

JOSÉ RIBAMAR DE SOUSA TORRES JÚNIOR

*Produção in vitro de embriões em Bos indicus sob
estresse calórico*

*São Paulo
2007*

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOSÉ RIBAMAR DE SOUSA TORRES JÚNIOR

Produção *in vitro* de embriões em *Bos indicus* sob
estresse calórico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Reprodução Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
como requisito à obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1852
FMVZ

Torres-Júnior, José Ribamar de Sousa
Produção *in vitro* de embriões em *Bos indicus* sob estresse calórico / José Ribamar de Sousa Torres-Júnior. – São Paulo : J. R. S. Torres-Júnior, 2007.
134 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação : Reprodução Animal.
Área de concentração : Reprodução Animal.

Orientador : Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Estresse calórico. 2. OPU. 3. *In vitro*. 4. Embriões. 5. *Bos indicus*. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do estresse calórico sobre a qualidade e desenvolvimento in vitro de oócitos em fêmeas bovinas da raça Gir (*Bos taurus indicus*)", protocolo nº622/2005, utilizando 12 bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Effects of heat-stress on oocyte *in vitro* competence in *Bos taurus indicus* cows", protocol number 622/2005, utilizing 12 bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 25 de fevereiro de 2005

Prof.^a Dr.^a Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TORRES-JÚNIOR, José Ribamar de Sousa

Título: Produção *in vitro* de embriões em *Bos indicus* sob estresse calórico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo como requisito à obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus queridos Pais...
Às mulheres da minha vida...

Dedico...

Agradecimentos

“Inicia-se aqui a etapa mais edificante de toda a minha vida acadêmica. Aqui me lembro de momentos singulares que se somaram na busca da conclusão desta obra. Agradecer é para mim a melhor das recompensas, pois sei que pude contar com pessoas que estarão perpetuadas nestas páginas assim com em minha memória”

Agradeço imensamente...

Ao meu Deus pela oportunidade de viver e dedicar palavras e gestos às pessoas que amo...

À Alcina Vieira de Carvalho Neta, a minha companheira, meu amor... por se manter firme diante das situações que vivemos até aqui... juntos, e repito...sempre juntos, mesmo quando a busca de um futuro profissional nos distanciou fisicamente. Por se fazer a mulher a quem escolhi pertencer e dedicar minha vida...

Aos meus pais Aretusa Mendes Torres e José Ribamar de Sousa Torres... aqueles a quem devo todos os meus dias. Pelo seu exemplo de vida e dignidade... por serem o meu porto seguro emocional e pela confiança incondicional...

Às minhas adoráveis irmãs, Márcia, Sandra e Karina por serem minha referência de amizade e companheirismo em qualquer ocasião...

À minha segunda família, Gentil, Gracimar e Gustavo, por me acolherem em seu seio e compartilharem comigo sua jóia mais preciosa...

A Rodolfo (Dolfaier) por ter se mostrado um grande homem e, assim, conquistado a amizade e respeito de todos em nossa família...

Aos meus amigos-irmãos Sandro, Gisella, Johhanes e Roberta pela dedicação e paciência em ter em mim um amigo que sempre tem ido e vindo, e por compartilhar a minha esperança e luta para retornar e permanecer em casa...

A Wanderlei Ferreira de Sá e Maria de Fátima Ávila Pires (Fatinha) por terem me adotado na família Embrapa Gado de Leite e por terem sido as pessoas que, de fato, possibilitaram a elaboração e execução prática desta obra... por me apoiarem em todos os passos e percalços transcorridos...

Ao Dr. Ademir Ferreira, João Henrique, Luís Sérgio, Alessandra Ramos, Juliana Polisseni, Jasmin, Isabella Folhadela, Raquel Serapião, Miro e Joel pelos ensinamentos e suporte sem os quais não seria possível concluir este trabalho...

Ao meu grande amigo e “brode” Dedi, pelos momentos divertidos e principalmente por ter me acolhido em sua casa e em sua família sempre que precisei...

À Sandrinha da Garagem, Sandra Tassi, Rui Verneque, Jailton, Ernani e Zé Geraldo pela atenção que me dedicaram durante a minha estada na Embrapa...

A Gilmar Alvim e Marquinhos pelo acompanhamento a mim dispensado no Campo Experimental Coronel Pacheco...

Aos motoristas seu Márcio e Carlinhos por terem feito comigo a “grande viagem” entre Minas Gerais e Rio de Janeiro em busca dos nossos animais experimentais...

À EPAMIG, representada pelas pessoas dos pesquisadores Marcos Brandão e Alberto Marcatti, pela doação dos animais que foram utilizados por nós em nosso experimento de Tese...

Aos colegas do Campo Experimental Santa Mônica Dr. Marcos, Dr. Wilson, Jefferson, Gustavo Mansur, Landeiro, seu Hamilton, Fernando, Valdir, Reginaldo, Tia Nelly, Ruizinho, Paulinho, Chicão, Wilson novato, Betinho, seu Assis, Alceu, Jabutirica, Cristiano (Dadá), César Prata, Sidney, Marcelo (Chin), Adilson, Joaquim e Osvaldo pela amizade e suporte nas atividades de campo...

Aos antigos estagiários e hoje excelentes profissionais, Chico Cuiabá, Gustavo Barra Mansa, Késia, André Jequitinhonha, Bruno Paçô, Alessandra, Tamara, Renan, Jorge, Júlio Copacabana, Deni, Roberta, Fabrício, Antonio Carlos, Jônathas Magé, Fernanda, Lili, Netto Ferrari, Gabi, Thaizinha, André EPAMIG, Ana Paula, Samira e Paola pela importante participação, paciência, dedicação e carinho com que trataram os animais em nosso dia a dia no CESM...

Em especial a Joãozito, Dr. Célio de Freitas e Carlos Augusto Alanis Clemente por terem sido, juntos, meu braço direito na execução desta obra e por terem conquistado minha amizade e respeito num convívio diário e muito recompensador...

Aos colegas Joelma, Jéssica, Lulu, Denise, Cris, Marcelinho, Diego, Lucas, Carminha, dona Rosélia, seu Zé, Rodolfo, Marajá, Marcio Braga e Beatriz pelos dias agradáveis vividos em Barão de Juparanã...

Ao meu tio e hoje parceiro profissional José Adalmir Torres de Souza por ter me apresentado à Universidade de São Paulo e me motivado na frutífera opção da Pós-Graduação nesta instituição...

A Pietro Sampaio Baruselli por ser um orientador nato... pelo exemplo de profissionalismo e dedicação... por prezar a postura profissional e, sobretudo, pessoal... por

nos ensinar a cada segundo quanto esforço é necessário para se comprovar hipóteses... por servir como referência a ser alcançada...

Às adoráveis Thais, Harumi, Alice, Dayse, Joana, Shirley, Elza Faquim, Neide e dona Sílvia e, ao Miguel, pela sua competência e pelo auxílio sempre presente na FMVZ...

Aos amigos Lindsay, Manoel, Nélcio, Everton, Claudiney, Henderson, Alexandre, Márcio Ferraz, Zé Nélio e Gabriel por terem contribuído científica, técnica e intelectualmente com a visão profissional que compartilho hoje... por terem sido TODOS cúmplices em TODOS os momentos vividos durante meu doutoramento, desde a discussão/execução do mais complexo dos experimentos, ao melhor dos "causos" de boteco...

Aos professores Mario Binelli, Mayra, Visintin, Ciro Barros, Idércio, Buratini e Roberto Sartori, entre muitos outros... pela valiosa contribuição em minha profissionalização na área que escolhi para atuar...

Aos demais colegas do VRA, Marcella (Mazão), Renata, Alê, Marcílio Nichi, Priscila, Tati, Aníbal, Zeca, Maria Paula, Daniel Gentil, Fabíola, Gutão, Cris, Liege, Karina, Lílian, Marie, Nani, Paola, Paulo, Viviane e Weber, pela agradável convivência...

A Flávio Ribeiro e Barrêto Júnior por serem fiéis amigos principalmente durante o período que estive na cidade de São Paulo e na FMVZ-USP...

À Universidade de São Paulo e à Embrapa Gado de Leite por terem sido as instituições nas quais fui acolhido nesta etapa de minha formação profissional...

À FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro no experimento e na bolsa estudantil que me mantiveram no curso da pesquisa...

À Universidade Federal Rural da Amazônia, nas pessoas dos colegas Fernanda Hatano, Maria do Socorro, Fábio Hatano, Ana Paula, Robson, Kaliandra e Eduardo pela acolhida e pelo companheirismo na reta final da conclusão desta obra...

E, mais uma vez e sempre... em especial aos animais experimentais, aos quais devo todo o respeito e muitas vezes até desculpas, por existirem, por me ensinarem a ser Médico Veterinário...

Meu muito obrigado!!!

