF, K. J.; MEINTJES, M.; DYER, V. W.; PAUL, J. B.; DENNISTON, R. S.; ZIOMEK, C.; GODKE, R. A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval 50 following FSH simulation of domestic goats. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1099-1119, 1999.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008, 395p.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R., ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

GUEMRAI, S.; MONZANII, P. S.; SANTOSI, P.S.; ZANINI, R.; OHASHI, O. M.; MIRANDA M.S.; ADONA, P. R. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1616-1624, 2013.

GUERIN P. E. L.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 7, p. 175-189, 2001.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7.ed. São Paulo: Manole, 2004, 513p.

HAHN, G. L. PARKHURST, A.; GAUGHAN, J. Cattle respiration rate as a function of ambient temperature. **Transactions of American Society of Agricultural Engineering**, v. 40, p. 97-121, 1997.

HAN, D., LI, Y., HU, Q. **Biology and commercial aspects of *Haematococcus pluvialis***. In: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2^a ed, 2013, p. 388-405.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Science**, v. 364, n. 1534, p. 3341-3350, 2009.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle the thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.349-360, 2004.

HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCAULEY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S.; STOKES, J. E.; TRIMMER, S. A. Production freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, p. 141-152, 1995.

HIDALGO, C.; DIEZ, C.; DUQUE, P.; FACAL, N.; PRENDES, J. M.; FERNANDEZ, I.; GOMEZ, E. Improved cumulus-oocyte complex yields from heifers treated with retinol. **Theriogenology** v. 57, n. 1, p. 672, 2002.

HUSSEIN, G.; SANKAWA, U.; GOTO, H.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 443-449, 2006.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Pecuária Municipal**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2019>>. Acesso em: 04 jan. 2020.

IKEDA, S.; KITAGAWA, M.; IMAI, H.; YAMADA, M. The roles of vitamin a for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 23-35, 2005.

JANG, H.; JI, S.; KIM, Y.; LEE, H.; SHIN, J.; CHEONG, H.; KIM, J. T.; PARK, I. C.; KONG, H. S.; PARK, C. K; YANG, B. Antioxidative effects of astaxanthin against nitric oxide-induced oxidative stress on cell viability and gene expression in bovine oviduct epithelial cell and the developmental competence of bovine ivm/ivf embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 967-974. 2010.

KAUFMAN, J. D.; SAXTON, A. M.; RÍUS, A. G. Short communication: Relationships among temperature-humidity index with rectal, udder surface, and vaginal temperatures in lactating dairy cows experiencing heat stress. **Journal of Dairy**

Science. v. 101, n. 7, p. 1-6, 2018.

KHAN, I. T.; NADEEM, M.; IMRAN, M.; ULLAH, R.; AJMAL, M.; JASPAL, M. H. Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 41, p. 1-13, 2019.

KHOO, K. S.; LEE, S. Y.; OOI, C. W.; FU, X.; MIAO, X.; LING, T. C.; SHOW, P. L. Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 288, e 121606, 2019.

KLEIN, B. G. **Fisiología Veterinaria**. 5ª. ed. Barcelona, Ed. Elsevier, 2014, 607 p.

KUROKI, T.; OKADA, T.; KITAMURA, A.; SUGIMOTO, M. KUME, S. Astaxanthin ameliorates heat stress-induced impairment of blastocyst development *in vitro*: - astaxanthin colocalization with and action on mitochondria-. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 5, p. 623-631, 2013.

KUMAR, S.; SINGH, S.V. Inhibition of NF- κ B signaling pathway by astaxanthin supplementation for prevention of heat stress-induced inflammatory changes and apoptosis in Karan Fries heifers. **Tropical Animal Health and Production**. v. 51, n. 5, p. 1125-1134, 2019.

LANA, R. P. **Nutrição e alimentação animal: mitos e realidades**. Ed. Suprema. Viçosa: UFV, 2005, 344 p.

LEESE, H. J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. **Bioessays**, v. 24, p. 845-849, 2002

LI, X.; WANG, X.; DUAN, C.; YI, S.; GAO, Z.; XIAO, C.; AGATHOS, S. N.; WANG, G.; LI, J. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology Advances**, v. 43, e 107602, 2020.

LIM, G. B.; LEE, S.; LEE, E.; HAAM, S.; KIM, W. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 11, n. 2-3, p. 181-187, 2002.

LONERGAN, P. H.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos-dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, p. 17–22, 2008.

MADELLA-OLIVEIRA, A. F.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A. Principais hormônios que controlam o comportamento reprodutivo e social das fêmeas ruminantes – Revisão. **PUBVET**, v. 8, n. 3, ed. 252, art. 1668, 2014.

MAGGIONI, D.; ROTTA, P. P.; ITO, R. H.; MARQUES, J. A.; ZAWADZKI, F.; PRADO, R. M.; PRADO, IN. N. Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma

revisão. **PUBVET**, v. 2, n. 11, 2008.

MARIANO, R. S. G.; USCATEGUI, R. A. R.; NOCITI, R. P.; BARROS, F. F. P. C.; FELICIANO, M. A. R.; RODRIGUEZ, M. G. K.; TAIRA, A. R.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. Aspiração folicular em ruminantes – Revisão de literatura. **Investigação**, n. 6, p. 46-53, 2015.

MARINHO, L. S. R.; UNTURA, R. M.; MOROTTI, F.; MOINO, L. L.; RIGO, A. G.; SANCHES, B. V.; PONTES, J. H. F.; SENEDA, M. M. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 323-328, 2012.

MARTELLO, L. S.; SAVASTANO JÚNIOR, H.; LUZ E SILVA, S.; TITTO, E. A. L. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 181-191, 2004.

MAYA-SORIANO, M. J.; TABERNER, E.; LOPEZ-BEJAR, M. Retinol improves in vitro oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. **Zygote**, v. 21, p. 377-384, 2013.

MELO, A. F.; MOREIRA, J. M.; ATAÍDES, D. S.; GUIMARÃES, R. A. M.; LOIOLA, J. L.; SARDINHA, H. C. Efeitos do estresse térmico na produção de vacas leiteiras: Revisão. **Pubvet**, v. 10, n. 10, p. 721-730, 2016.

MENEGASSI, S. R. O.; PEREIRA, G. R.; BREMM, C.; KOETZ JÚNIOR, C.; LOPES, F. G.; FIORENTINI, E. C.; MCMANUS, C.; DIAS, E. A.; ROCHA, M. K.; LOPES, R. B.; BARCELLOS, J. O. J. Effects of ambient air temperature, humidity, and wind speed on seminal traits in Braford and Nellore bulls at the Brazilian Pantanal. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 11, p. 1787-1794, 2016.

MENEZES, S. R. S. **Efeitos do clima na performance reprodutiva de bovinos leiteiros nos Açores**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) – Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo. 2010.

MORAIS, A. N. P. **Suplementação do antioxidante carvacrol na maturação oocitária e o seu impacto sobre a produção in vitro de embriões bovinos**. 2020, 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2020.

MOTA, V. C.; ANDRADE, E. T.; LEITE, D. F. Caracterização da variabilidade espacial dos índices de conforto animal em sistemas de confinamento *Compost Barn*. **PUBVET**, v. 13, n. 2, p. 1-14, 2019

NÄÄS, I. D. A. **Princípios de conforto térmico na produção animal**. 1ª ed. Icone: São Paulo. 1986.

NAMEKAWA, T.; IKEDA, S.; SUGIMOTO, M.; KUME, S. Effects of astaxanthin-containing oil on development and stress-related gene expression of bovine embryos exposed to heat stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, e387-391, 2010.

NOGUEIRA, E.; MINGOTI, G. Z.; NICACIO, A. C. Biotécnicas reprodutivas para aceleração do melhoramento genético. In: ROSA, A. do N.; MARTINS, E. N.; MENEZES, G. R. de O.; SILVA, L. O. C. (Ed.). Melhoramento genético aplicado em gado de corte: Programa Geneplus-Embrapa. Brasília, DF: Embrapa; Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2013. Capítulo 16. p. 195-211.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washington: NAS, 2001. 356 p.

OKADA, Y.; ISHIKURA, M.; MAOKA, T. Bioavailability of astaxanthin in Haematococcus algal extract: the effects of timing of diet and smoking habits. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 9, p.1928-1932, 2009.