*“Educação do Futuro: Integrar
harmonicamente conhecimento,
habilidades e atitudes”*

Cavalet (1962)

RESUMO

TORRES-JÚNIOR, J. R. S. **Produção *in vitro* de embriões em *Bos indicus* sob estresse calórico.** [In vitro embryos yield in heat-stressed *Bos indicus*]. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Dez vacas Gir foram adaptadas em *tie-stall* por 28 dias (Fase I/ pré-tratamento/ dias -28 a -1), sendo submetidas a duas sessões de OPU (dias -14 e -7). Na Fase II (tratamento/ dias 0 a 28) as mesmas foram divididas em Controle (**GC**/n=5) e Estresse (**GE**/n=5). O **GC** permaneceu em normotermia e o **GE** foi submetido a estresse calórico (EC) em câmara climática com temperatura e umidade controladas [38°C e 80% UR (DIA); 30°C e 80% UR (NOITE)], por 28 dias, procedendo-se, nesta fase, cinco OPU/fêmea. Na Fase III (pós-tratamento / dias 28 a 147) todas as fêmeas retornaram à normotermia (ambiente), sendo realizadas mais 17 OPU/fêmea. Diariamente foram registradas as temperaturas de bulbo seco (TBS) e úmido (TBU) e o índice de temperatura e umidade (ITU). As respostas fisiológicas avaliadas foram consumo de matéria seca (CMS), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR), temperatura cutânea (TC), taxa de sudorese (TS) e concentrações de cortisol e progesterona (P₄). Fase luteínica foi definida como o período compreendido entre colheitas com P₄ <1,0ng/mL. Semanalmente, com auxílio de um ultra-som (Scanner 200s) equipado com transdutor setorial intravaginal de 7,5MHz, foram aferidas a população folicular e o diâmetro dos dois maiores folículos. Em seguida, os folículos ≥3mm foram puncionados e os oócitos recuperados foram avaliados morfológicamente, selecionados, maturados, fertilizados e cultivados *in vitro*. Os efeitos das variáveis classificatórias (animal, tratamento, fase e semana/sessão de OPU) sobre as variáveis resposta, e suas interações, foram analisadas por ANOVA para medidas repetidas no tempo (PROC MIXED do SAS[®]) e pelo teste de Qui-quadrado, com significância de 5%. Um animal foi excluído do GE após seis sessões, permanecendo somente quatro animais no GE e cinco no GC. O ITU durante o tratamento foi aumentado no GE em relação ao GC (93,1±0,15 vs. 73,6±0,5, respectivamente; P<0,05), acompanhado de uma elevação altamente significativa na FR, TR e TC (P<0,0001), caracterizando EC efetivo no grupo tratado. Na Fase II o GE apresentou CMS inferior ao GC (6,9±0,2 vs. 8,0±0,3, respectivamente; P<0,05). Nas fases pré e pós-estresse todas as

variáveis climáticas e fisiológicas foram similares ($P > 0,05$) entre tratamentos. Não houve efeito do EC na TS e nas concentrações de cortisol. O EC ocasionou longos períodos de aciclicidade ($P_4 < 1 \text{ ng/mL}$) e ciclos de curta duração (GE; 37,5% vs. GC; 8,6%; $P < 0,001$). Houve efeito de sessão de OPU, mas não de tratamento no número de folículos visualizados e CCO's recuperados. Houve aumento no diâmetro folicular e codominância no GE. O percentual de CCO's selecionados para MIV e a taxa de clivagem não sofreram efeito do EC, contudo houve efeito imediato e tardio na taxa de produção de blastocistos, sendo de 35,5% no GE vs. 25,0% no CG ($P = 0,15$) na fase II, e 27,2% vs. 13,3% ($P < 0,05$) para os respectivos grupos, na fase III. De acordo com os dados aqui apresentados conclui-se que o EC em *Bos indicus* afetou negativamente a dinâmica ovariana, ocasionando falha no mecanismo de dominância folicular e diminuição na produção *in vitro* de embriões por um período superior a 105 dias.

Palavras-chave: Estresse calórico. OPU. *In vitro*. Embriões. *Bos indicus*.

ABSTRACT

TORRES-JÚNIOR, J. R. S. ***In vitro* embryos yield in heat-stressed *Bos indicus*.** [Produção *in vitro* de embriões em *Bos indicus* sob estresse calórico]. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Ten Gir (*Bos indicus*) cows were kept in tie-stalls for 28 days (Phase I/ before-trial/ days -28 to -1). Cows were submitted to two OPU sessions (days -14 and -7). In Phase II (trial/ days 0 to 28), cows were divided in Control (C/n=5) and Heat-stressed (HS/n=5). The CG remained in thermoneutral environment and the HS was kept under heat-stress in environmental chamber with controlled temperature and humidity [38°C and 80%UR (DAY), 30°C and 80%UR (NIGHT)], for 28 days. During this phase five OPU sessions were accomplished. In Phase III (post-trial/ days 28 to 147) all cows returned to thermoneutral environmental temperatures and 17 OPU sessions were performed. The dry (DBT) and humid (HBT) bulb temperatures were daily measured and obtained the temperature-humidity index (THI). Physiological responses as dry matter intake (DMI), respiratory frequency (RF), rectal temperature (RT), skin temperature (ST), sweating rate (SR), plasma cortisol and progesterone (P₄) were assessed. Luteal phase was defined as the period between two samples with P₄ below 1.0ng/mL. Once a week, prior to OPU procedure, the number of follicles in the ovary and the diameter of the two biggest follicles were evaluated using an ultrasound (Scanner 200s, 7.5MHz sectorial probe). Subsequently, all follicles ≥ 3mm were aspirated and the oocytes morphologically evaluated, selected, matured, fertilized and cultivated for embryo production *in vitro*. The effects of independent variables (cow, treatment, phase, and week/OPU session) on the dependent variables were analyzed by ANOVA for repeated measures (PROC MIXED of SAS[®]) and by Chi-square test, both with a significance level of 5%. One animal was excluded from HS after sixth session, having remained four vs. five cows for CG and HS groups respectively. The THI increased during heat-stress treatment (93.1±0.15 vs. 73.6±0.5 for HS and CG respectively, P<0.05), simultaneously to a significant increase in RF, RT and ST (P<0.0001). It was characterized as effective heat-stress on the treated cows. In phase II the HS showed lower DMI than CG (6.9±0.2 vs. 8.0±0.3 respectively, P<0.05). All environmental and physiologic variables were similar (P>0.05) between treatments in the periods before and post

heat-stress. There was no effect of heat-stress on SR and cortisol levels. The HS treatment induced to longer periods of ovarian inactivity ($P_4 < 1\text{ng/mL}$) as well as short cycles (HS, 37.5% vs. CG, 8.6%, $P < 0.001$). There was effect of OPU session but not of treatment on number of visualized follicles or recovered oocytes. The diameter of the biggest follicles and incidence of codominance increased in HS treatment ($P < 0.05$). Moreover, there was no effect of heat-stress on percentage of COCs selected to IVF or cleaved. However, immediate and delayed effects were observed on blastocysts yield (35.5% vs. 25.0%, $P = 0.15$, for CG and HS groups on the phase II and 27.2% vs. 13.3%, $P < 0.05$, for respective groups on the phase III). Our results suggest that the ovarian dynamics of *Bos indicus* cattle was affected by heat-stress exposure, showing failures on follicular dominance and on in vitro embryos yield for at least 105 days after the heat-stress subside.

Key words: Heat-stress. OPU. In vitro. Embryos. *Bos indicus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama esquemático das diferentes fases de indução térmica experimental e sessões de aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	43
Figura 2 -	Média semanal retrospectiva das temperaturas diárias de bulbo seco (TBS) nas instalações experimentais durante o período pré-experimental e experimental nos turnos da manhã (08:00 h; gráfico superior) e da tarde (15:00 h; gráfico inferior)	55
Figura 3 -	Média semanal (\pm E.P.M.) das temperaturas diárias de bulbo seco (TBS) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h)	57
Figura 4 -	Média semanal (\pm E.P.M.) das temperaturas diárias de bulbo úmido (TBU) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h)	58
Figura 5 -	Média semanal (\pm E.P.M.) da umidade relativa do ar (UR) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h)	59
Figura 6 -	Caracterização de conforto (média \pm E.P.M.) e estresse térmico em bovinos de acordo com o Índice de Temperatura e Umidade (ITU; Armstrong, 1994) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h)	60
Figura 7 -	Média semanal (\pm E.P.M.) do consumo de matéria seca nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	62
Figura 8 -	Média semanal (\pm E.P.M.) da Frequência respiratória (FR) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h)	65
Figura 9 -	Média semanal (\pm E.P.M.) da Temperatura retal (TR) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h)	66
Figura 10 -	Média semanal (\pm E.P.M.) da Temperatura da superfície cutânea (TC) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h)	67
Figura 11 -	Média (\pm E.P.M.) da taxa de sudação (TS) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	70