OLIVEIRA, C. S. **Biotécnicas da reprodução em bovinos**: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2014. 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175).

OLIVEIRA, F. S.; FERNANDES NETO, V. P.; NASCIMENTO E SILVA, M. N.; CARDOSO, F. S.; COSTA, A. P. R. Efeito do estresse térmico sobre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos de ovinos criados em clima tropical. **PUBVET**, v. 6, n. 16, p. 1357-1362, 2012.

ORIHUELA, A. Some factors affecting the behavioural manifestation of oestrus in cattle: a review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 70, n. 1, p. 1-16, 2000.

PALMA, G. Producción in vitro de embriones. In: PALMA, G. **Biología de la reproducción**, Argentina, 1ª Ed. INTA Editora, 2001, 701p.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONEN, H.; FIRST, L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**. v. 25, n. 4, p. 591-600, 1986.

PASSINATO, E. B.; MARIN, J. F. V.; NASCIMENTO, M. Q.; PETRUCCI, F. B.; BARBOZA, R. P.; BARBOZA, W. A.; VARGAS JUNIOR, J. G. **Corantes e pigmentantes na produção de aves e peixes**. In: ALMEIDA JÚNIOR, G. A. O profissional de Zootecnia no século XXI. Alegre, ES: CAUFES, 2012. p. 154-179.

PAULA-LOPES, F. F.; MILAZZOTTO, M.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; VISINTIN, J. A. Heat shock-induced damage in bovine oocytes. **Reproduction and Fertility**

Development, v. 43, p. 208, 2008.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. v. 30, p. 11-26, 2015.

PENA, F. J.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA., J. A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZALEZ FERNANDEZ, L.; MACIAS GARCIA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 345-349, 2009.

PERANO, K. M.; USACK, J. G.; ANGENENT, L. T.; GEBREMEDHIN, K. G. Production and physiological responses of heat-stressed lactating dairy cattle to conductive cooling. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 8, 2015.

PEREIRA, M. H. C., WILTBANK, M. C., GUIDA, T. G.; LOPES JUNIOR, F. R.; VANCONCELOS, J. L. M. Comparison of 2 protocols to increase circulating progesterone concentration before timed artificial insemination in lactating 235 dairy cows with or without elevated body temperature. **Journal Dairy Science**, v. 100, p. 8455-8470, 2017.

PEREIRA, J. C. C. **Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal**. Editora 1582 FEPMVZ, Belo Horizonte, 195 p., 2005.

PERISSINOTTO, M.; MOURA, D. J.; CRUZ, V. F.; SOUZA, S. R. L.; KARLA ANDRÉA OLIVEIRA DE LIMA, K. A. O.; MENDES, A. S. Conforto térmico de bovinos leiteiros confinados em clima subtropical e mediterrâneo pela análise de parâmetros fisiológicos utilizando a teoria dos conjuntos fuzzy. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1492-1498, 2009.

PILATTI, J. A.; VIEIRA, F. M.C.; RANKRAPE, F.; VISMARA, E. S. Diurnal behaviors and herd characteristics of dairy cows housed in a compost-bedded pack barn system under hot and humid conditions. **Animal**. v. 13, n. 2, p. 399-406, 2019.

PILATTI J. A.; VIEIRA, F. M. C. Environment, behavior and welfare aspects of dairy cows reared in compost bedded pack barns system. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v. 5, n. 3, p. 97-105, 2017.

PIRES, A. V.; RIBEIRO, C. V.; MENDES, C. Q. **Aspectos nutricionais relacionados à reprodução**. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p.537-559.

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

PIRES, M. F. A. **Zoneamento bioclimatológico utilizando o índice de temperatura e umidade, para bovinocultura de leite na Região Sudeste do Brasil.** In: SOBRINHO, F. S.; ALVIM, M. J.; BOTREL, M. A.; MACHADO, D. A. (Eds.). Relatório Técnico da Embrapa Gado de Leite 2001-2003. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. 173p.

PIRES, M. F. A.; FERREIRA, A. M.; SATURNINO, H. M.; TEODORO, R. L. Taxa de gestação em fêmeas da raça Holandesa confinadas em *free stall*, no verão e inverno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 1, p. 57-63, 2002.