Figura 12 -	Média (\pm E.P.M.) das concentrações plasmáticas de cortisol nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	72
Figura 13 -	Média (\pm E.P.M.) das concentrações plasmáticas de progesterona nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	73
Figura 14 -	Perfil plasmático individual de Progesterona nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	74
Figura 15 -	Média (\pm E.P.M.) de folículos visualizados no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	77
Figura 16 -	Média (\pm E.P.M.) e percentual de folículos aspirados no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	77
Figura 17 -	Média (\pm E.P.M.) de complexos cúmulus-oócitos recuperados por sessão de aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	79
Figura 18 -	Percentual de complexos cúmulus-oócitos recuperados em relação ao número de folículos puncionados (taxa de recuperação) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	79
Figura 19 -	Média (\pm E.P.M.) de folículos pequenos (<6mm de diâmetro) observados no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	81
Figura 20 -	Média (\pm E.P.M.) de folículos médios (6-9mm de diâmetro) observados no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	81
Figura 21 -	Média (\pm E.P.M.) de folículos grandes (>9mm de diâmetro) observados no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	82
Figura 22 -	Média (\pm E.P.M.) do diâmetro do maior folículo observado no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	82
Figura 23 -	Média (\pm E.P.M.) do diâmetro do segundo maior folículo observado no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	83

Figura 24 -	Média (\pm E.P.M.) do diâmetro do folículo dominante (FD; linhas com círculos sólidos) e do maior folículo subordinado (FS; linhas com círculos abertos) visualizados no momento da aspiração folicular e concentração plasmática de progesterona (P4; área amarela) nos Grupos Controle (gráfico inferior) e Estresse (gráfico superior) durante o período experimental	89
Figura 25 -	Perfil plasmático individual de progesterona (P4; área amarela) e diâmetro do folículo dominante (FD; linhas com círculos abertos) visualizado no momento da aspiração folicular nos animais dos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	91
Figura 26 -	Percentual de oócitos viáveis selecionados para maturação <i>in vitro</i> nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	94
Figura 27 -	Percentual de estruturas clivadas <i>in vitro</i> nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	97
Figura 28 -	Percentual de blastocistos produzidos <i>in vitro</i> nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental	99
Figura 29 -	Implicações do estresse calórico materno na dinâmica ovariana e competência oocitária. <i>Modelo hipotético das interações multifatoriais que culminam com falhas reprodutivas em bovinos.</i>	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Critérios para a classificação morfológica dos complexos <i>cúmulus</i> -oócitos recuperados	50
Quadro 2 -	Variáveis resposta analisadas durante o período experimental	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Temperatura de bulbo seco (TBS), temperatura de bulbo úmido (TBU), umidade relativa do ar (UR) e ITU nos Grupos Controle e Estresse durante a fase de tratamento, nos turnos da manhã (08:00 h) e tarde (15:00 h) – Valença – 2005	56
Tabela 2 -	Efeitos das variáveis classificatórias para cada variável resposta climática e suas interações.	61
Tabela 3 -	Efeitos das variáveis classificatórias para cada variável resposta fisiológica e suas interações.	64
Tabela 4 -	Média (\pm E.P.M.) das concentrações plasmáticas de Cortisol nos Grupos Controle e Estresse nas diferentes fases experimentais – Valença – 2005.	72
Tabela 5 -	Caracterização dos intervalos entre fases luteínicas nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental – Valença – 2005	75
Tabela 6 -	Duração do intervalo entre fases luteínicas e concentrações plasmáticas de Progesterona nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental – Valença – 2005	75
Tabela 7 -	Efeitos das variáveis classificatórias para cada variável resposta endócrina e suas interações.	76
Tabela 8 -	Características ovarianas observadas no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante as diferentes fases experimentais – Valença – 2005	83
Tabela 9 -	Efeito da codominância folicular sobre as características ovarianas observadas no momento da aspiração folicular - Valença – 2005	85
Tabela 10 -	Qualidade oocitária (número e percentual) nos Grupos Controle e Estresse durante as diferentes fases experimentais – Valença – 2005.	94
Tabela 11 -	Efeito da codominância folicular sobre a qualidade oocitária e a produção <i>in vitro</i> de embriões – Valença – 2005.	95
Tabela 12 -	Competência <i>in vitro</i> (número e percentual) de oócitos coletados por aspiração folicular <i>in vivo</i> nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental – Valença – 2005	99
Tabela 13 -	Efeitos das variáveis classificatórias para cada variável resposta inerente à OPU-PIV e suas respectivas interações.	100

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	HIPÓTESE	24
3	OBJETIVOS	25
4	REVISÃO DE LITERATURA	26
4.1	O ESTRESSE CALÓRICO EM BOVINOS	26
4.2	FATORES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO ESTRESSE CALÓRICO	27
4.2.1	<i>Raça</i>	27
4.2.2	<i>Lactação</i>	28
4.3	RESPOSTA FISIOLÓGICA FRENTE AO ESTRESSE CALÓRICO	29
4.3.1	<i>Consumo de matéria seca e balanço energético</i>	31
4.3.2	<i>Resposta clínica</i>	32
4.3.3	<i>Resposta endócrina e desenvolvimento folicular</i>	33
4.3.4	<i>Resposta celular e molecular</i>	36
4.3.5	<i>Gametas e embriões</i>	38
5	MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1	LOCAL E ANIMAIS EXPERIMENTAIS	41
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	41
5.3	AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLIMÁTICAS	43
5.4	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FISIOLÓGICA	44
5.4.1	<i>Consumo de matéria seca</i>	44
5.4.2	<i>Resposta clínica</i>	46
5.5	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ENDÓCRINA	47
5.6	EXAME OVARIANO E ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SOM	48
5.7	COLHEITA, AVALIAÇÃO E TRANSPORTE DOS COMPLEXOS CÚMULUS- OÓCITOS	49
5.8	MATURAÇÃO, FERTILIZAÇÃO E CULTIVO <i>IN VITRO</i>	51
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1	VARIÁVEIS CLIMÁTICAS	54

6.2	RESPOSTA FISIOLÓGICA	62
6.3	RESPOSTA ENDÓCRINA	71
6.4	CARACTERÍSTICAS OVARIANAS E ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SOM	76
6.5	QUALIDADE OOCITÁRIA E PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	93
7	SUMÁRIO DE RESULTADOS	106
8	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICES	128
	ANEXO	134

1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo as condições climáticas são o principal fator determinante para o sucesso na exploração pecuária, como indicador de investimentos e direcionamento da produção. As perdas econômicas e custos operacionais do setor atribuídos ao estresse calórico somam, somente nos Estados Unidos, 2,4 bilhões de dólares por ano, principalmente devido à diminuição no desempenho produtivo, aumento da mortalidade e queda na eficiência reprodutiva (ST-PIERRE; COBANOV; SCHNITKEY, 2003).

Um recurso já discutido e considerado viável para minimizar este problema é o uso de raças e cruzamentos reconhecidamente resistentes ao estresse térmico, proporcionando assim, um incremento na produção e na reprodução, principalmente durante as épocas mais quentes do ano. Assim, a raça Gir assume um importante papel na economia nacional, por ser a principal raça zebuína (*Bos indicus*) explorada no setor leiteiro e adaptada às condições ambientais existentes no País, sendo ainda largamente utilizada em cruzamentos com raças européias (*Bos taurus*).

Os processos reprodutivos, tanto em machos quanto em fêmeas, são altamente afetados pela hipertermia, com maiores danos na quantidade e qualidade espermática em machos e diminuição da fertilidade em fêmeas (HANSEN, 1997). Há indicações de que o estresse calórico pode ocasionar efeito deletério sobre a competência oocitária e síntese de substâncias requeridas para o desenvolvimento embrionário inicial (ROCHA et al., 1998; RUTLEDGE et al., 1999; AL-KATANANI et al., 1999, 2002).

Entre os processos adaptativos desenvolvidos pelos zebuínos durante sua evolução destacam-se a aquisição de genes de termotolerância que conferem a estes animais melhor capacidade de regular as reações fisiológicas frente ao estresse calórico em relação às raças de origem européia (MCDOWELL et al., 1953; CARTWRIGHT, 1955; ALLEN et al., 1963; FINCH, 1986; CARVALHO et al., 1995; HAMMOND et al., 1996; GAUGHAN et al., 1999).

Apresentam, também, diferenças intrínsecas que interferem na fertilidade como fatores termo-proteção secretados por células do oviduto, endométrio e também por

alguns tipos de linfócitos, reforçando a importância do efeito genético sobre o desempenho reprodutivo diante de variadas condições e/ou alterações climáticas (HANSEN et al., 2001; PAULA-LOPES et al., 2003).

Diversas pesquisas sugerem que a climatização para melhorar as condições de bem-estar animal, a aplicação da TE e/ou da técnica de produção *in vitro* de embriões (PIV), podem sobrepor os efeitos do estresse calórico, melhorando significativamente a fertilidade (AL-KATANANI et al., 1999; 2002; AMBROSE et al., 1999; EALY et al., 1993; RUTLEDGE, 2001; RUTLEDGE et al., 1999). Por isso, estas estratégias de manipulação do ambiente e da fisiologia celular, têm sido enfocadas na expectativa de reduzir as conseqüências do estresse calórico na função reprodutiva (HANSEN et al., 2001).

Atualmente, a literatura ainda é restrita em informações relacionadas às alterações fisiológicas, endócrinas e ovarianas provocadas pelo estresse calórico em *Bos indicus*. Para isto é necessário compreender os mecanismos biológicos desenvolvidos por esta subespécie em resposta à hipertermia, de modo a aplicá-los de maneira racional objetivando alcançar melhor desempenho reprodutivo e produtivo.

2 HIPÓTESE

O estresse calórico influencia as respostas fisiológicas, sendo prejudicial à dinâmica ovariana, qualidade e competência oocitária de fêmeas bovinas da raça Gir (*Bos indicus*).

3 OBJETIVOS

Geral

- Avaliar o efeito do estresse calórico materno sobre a qualidade e competência *in vitro* de oócitos de fêmeas da raça Gir (*Bos indicus*).

Específicos

- Avaliar o efeito do estresse calórico em fêmeas da raça Gir (*Bos indicus*) sobre:
 - as respostas fisiológicas.
 - as concentrações plasmáticas de Cortisol e Progesterona.
 - as características ovarianas e o desenvolvimento folicular.
 - a recuperação, qualidade e competência *in vitro* de oócitos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O ESTRESSE CALÓRICO EM BOVINOS

Estresse significa estar sob a ação de estímulo. Em seres vivos, os diversos constituintes do meio ambiente são responsáveis pelo estresse, e a tensão causada vai depender das características e propriedades do agente estressor. Então, estresse térmico é definido como a tensão exercida pelos componentes do ambiente térmico sobre um organismo, determinando uma reação fisiológica proporcional à intensidade do estímulo aplicado e à capacidade de compensação do organismo (SILVA, 2000), resultando em hiperfunção da glândula adrenal e do sistema nervoso simpático, com objetivo de adaptar o indivíduo à nova situação de estresse. Assim, considera-se que o estresse está relacionado com a resposta de adaptação (LAY JR; WILSON, 2005).

A zona de conforto para bovinos representa uma faixa de temperatura ambiente na qual o esforço termorregulatório é mínimo (BAÊTA, 1985) e o animal obtém a eficiência máxima de produção (NÃÃS; SOUZA, 2003). Quando a temperatura ambiente ultrapassa esse limite, ocorre redução gradativa na eficiência dos processos de perda de calor e o bovino entra em estresse calórico que é o somatório de forças externas que atuam nos animais homeotérmicos a fim de deslocar sua temperatura corporal do estado de repouso (HANSEN; ARECHIGA, 1999).

Sob o aspecto reprodutivo, o estresse é definido como a condição na qual determinado animal é exposto a alterações ambientais que impedem a expressão do seu máximo potencial, dentre as quais se encontram prioritariamente o estresse calórico e nutricional e a alta produção de leite (DOBSON et al., 2001; RENSIS; SCARAMUZZI, 2003).

4.2 FATORES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO ESTRESSE CALÓRICO

4.2.1 Raça

Ambientes quentes e úmidos, principalmente durante o verão em regiões subtropicais ou mesmo durante quase todo o ano em regiões tropicais, diminuem o desempenho reprodutivo, desenvolvimento ponderal e a produção de leite, em menor grau nos zebuínos (*Bos indicus*) do que nas raças não adaptadas (*Bos taurus*). (FERRELL; JENKINS, 1998; HANSEN, 2004).

Devido aos animais *Bos indicus* serem originários e freqüentemente criados em ambientes com cargas de calor excessivas, eles tendem a ser também menos exigentes nutricionalmente e a responderem melhor do que *Bos taurus* em ambientes com algum grau de restrição nutricional (GAUGHAN et al., 1999). Esta característica está provavelmente associada a diferenças anatômicas e fisiológicas presentes em zebuínos que potencializam a perda de calor (FINCH, 1986). Quanto às respostas fisiológicas, os animais *Bos indicus* e seus cruzamentos também se mostraram proporcionalmente mais tolerantes a elevadas temperaturas, tendo demonstrado habilidade de dissipar calor e aumentar a sudação, fenômenos associados à perda evaporativa (Gaughan et al., 1999), ou ainda pela menor produção de calor endógeno, proveniente do menor metabolismo basal (BLACKSHAW; BLACKSHAW, 1994).

O efeito da raça na qualidade do oócito bovino torna-se mais evidente quando associado às condições ambientais em que os animais são mantidos. Rocha et al. (1998) observaram que vacas da raça Brahman (*Bos indicus*) não apresentaram diferença no percentual de oócitos viáveis e desenvolvimento embrionário *in vitro* entre as estações fria e quente. Já a raça Holandesa (*Bos taurus*) não apresentou diferença em relação à raça Brahman quanto às mesmas variáveis na época fria, sofrendo, entretanto, um acentuado decréscimo na estação quente.

De maneira semelhante, o estresse térmico induzido em embriões em estágio de 4 e 8 células diminuiu a produção de blastocistos em oócitos fecundados *in vitro* de fêmeas Holandesas e Angus, porém, o efeito foi menor naqueles coletados de Brahman (BLOCK et al., 2002; PAULA-LOPES et al., 2003; HERNÁNDEZ-CERÓN et al., 2004; BARROS et al., 2006).

Já é sabido que raças *Bos indicus* possuem maior habilidade em controlar a temperatura corpórea (HANSEN, 2004). Essa característica pode ser uma adaptação genética em nível celular, que permite aos embriões *Bos indicus* sobreviverem em ambientes mais quentes (PAULA-LOPES et al., 2003).

4.2.2 **Lactação**

Dentro da faixa de conforto há maior possibilidade dos bovinos expressarem seu máximo potencial produtivo e reprodutivo. A máxima produção de leite em vacas *Bos taurus* ocorre quando a temperatura ambiente se encontra entre 4°C e 24°C (HAHN, 1999). Neste ambiente os animais são capazes de balancear prontamente a produção e a dissipação de calor, sendo que, acima deste ponto, observa-se redução marcante no desempenho (ROENFELDT, 1998; LAY JR.; WILSON, 2005).

Em condições climáticas satisfatórias não têm sido demonstrado efeito da produção de leite, número de lactações ou dias em lactação sobre o desempenho reprodutivo de bovinos. Em resposta ao estresse calórico, ocorre redução no consumo de alimento, produção de leite e aumento na temperatura corporal e frequência respiratória, além da ocorrência de baixa fertilidade (WEST, 2002).

Embora a incidência de disfunções ovarianas em vacas de alta produção seja alta, acredita-se que isto seja devido à sobreposição de fatores tais como intenso estresse metabólico associado ao estresse calórico. Nestes animais, há aumento da temperatura corporal, e o número de inseminações necessárias por concepção é 3,9 vezes maior no período do verão (WILTBANK et al., 2002; DOBSON et al., 2003; LÓPEZ-GATIUS et

al., 2005). Adicionalmente, embriões coletados de vacas em alta produção de leite apresentaram redução na taxa de fertilização de oócitos (55,3%) e no percentual de embriões viáveis (33,3%; HANSEN, 2000).

O estresse metabólico adicionado aos potenciais efeitos do calor podem originar desequilíbrio endócrino e comprometer a foliculogênese (LÓPEZ-GATIUS et al., 2005). Vacas com alta produção ovulam folículos maiores, porém, tem baixas concentrações de estradiol circulantes, além de um corpo lúteo de maior volume com pouca capacidade de produzir progesterona (LOPEZ, 2004; WILSON et al., 1998a,b) e, comumente, falhas no processo de dominância folicular e ovulação (FRICKE; WILTBANK, 1999; SARTORI et al., 2002).

Sangsritavong et al. (2002) relataram que o metabolismo de estrógeno e progesterona foi até 2,3 vezes maior em vacas lactantes do que em não-lactantes. Pesquisas recentes sugerem que algumas das alterações reprodutivas em vacas leiteiras sejam devidas ao aumento no metabolismo de esteróides e elevação no fluxo sanguíneo hepático causados por incremento no consumo de matéria seca (WOLFENSON et al., 1997; WILSON et al., 1998; SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006).

4.3 RESPOSTA FISIOLÓGICA FRENTE AO ESTRESSE CALÓRICO

A resposta fisiológica frente ao estresse é um conjunto mecanismos ativados para restabelecer o equilíbrio, resultantes da adaptação ou aclimatação a alguma mudança significativa (BACCARI JR., 1987a). A capacidade de adaptação está relacionada à diversidade genética, mostrando que fatores estressantes podem ser mais prejudiciais a alguns indivíduos do que a outros. A idade, estado de saúde, condicionamento físico e fatores nutricionais influenciam a vulnerabilidade dos animais aos agentes estressores (HAHN, 1999).

Os bovinos regulam a temperatura corporal por meio de um mecanismo que tenta igualar o fluxo de calor metabólico produzido de acordo com a produção de calor do ambiente ao redor. Na zona de termoneutralidade a homeotermia é mantida pelos processos de produção e perda de calor como, condução, convecção, radiação e evaporação. A magnitude de perda de calor por condução e convecção é dependente da área de superfície por unidade de peso corporal, isto é, a magnitude do gradiente térmico entre o animal e o ar, e a condutibilidade do calor do interior do corpo para a pele e da pele para o ar. A troca de calor através da radiação depende, além da área de superfície, das propriedades reflexivas da pele ou pêlo. Pêlos claros, finos e brilhantes sobre a pele refletem uma maior proporção da radiação solar incidente quando comparados a pêlos escuros ou mais densos, ou mesmo a lã (STEWART¹, 1953 apud HANSEN et al., 2004, p. 35; FINCH, 1986; HANSEN, 1990).