PIRES, M.F.A; FERREIRA, A.M; COELHO, S. G. Estresse calórico em Bovinos de Leite. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n. 29, p. 23-37, 1999.

PIZZATTO, J.; VIEIRA, F. M. C.; MACAGNAN, R.; MAYER, L. R. R.; OLIVEIRA, N. S.; PILATTI, J. A. Comparação da termorregulação de vacas holandesas em sistema *Compost Barn*. In: **Anais... VII Congresso Brasileiro de Biometeorologia, Ambiente, Comportamento e Bem-Estar Animal**, 2017. v. 1. p. 1-5.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640-1646, 2011.

RADAVELLI, W. M. Caracterização do sistema *Compost Barn* em regiões subtropicais brasileiras. 2018. 89 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, 2018.

REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S. A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 7231-7272, 2013

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 234-248, 2002.

ROBINSON, J. J.; ASHWORTH, C. J.; ROOKE, J. A.; MITCHELL, L. M. MCEVOY, T. G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3-4, p. 259-276, 2006.

ROBINSON, E. **Termorregulação.** In: CUNNINGHAM, J. G. (ed) Tratado de fisiologia veterinária, 2ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 550-561, 2004.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista**

Brasileira de Zootecnia, v.36, suppl., p. 229-233, 2007.

SALES, J. N. S.; DIAS, L. M. K.; VIVEIROS, A. T. M.; PEREIRA, M. N.; SOUZA, J. C. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with β -carotene and tocoferol. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 77-89, 2008.

SAKATANI M. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced *in vitro*. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 4, p. 347-352, 2017.

SANTOS, F. S. Efeito de antioxidantes sobre o estresse oxidativo e a qualidade do leite de vacas holandesas. 2016, 77f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2016.

SENEDA, M. M.; SANTOS, G. M. G.; SILVA, K. C. F.; SPEGIORIN, M. R.; BLASCHI, W.; PONTES, J. H. F. Situação atual da aspiração follicular e fecundação *in vitro*. In: **Anais do 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, PR. p. 172-180, 2006.

SHAH, M.; MAHFUZUR, R.; LIANG, Y.; CHENG, J.; DARROCH, M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. **Frontiers in Plant Science**, v. 28, n. 7. 531, 2016.

SHIMIZU, T.; OSHIMA, I.; OZAWA, M.; TAKAHASHI, S.; TAJIMA, A.; SHIOTA, M.; MIYAZAKI, H.; KANAI, Y. Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p. 463-472, 2005.

SILVA, R. R.; VULCANI, V. A. S.; CAMARGOS, A. S.; COSTA, U. R.; DUTRA, M; M.; CHIARI, J. R. Produção *in vitro* de embriões bovinos: Estado da arte. **Colloquium Agrariae**, v. 13, p. 402-415, 2017.

SILVA, J. C. P. M.; VELOSO, C. M.; CAMPOS, J. M. S.; OLIVEIRA, A. S.; VITOR, A. C. P. **Bem-estar do gado leiteiro**. 1ª ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2012.

SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; LOPES, C. A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 315-326, 2011.

SILVA, E. V. C.; KATAYAMA, K. A.; MACEDO, G. G.; RUEDA, P. M.; ABREU, U. G. P.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Efeito do manejo e de variáveis bioclimáticas sobre a taxa de gestação em vacas receptoras de embriões. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 280-291, 2010.

SILVA, R. G.; STARLING, J. M. C. Evaporação cutânea e respiratória em ovinos sob altas temperaturas ambientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1956-

1961, 2003.

SILVEIRA, R. M. F.; VASCONCELOS, A. M.; ARAÚJO, J. M.; FERREIRA, J. B.; OLIVEIRA, P. G. AA.; BRITO, T. M. Influência dos índices reprodutivos na produção de leite de vacas mestiças criadas no litoral Cearense. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 14, n. 2, p. 117-122, 2018.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

SIRARD, M. A. The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, p. 411-417, 2017.

SOUZA, B. B.; SILVA, I. J. O.; MELLACE, E. M.; SANTOS, R. F. S.; ZOTTI, C. A.; GARCIA, P. R. Avaliação do ambiente físico promovido pelo sombreamento sobre o processo termorregulatório em novilhas leiteiras. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 6, n. 2, p. 59-65, 2010.

SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, W. M. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica de Nutriyime**, v. 4, n.3, p. 456-461, 2007.

SPENCER, H. A. Management strategies to mitigate the negative effects of heat stress on production and reproduction in dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 389-395, 2011.

STROUD, B; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 210-216, 2012.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, p. 1-9, 2012

THOM, E. C. The discomfort index. **Weatherwise**, v. 12, n. 2, p. 57-61, 1959.

VALENTIM, J. K.; MENDES, J. P.; PRZYBULINSKI, B. B.; SERPA, F. C.; BARBOSA, D. K.; CASTILHO, V. A. R.; PIETRAMALE, R. T. R. Fatores nutricionais aplicados à reprodução de ruminantes. **UNICIÊNCIAS**, v. 23, n. 2, p. 77-82, 2019

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, p. 914-925, 2006.

VIEIRA, R. J. Transtornos endócrinos e metabólicos na reprodução de vacas leiteiras.

Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 35, p. 286-292, 2011.

YANG, Y.; KIM, B.; LEE, J.Y. Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits. **Journal of Human Nutrition & Food Science**, n. 1, e1003, 2013.

WATANABE, Y. F.; SOUZA, A. H.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; SANTANA BATISTA, E. O.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F. V.; NOGUEIRA, M. F. G.; FERRAZ, J. B. S. BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 635-644, 2017.

WEST, J. W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 21-35, 1999.

ZOCCAL, R. Estados e regiões: destaques em produção. In: RENTERO, N. **Anuário Leite 2020: leite de vacas felizes**. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2020. p. 38-39.

ZOCCAL, R. Dez países top no leite. Balde Branco, São Paulo, abr. 2017. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/dez-paises-top-no-leite/>>. Acesso em: 6 jan. 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Variáveis microclimáticas (média \pm EPM) nos meses de janeiro a março e de julho a setembro de 2020, para as variáveis índice de temperatura e umidade do ar (ITU), temperatura do ar (TAR) e umidade relativa (UR). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2021

Verão				
Mês	Turno	TAR (°C)	UR (%)	ITU
Janeiro	Manhã	23,82 \pm 0,24	81,44 \pm 0,91	71,95 \pm 0,52
Janeiro	Tarde	28,06 \pm 0,26	67,51 \pm 1,19	79,36 \pm 0,43
Janeiro	Noite	22,95 \pm 0,13	83,53 \pm 0,65	70,22 \pm 0,30
Fevereiro	Manhã	24,05 \pm 0,30	73,35 \pm 1,03	71,51 \pm 0,60
Fevereiro	Tarde	28,45 \pm 0,20	57,35 \pm 1,05	78,75 \pm 0,36
Fevereiro	Noite	22,13 \pm 0,16	78,96 \pm 0,67	67,97 \pm 0,35
Março	Manhã	22,28 \pm 0,32	74,40 \pm 1,19	67,44 \pm 0,64
Março	Tarde	28,78 \pm 0,26	51,39 \pm 1,31	78,11 \pm 0,36
Março	Noite	21,48 \pm 0,19	76,09 \pm 0,86	65,92 \pm 0,38
Inverno				
Julho	Manhã	15,32 \pm 0,34	83,10 \pm 0,66	51,61 \pm 0,84
Julho	Tarde	21,23 \pm 0,31	65,09 \pm 0,99	64,68 \pm 0,65
Julho	Noite	15,89 \pm 0,26	80,63 \pm 0,57	52,96 \pm 0,63
Agosto	Manhã	16,10 \pm 0,31	79,61 \pm 0,94	53,51 \pm 0,71
Agosto	Tarde	22,59 \pm 0,34	58,67 \pm 1,27	66,62 \pm 0,63
Agosto	Noite	16,69 \pm 0,23	77,13 \pm 0,75	54,94 \pm 0,52
Setembro	Manhã	21,11 \pm 0,34	78,94 \pm 1,19	65,02 \pm 0,70
Setembro	Tarde	27,10 \pm 0,34	57,59 \pm 1,38	75,66 \pm 0,50
Setembro	Noite	20,94 \pm 0,21	76,73 \pm 0,98	64,61 \pm 0,42