Além disso, os zebuínos têm glândulas sudoríparas de maior volume e em maior densidade por área de superfície da pele, o que favorece o processo de perda evaporativa (ALLEN et al., 1963). Estas características condicionam maior tolerância às variações climáticas do ambiente, verificando resultados positivos na adaptação dos animais *Bos indicus* ao ambiente (TURNER, 1964).

Armstrong (1994) sugeriu um índice de conforto térmico desenvolvido por Kelly e Bond (1971), em que se utiliza a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar, gerando uma escala denominada Índice de Temperatura e Umidade (ITU; ver Anexo A). Armstrong (1994) classificou o estresse térmico de acordo com a variação do ITU em ameno ou brando (72 a 78), moderado (79 a 88) e severo (89 a 98). ITU abaixo de 72 caracteriza um ambiente sem estresse pelo calor.

4.3.1 **Consumo de matéria seca e balanço energético**

O estresse calórico afeta o desempenho reprodutivo tanto por ação direta sobre os órgãos reprodutivos quanto indiretamente, mediado por alterações no balanço

¹ STEWART, R. E. Absorption of solar radiation by the hair of cattle. **Agric. Eng.** v. 34, p. 235–238, 1953.

energético. O aumento da ingestão de água e a redução no consumo de matéria seca são marcantes em animais com estresse calórico (BLACKSHAW; BLACKSHAW, 1994; WEST et al., 2000; RONCHI et al., 2001).

O mecanismo fisiológico do aumento da ingestão de água é mediado pelo aquecimento da área pré-ótica anterior do hipotálamo, tendo como resposta a sede e, em longo prazo, a depleção nos estoques de água devido à demanda evaporativa e indução de hipovolemia e hiperosmolaridade (ANDERSSON² et al., 1960 apud BEATTY et al., 2006, p. 983).

Ambientes com temperaturas extremas, de calor ou frio, promovem alteração na taxa de metabolismo basal devido à necessidade de manter a temperatura corporal dentro dos limites fisiológicos (SHEARER; BEEDE, 1990). A redução no consumo de matéria seca é uma estratégia do organismo que consiste em declinar a taxa metabólica e, conseqüentemente, a produção de calor endógeno, na tentativa de manter o equilíbrio ou balanço entre o calor interno e do ambiente externo (TURNER; TAYLOR, 1983). Tal alteração conduz a uma condição de balanço energético negativo que tem como efeito o decréscimo nas concentrações de insulina, glicose, IGF-1 e aumento nas concentrações de GH e ácidos graxos não esterificados (LUCY et al., 1992; JOLLY et al., 1995).

Respostas metabólicas atuam no eixo hipotálamo-hipófise-gônada mediando os efeitos inibitórios sobre a dinâmica ovariana e conseqüentemente sobre a competência oocitária (SCARAMUZZI, 2003; ADAMIAK, 2005; RENSIS; WILTBANK et al., 2006). A insulina é requerida para o desenvolvimento folicular e tem efeito benéfico sobre a qualidade oocitária (O'CALLAGAN; BOLAND, 1999). A glicose e o IGF-1 também são estimuladores do crescimento folicular e estão envolvidos tanto no metabolismo intra-ovariano como na regulação hormonal, principalmente na modulação dos pulsos de LH e ovulação (RABIEE et al., 1997).

² ANDERSSON, B.; LARSSON, S.; PERSSON, N. Some characteristics of the hypothalamic "drinking centre" in the goat as shown by the use of permanent electrodes. **Acta Physiol. Scand.**, v. 50, p. 140-152, 1960.

4.3.2 **Resposta clínica**

Bovinos são capazes de manter a temperatura corporal relativamente constante apesar das grandes flutuações na temperatura ambiental. Essa habilidade para estabilizar a produção de calor corpóreo dentro de limites estreitos é essencial para as reações bioquímicas e processos fisiológicos associados ao metabolismo normal (SHEARER; BEEDE, 1990). A temperatura corporal fisiológica de bovinos adultos varia de 38,0 °C a 39, 0°C (PIRES, 1997), sendo utilizada como índice de adaptabilidade aos ambientes quentes, já que seu aumento indica insuficiência no mecanismo de dissipação de calor (MOTA, 1997).

A frequência respiratória é uma variável muito sensível ao aumento da carga térmica ambiental, sendo mobilizada logo após os mecanismos de vasodilatação e sudação (BACCARI JR., 2001). Alterações nas condições climáticas, como temperatura, umidade, radiação solar, velocidade dos ventos, estação do ano, hora do dia e sombreamento afetam a frequência respiratória (PIRES et al., 1998). Nas condições termoneutras, bovinos apresentam de 12 a 36 movimentos respiratórios por minuto (SMITH, 1993).

A adaptação das raças zebuínas aos trópicos favorece seus mecanismos termorregulatórios quando comparados aos animais taurinos de clima temperado. Foi verificado que *Bos indicus* nascidos no Brasil, apresentam média de 15 movimentos respiratórios por minuto enquanto *Bos taurus* nascidos no Brasil apresentam frequência respiratória de 35 movimentos por minuto, evidenciando que os bovinos tendem a adaptar, também, seu parâmetro respiratório ao ambiente a que são submetidos (CARVALHO et al., 1995).

A pele também contribui para a manutenção da temperatura corporal mediante trocas de calor com o ambiente. A vascularização da pele e a sudorese dependem das condições ambientais de temperatura, umidade e vento (CUNNINGHAM, 1999).

Em instalações climatizadas, a temperatura da superfície corporal pode variar de 31,6°C a 34,7°C sem indicar exposição ao estresse calórico (MARTELLO, 2002). Sob altas temperaturas a evaporação via trato respiratório e superfície cutânea são os principais mecanismos de dissipação de calor em bovinos. (FINCH, 1986).

A taxa de sudação, em bovinos, depende da umidade relativa do ar, temperatura da pele, além de densidade, tamanho e funcionalidade das glândulas sudoríparas, e espessura do pelame (SILVA, 1999). A distribuição das glândulas sudoríparas e a taxa de sudação não são homogêneas na superfície corporal e algumas regiões apresentam densidade folicular e, portanto, glandular, maior que outras (SILVA, 2000). A taxa de sudação é uma característica que difere entre raças e entre indivíduos da mesma raça, sendo que a variação entre as regiões do corpo do bovino chega a 300%, e ocorre com maior intensidade na área flanco (SCHLEGER; TURNER, 1965; SCHLEGER; BEAN, 1971; SILVA, 2000).

4.3.3 **Resposta endócrina e desenvolvimento folicular**

Fisiologicamente, após o processo de seleção folicular, o folículo dominante exerce um efeito transitório que impede o crescimento dos demais folículos do *pool* recrutado por meio de supressão da síntese e liberação de FSH na adeno-hipófise (GOOD et al., 1995). A queda dos níveis de FSH é causada pela ação combinada da inibina e do estradiol, produzidos por folículos maiores que cinco milímetros (GIBBONS; WILTBANK; GINTHER, 1997), através de retroalimentação negativa (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004) sobre a hipófise (WEBB et al., 1999).

O mecanismo endócrino responsável por alterações na dinâmica e na expressão da dominância folicular em animais sob estresse calórico é muito complexo e não totalmente esclarecido. Considera-se que o estresse calórico reduz a capacidade biossintética das células da teca interna (produção de androstenediona) e da granulosa (produção de estradiol), ocasionando, por conseguinte, a diminuição dos níveis de

inibina. Desta forma, a baixa secreção de estradiol e inibina favorece de forma sinérgica o surgimento de altas ondas de FSH (WOLFENSON et al., 1997; ROTH et al., 2000).

Este efeito sobre a fisiologia ovariana foi observado tanto imediatamente após o estresse quanto em longo prazo, manifestando diminuição da dominância folicular, ovulação de oócitos provenientes de folículos dominantes envelhecidos e alta incidência de duplas ovulações (RYAN; BOLAND, 1991; ROTH et al., 2000, SARTORI et al., 2004; WILTBANK et al, 2006).

Em condição de estresse calórico sazonal (BADINGA et al., 1993) ou induzido (ROTH et al., 2000) foi observado aumento no número de folículos médios (6 a 9mm) e grandes (>9mm), o que caracterizou ineficiência no processo de dominância folicular. Em vacas lactantes, um processo similar de múltipla ovulação é comum e ocorre devido ao alto metabolismo dos esteróides sexuais (estradiol e progesterona), com conseqüente aumento nos pulsos de FSH e LH, e codominância folicular, podendo alcançar até 63,5% de duplas ovulações no verão (SARTORI et al., 2002; LOPEZ et al., 2004; WILTBANK et al., 2006). Não obstante, a maioria dos estudos reporta que as concentrações de LH estão diminuídas pelo estresse calórico (GILAD et al., 1993), e por isso, Rensis e Scaramuzzi (2003) sugerem que, no verão, os folículos dominantes se desenvolvem sob baixos níveis de LH e isso resulta em redução na secreção de estradiol folicular e inibina, pobre expressão de estro e fertilidade reduzida.

Vacas submetidas a um agudo estresse calórico no início de uma onda folicular, sofrem um comprometimento no desenvolvimento e na esteroidogênese folicular por várias semanas após o estresse (BADINGA et al., 1993; ROTH et al., 2001b). Roth et al. (2001b) observaram que o estresse agudo (36°C e 60% umidade) por 12 horas durante os dias 2 a 6 do ciclo estral em vacas holandesas ocasionou alterações na função das células foliculares após 20 a 26 dias, com diminuição das concentrações de estradiol (granulosa) e androstenediona (teca). Cálculos realizados segundo Lussier, Matton e Dufour (1987) demonstraram que os folículos médios (7,7mm) e pré-ovulatórios (15,2mm) com baixa esteroidogênese, tinham previamente diâmetro de 0,5 a 1,0mm na ocasião em que as fêmeas foram estressadas, podendo estar particularmente sensíveis a alterações ambientais na fase de intenso índice mitótico de

células da granulosa, e manifestarem efeito negativo na fase pré-ovulatória (ROTH et al., 2001b).

O estresse calórico, tanto em novilhas quanto em vacas lactantes, favorece a inibição do folículo dominante, com conseqüente atraso na luteólise e ovulação (WILSON et al., 1998a,b). Sartori et al. (2002) observaram que, no verão, vacas em lactação apresentaram menor pico de estradiol, atraso na ovulação e baixas concentrações de progesterona no dia 6 após a ovulação, quando comparadas a novilhas. Este efeito de lactação sobre os esteróides sexuais não foi observado no período do inverno, comprovando que o efeito do calor pode ser preponderante para determinar tais alterações, principalmente quando associado à lactação (WILSON et al., 1998; SARTORI et al., 2002).

Os estudos específicos realizados com dosagem de progesterona em bovinos sob estresse calórico são, em sua maioria, conflitantes. Fêmeas zebuínas não apresentaram variação sazonal nas concentrações de progesterona no diestro (RUBIO et al., 1989,1993; MANJARREZ et al., 2000). Já Howell et al. (1994) e Ronchi et al. (2001) observaram redução nas concentrações de progesterona durante o diestro de vacas e novilhas com estresse calórico sazonal e induzido, respectivamente. Wolfenson et al. (2002) reportaram que as concentrações de progesterona no meio da fase luteínica de vacas lactantes foram em média 1,5ng/mL mais baixas no verão do que no inverno ($P < 0,05$). Os mesmos autores ainda comprovaram que os efeitos crônicos do estresse calórico são deletérios às células foliculares e conseqüentemente às células luteínicas originadas a partir destas, sendo as células da teca luteinizadas mais susceptíveis do que as células da granulosa luteinizadas. Esta baixa produção de progesterona em condições de estresse calórico já foi sugerida como conseqüência do menor número de células luteínicas ou, ainda, da diminuição do substrato de colesterol como precursor da síntese de progesterona devido ao metabolismo lipídico prejudicado (YOUNAS et al., 1993; WOLFENSON et al., 1997; STAPLES et al., 1998; RONCHI et al., 1999).

De modo contrastante, numa pesquisa recente foram demonstradas altas concentrações de progesterona entre os dias 11 e 21 do ciclo em novilhas submetidas

a estresse calórico, com decréscimo nos níveis de estradiol e interrupção no mecanismo luteolítico natural (WILSON, 1998).

A dosagem das concentrações de cortisol no sangue é comumente usada como um indicador de estresse, embora precaução seja aconselhada, considerando que o seu aumento não é induzido por qualquer tipo de agente estressor (CHRISTISON; JOHNSON, 1972). Ronchi et al. (2001) reportaram diminuição nas concentrações de cortisol plasmático em bovinos expostos a estresse calórico. A redução do cortisol é relacionada a um mecanismo de adaptação e a hidrocortisona é um hormônio termogênico, assim, a redução na atividade adrenocortical sob ação do calor é considerada um mecanismo termorregulatório para prevenir aumentos na produção de calor metabólico (CHRISTISON; JOHNSON, 1972).

Wise et al. (1988) afirmam que o estresse calórico pode ocasionar também um aumento nas concentrações plasmáticas de cortisol, influenciando negativamente a síntese e secreção ovariana de esteróides sexuais. Contudo, outros autores afirmam que este aumento está mais relacionado ao estresse agudo durante o manejo, transporte ou parto (LAMMOGLIA et al., 1997; SMITH; DOBSON, 2002).

4.3.4 **Resposta celular e molecular**

As diferenças genéticas quanto à termotolerância ocorrem desde o nível celular, desencadeando uma série de eventos em resposta aos efeitos deletérios da alta temperatura sobre a função celular, que também são mais pronunciados em *Bos taurus* do que em *Bos indicus* (MALAYER; HANSEN, 1990; PAULA-LOPES et al., 2003; HERNÁNDEZ-CERÓN; CHASE JR.; HANSEN, 2004).

As alterações celulares associadas ao choque térmico são resultantes de um processo multifatorial que envolve alterações no percentual de ácidos graxos da membrana lipídica do oócito, células do cúmulus e fluido folicular, bem como a inibição da síntese de substâncias antioxidantes como a Glutathione e de algumas proteínas responsáveis pela termo-tolerância (EDWARDS; HANSEN, 1996; 1997; ZERON et al.,

2001; PAULA-LOPES et al., 2003; AL-KATANANI; HANSEN, 2002). Uma importante função das células do cúmulus é a produção de algumas dessas proteínas que são denominadas HSPs ou proteínas de choque térmico (AL-KATANANI; HANSEN, 2002). As HSPs podem ser classificadas em dois grupos principais, as formas constitutivas e as induzidas. As HSPs sintetizadas sem necessidade de estímulo estressante, são as constitutivas, enquanto que as HSPs induzidas são aquelas que somente são sintetizadas sob estímulo do calor ou outro agente estressor (JU, 2005).

No caso do estresse térmico e em certos estados patológicos ocorre ativação de fatores de choque térmico (HSFs) que adentram o núcleo celular se ligando aos elementos de choque térmico (HSEs). Os HSEs representam o sítio de ligação ao DNA para ativação e expressão dos genes de choque térmico e síntese das HSPs (JU, 2005). Com grande destaque, encontra-se a HSP70, cuja síntese está associada à resistência celular ao choque térmico e têm sido descrita como importante suporte ao desenvolvimento normal de oócitos e embriões bovinos *in vitro* (EDWARDS; HANSEN, 1996,1997; AL-KATANANI; HANSEN, 2002). Foi demonstrado que embriões bovinos podem sofrer transcrição de HSP70 em resposta ao choque térmico já na fase de duas células. Ainda, sabe-se que a expressão gênica embrionária pode ser modificada em resposta a alterações do ambiente, o que provavelmente é uma tentativa do embrião para estabilizar sua função celular (CHANDOLIA et al., 1999).

Recentes pesquisas demonstraram que os efeitos do estresse calórico afetam as propriedades físicas e bioquímicas das membranas celulares, conferindo diferenças na morfologia de oócitos no inverno em relação ao verão, e ainda, um maior teor de ácidos graxos saturados no verão e de polinsaturados no inverno (ZERON et al., 2001). A exposição ao choque térmico, além disso, ocasiona alterações ultra-estruturais observáveis em oócitos e embriões, dentre as quais estão a redistribuição de organelas da membrana em direção ao núcleo celular e agregação citoplasmática, vacuolização e rompimento da membrana e/ou matriz mitocondrial, culminando num processo de apoptose e morte celular (LIU et al., 2000; RIVERA et al., 2003a,b). O choque térmico também diminui a viabilidade da resposta imune e causa apoptose linfocitária (KAMWANJA et al., 1994; PAULA-LOPES et al., 2003), além de causar severas respostas em células endometriais (MALAYER; HANSEN, 1990).

Uma pesquisa recente mostrou que o choque térmico não induziu apoptose em embriões de 2 a 4 células e a resposta dos embriões de 8 a 16 células dependeu do momento da indução do choque térmico em relação à fecundação. Foi ainda observado que a pré-exposição a estresse calórico moderado (40°C/ 80 min.) bloqueou a resposta apoptótica ao choque térmico severo subsequente (41°C/ 9 h), mostrando que a apoptose é um fenômeno que pode ser prevenido pela indução de termotolerância. (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002)

4.3.5 **Gametas e embriões**

O crescimento do oócito dentro do folículo é um processo lento que leva em torno de 4 a 5 meses em bovinos, desde o recrutamento do *pool* primordial até a fase pré-ovulatória (WEBB et al., 2004). Durante esse período, os fatores de crescimento locais são importantes para o desenvolvimento inicial e as gonadotropinas são essenciais nos estágios finais de crescimento e ovulação (WEBB et al., 2004). Assim o oócito adquire competência para sofrer a maturação meiótica, por meio de uma interação entre esse gameta e as células da granulosa e teca que o circundam (MIYANO, 2003; CECCONI et al., 2004). A qualidade do oócito é, portanto, relacionada ao ambiente folicular em que este se encontra.

O oócito é o gameta que contribui não só com metade do material genético, mas também com praticamente todo o citoplasma do zigoto recém-formado, fornecendo transcritos e proteínas necessárias para o desenvolvimento embrionário inicial (DE SOUSA et al., 1998; SCHULTZ, 2002). Este ambiente citoplasmático oferece condições para que o genoma recém-formado possa ser ativado e dê continuidade ao desenvolvimento. Considerando que a ativação apropriada do genoma embrionário é peça chave para o desenvolvimento posterior do embrião, a qualidade do oócito torna-se essencial para o desenvolvimento embrionário não só até a ativação do genoma, mas também para os estádios posteriores (SCHULTZ, 2002).

Ju (2005) considera improvável que a inseminação de raças européias com sêmen de zebu possa produzir embriões termotolerantes com potencial para melhorar efetivamente a fertilidade durante os períodos de estresse calórico. A capacidade de transcrição gênica em resposta a elevadas temperaturas parece ser importante para a expressão de diferenças genéticas, pois não foi demonstrada nenhuma diferença entre a resistência de embriões Brahman e Holandês na fase de duas células (KRININGER III et al., 2003), onde o genoma embrionário ainda é inativo (MEMILI; FIRST, 2000). Nesta fase, os embriões são muito sensíveis à elevação de temperatura, porém, sua termotolerância é dependente do genótipo do oócito e não do espermatozóide (EDWARDS; HANSEN, 1997; KRININGER III et al., 2003).

Embriões produzidos *in vitro* provenientes de oócitos Brahman ou Nelore fertilizados com espermatozoides Angus foram mais tolerantes ao estresse calórico do que aqueles produzidos a partir de oócitos de doadoras Holandesas com sêmen Angus ou Nelore (BLOCK et al., 2002; BARROS et al., 2006;). Por outro lado, embora a qualidade intrínseca do oócito seja apontada como crucial para o desenvolvimento embrionário (BLOCK et al., 2002; WARD et al., 2001), Barros et al. (2006) consideraram que o sêmen de reprodutores de raças termotolerantes pode ser usado como recurso para aumentar os índices de prenhez em fêmeas de raças mais susceptíveis criadas em altas temperaturas. A hipótese de Barros et al. (2006) se baseia nos achados de Eid, Lorton e Parish (1994) e Comizzoli et al. (2000), que verificaram que ambos os pronúcleos, materno e paterno, modulam o início e a duração da síntese de DNA ainda antes da primeira mitose.

Quanto à viabilidade pós-fecundação, oócitos bovinos submetidos a choque térmico de 40 a 42°C por 1 hora não sofreram efeito na subsequente formação de blastocistos *in vitro*. Entretanto, quando mantida alta temperatura por 12 horas houve diminuição significativa no desenvolvimento embrionário (EDWARDS; HANSEN, 1997; JU et al., 1999). O mesmo foi observado quando se expôs embriões *Bos taurus* ou *Bos indicus* de duas células por período superior a três horas (EALY et al., 1995; KRININGER III et al., 2003).

Freitas (2002) e Paula-Lopes et al. (2003) comprovaram que embriões *Bos indicus* são mais resistentes do que embriões *Bos taurus* quando submetidos a choque térmico

12 horas pós-inseminação *in vitro* (hpi) e que ambos são mais resistentes ao choque térmico 48-80 hpi do que 12 hpi.

Wolfenson et al. (1997) sugeriram que o efeito sazonal pode expressar outros fatores de variação independentes da temperatura, caracterizando também um efeito prolongado do estresse sobre a fisiologia ovariana.

Segundo Al-Katanani et al. (2002), o efeito do estresse calórico sazonal se mantém mesmo após climatização artificial dos animais por período relativo a dois ciclos estrais. Os referidos autores coletaram, em matadouro, oócitos de vacas da raça holandesa previamente submetidas a climatização artificial por 42 dias durante a estação quente (verão) e observaram que a taxa de blastocistos foi similar àqueles de vacas sem climatização (verão) e que, ambos, apresentaram menor competência *in vitro* em relação a oócitos coletados na época de conforto térmico (inverno).

Os resultados acima citados seguem a premissa de que pequenos folículos antrais necessitam de pelo menos 40 a 45 dias para desenvolverem-se até a fase pré-ovulatória (LUSSIER; MATTON; DUFOUR, 1987) e que os mesmos demonstram baixa capacidade esteroidogênica e baixa competência oocitária quando expostos a estresse calórico previamente ou durante a fase antral (WOLFENSON et al., 1997).

Considera-se, ainda, que folículos primários iniciam o seu crescimento em torno de 85 dias antes da ovulação, sendo, portanto, susceptíveis ao estresse calórico em fases precoces, o que pode manter a baixa qualidade dos oócitos por até quatro ciclos estrais após o início da estação fria e causar freqüentes insucessos nas técnicas de reprodução assistida como a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIV) no verão, bem como nos primeiros meses frios do outono (PICTON et al., 1998; MCNATTY et al., 1999; ROTH et al., 2000).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LOCAL E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O presente experimento foi conduzido no Campo Experimental Santa Mônica (CESM), pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado a 22°21' de latitude sul e 43°42' de longitude oeste, a uma altitude média de 364m, situado no distrito de Barão de Barão de Juparanã, município de Valença-RJ.

Foram utilizadas dez fêmeas bovinas da raça Gir (*Bos indicus*), multíparas, não-lactantes, com escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 4,0 ($2,95 \pm 2,0$, segundo Ferreira & Torres, 1993), peso entre 321 e 476 ($395,1 \pm 16,5$ kg). Os animais foram previamente selecionados quanto ao *status* reprodutivo (presença de corpo lúteo) e número similar de folículos visualizados ultra-sonograficamente nos ovários em três exames consecutivos (intervalos de sete dias) para minimizar o efeito individual sobre as variáveis estudadas. Somente fêmeas cíclicas e com no mínimo dez folículos visíveis em ambos os ovários foram incluídas no experimento. As fêmeas não haviam sido previamente submetidas a qualquer tipo de punção folicular/ovariana.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Durante todo o experimento, os animais foram submetidos a sessões de aspiração folicular (OPU) com intervalos de sete dias (Figura 1). Inicialmente, os animais foram alocados em sistema *tie-stall* sem controle de temperatura e umidade por um período adaptativo de 28 dias (dias -28 a -1), tendo sido submetidas a duas sessões de OPU/fêmea (Fase I/ pré-tratamento/ dias -14 e -7). Na Fase II (fase tratamento/ dias 0 a 28) os animais foram divididos em Grupo Controle (**GC**/n=5) e Grupo Estresse

(**GE**/n=5). A distribuição dos animais em cada um dos grupos experimentais foi realizada homogeneamente utilizando-se as informações individuais obtidas na Fase I. Cada tratamento recebeu animais com similares ECC, peso corporal, número de folículos visualizados, CCO's recuperados e taxas de blastocistos. Durante a Fase II, o **GC** permaneceu em normotermia, enquanto que o **GE** foi submetido a estresse calórico em câmara climática com temperatura de 38°C e umidade relativa de 80% durante o dia, e temperatura de 30°C com umidade relativa de 80% durante a noite, por 28 dias, procedendo-se, nesta fase, cinco sessões de OPU/fêmea. Ainda, na Fase II os animais do **GE** permaneceram na câmara climática sob luminosidade de luz incandescente por 12 horas, durante o dia, e sem luminosidade por 12 horas, durante a noite. Na Fase III (pós-tratamento/ dias 28 a 147) todas as fêmeas retornaram à normotermia (ambiente), sendo realizadas mais 17 sessões de OPU/fêmea. Nesta Fase os animais ainda permaneceram por 14 dias estabulados em instalações similares às do **GC** e, posteriormente, os animais de ambos os tratamentos foram reagrupados num único lote e manejados em regime de pastejo extensivo (*Brachiaria brizantha*), com suplemento mineral e água *ad libitum* até o término do experimento.

No total, foram realizadas 232 sessões de OPU, perfazendo 125 vs. 107 sessões para os grupos Controle e Estresse, respectivamente. A primeira sessão de OPU referente à Fase II (Dia 0) foi realizada 24 horas após o início da indução térmica experimental e a primeira sessão referente à Fase III (Dia 35) foi realizada sete dias após o término da indução térmica experimental. Nas Fases II e III propôs-se avaliar, respectivamente, os efeitos imediato e tardio do estresse calórico severo sobre as variáveis fisiológicas e hormonais, dinâmica folicular, qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões.

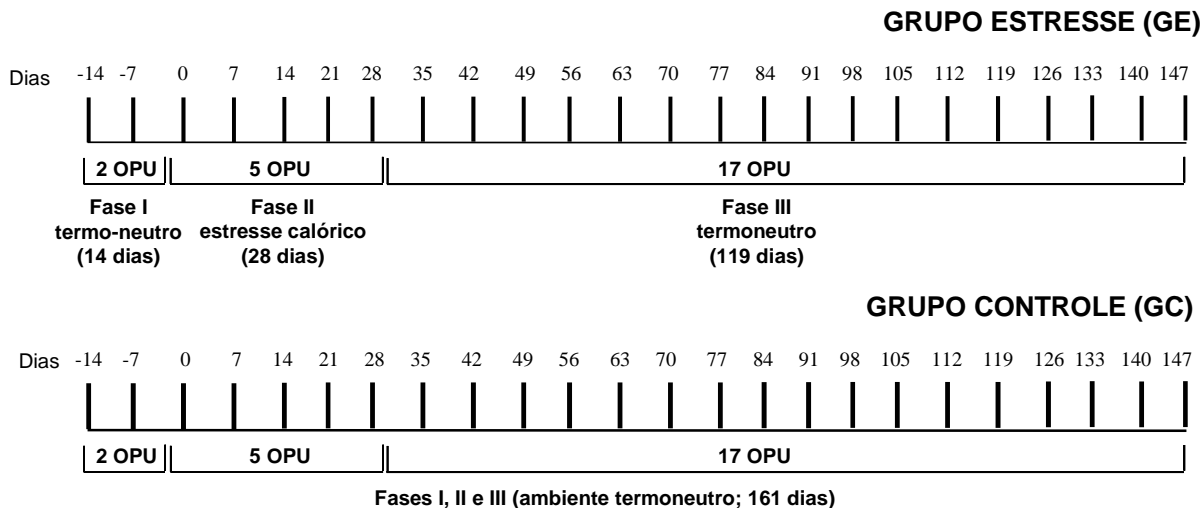


Figura 1 - Diagrama esquemático das diferentes fases de indução térmica experimental e sessões de aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental

5.3 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLIMÁTICAS

Foram obtidos os dados climatológicos históricos registrados na estação meteorológica do CESM – Embrapa no período de janeiro a dezembro do ano de 2005. A estação meteorológica se localizava a 500m das instalações experimentais e as temperaturas de bulbo seco (TBS) e bulbo úmido (TBU) média, máxima e mínima ali colhidas foram utilizadas para análise retrospectiva das condições climáticas nos períodos pré-experimental e experimental.

Num abrigo termométrico, localizado na área experimental, foram instalados um psicrômetro para medida da temperatura de bulbo seco (TBS) e temperatura de bulbo úmido (TBU) no ambiente.

Dentro da câmara climática foram instalados quatro psicrômetros fixados ao teto e suspensos à 1,70m de altura em relação ao nível do solo. Os psicrômetros foram estrategicamente alocados próximo à porta, torneira, canto e cocho da câmara (Apêndice A), dos quais foi extraída uma média para as análises de TBS e TBU.

A umidade relativa do ar (UR) foi expressa em percentual (%) e obtida em tabelas meteorológicas a partir dos registros de temperatura de bulbo seco e temperatura de bulbo úmido. A coleta dos dados climáticos foi realizada diariamente às 8:00h e às 15:00h, durante todo o período experimental.

O índice de temperatura e umidade (ITU) foi calculado para colheita de dados, usando a seguinte fórmula, citada por Kelly; Bond (1971):

$$\text{ITU} = \text{TBS} - 0,55 (1 - \text{UR}) (\text{TBS} - 58)$$

Legenda:

ITU = índice de temperatura e umidade, adimensional

TBS = temperatura do bulbo seco em graus Fahrenheit ($^{\circ}\text{C}/5 = ^{\circ}\text{F} - 32/9$)

UR = umidade relativa do ar expressa em valor decimal

A classificação do estresse térmico de acordo com a variação do ITU foi proposta por Armstrong (1994) está apresentada no anexo A.

5.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FISIOLÓGICA

5.4.1 **Consumo de matéria seca**

O alimento fornecido durante período em que os animais experimentais permaneceram no sistema de manejo tipo *tie-stall* correspondeu a dieta à base de silagem de milho homogeneizada em suplemento concentrado protéico-mineral (2kg/vaca) fornecida duas vezes ao dia (08:00 h e 14:00 h) no intuito de evitar exposição prolongada ao meio ambiente, e água *ad libitum*. Quatorze dias após o início do período adaptativo ao sistema *tie-stall* (pré-experimental) o consumo de matéria seca foi monitorado individualmente por meio da pesagem da mistura completa

fornecida a cada animal, bem como das sobras remanescentes em cada comedouro 24 horas após o fornecimento, calculando-se o consumo diário de dieta completa por subtração. As pesagens da mistura completa oferecida aos animais foram realizadas diariamente em três dias consecutivos de cada semana, no período entre os dias -14 a 42. Para o cálculo do consumo de matéria seca por animal, na ocasião de cada pesagem, foi retirada uma amostra do alimento fornecido e das respectivas sobras de cada animal, tendo sido armazenadas em sacos plásticos de dupla camada e mantidas a -20°C. Ao final de cada semana as amostras foram descongeladas e homogeneizadas numa bandeja plástica, fazendo-se um *pool* semanal. Após a formação do *pool*, uma amostra de ~200g foi retirada, acondicionada em saco de papel e pesada em balança analítica (Mettler PC440 Delta Range®, Brasil) para obtenção do peso úmido, descontando-se o peso do saco de papel (Apêndice B). Após a pesagem, cada amostra foi colocada numa estufa de secagem (Mod. SE315, FANEM, Brasil) a 55°C por 72 horas (Apêndice C) e, após 10 minutos de estabilização com o ar atmosférico, foi novamente pesada em balança analítica para obtenção do peso seco. O cálculo do percentual de matéria seca de cada amostra e do consumo individual de matéria seca por animal estão descritos no apêndice D.

O monitoramento do consumo individual de dieta e matéria seca foi realizado por duas semanas no período pré-tratamento (dias -14 a -1), cinco semanas no período de tratamento (dias 0 a 28) e mais duas semanas no período pós-tratamento (dias 29 a 42). O sumário dos procedimentos semanais para obtenção do consumo de matéria seca está ilustrado no apêndice E.

5.4.2 **Resposta clínica**

As variáveis fisiológicas clínicas frequência respiratória (FR mov./min.), temperatura retal (TR °C) e temperatura da superfície cutânea (TC °C) foram avaliadas em todas as fases experimentais no período da manhã, às 9:00 horas e no período da tarde, às 15:00 horas, sempre 72 e 24 horas antes do dia das aspirações foliculares.

Foram realizadas um total de 747 sessões de exame clínico, sendo 376 no turno da manhã (09:00 h) e 371 no turno da tarde (15:00 h), durante todo o período experimental. Ambos os exames foram realizados com os animais na sombra e com o mínimo manejo e contenção possíveis. Na Fase II todos os exames clínicos e colheitas de sangue nos animais do Grupo Estresse foram realizados dentro da câmara climática.

A FR foi medida simultaneamente por dois examinadores, contando-se o número de movimentos respiratórios no flanco do animal em um período cronometrado de 15 segundos. Multiplicando-se os valores encontrados por quatro obteve-se o número de movimentos respiratórios/minuto. A média da contagem dos dois examinadores foi considerada.

A TR foi obtida com um termômetro clínico digital inserido aproximadamente cinco centímetros em contato direto com a mucosa retal, com os animais contidos em canzins, após o qual os mesmos foram soltos para obtenção da FR e TC.

A TC (°C) foi medida com um termômetro infravermelho digital, portátil, com mira a laser e precisão de 99% (Mod. ST 60 Raytek®, Raytec do Brasil, Brasil; Apêndice F). As medidas foram tomadas a aproximadamente um metro do animal em quatro pontos do corpo do animal: frente, cernelha, virilha e jarrete, obtendo-se ao final a média dos quatro pontos por animal (Apêndice F).

A taxa de sudação (TS) foi avaliada uma vez a cada semana, em média 36 horas após cada sessão de aspiração folicular, apenas na parte da tarde (14:00 horas), empregando-se o método colorimétrico descrito por Schleger e Turner (1965). Este método consiste em tricotomizar e limpar com álcool 70% e éter, uma região de 9 cm² entre a 12^a e 13^a costelas do animal, a aproximadamente 30 cm da região dorsal, e

aplicar discos de papel, de cromatografia, tipo Whatman, nº 1, de 0,5 cm de diâmetro. Para a preparação dos discos, os mesmos foram embebidos em solução de cloreto de cobalto hexa-hidratado (CoCl_2 a 10%) e secos ao ar livre e, em seguida, acondicionados em estufa (Mod. SE315, FANEM, Brasil) entre 80°C e 90°C até atingir a cor azul violácea. Após a secagem, três discos de cada vez eram fixados com fita adesiva transparente a uma lâmina de microscopia de vidro e conservados em dessecador, contendo sílica. Todos os discos foram preparados no mínimo duas horas antes de sua utilização. Em seguida, retirou-se a fita adesiva da lâmina e a fita contendo os discos foi colada sobre a pele limpa e seca. Após a fixação da fita adesiva com os discos na superfície da pele do animal cronometrou-se o tempo gasto, em segundos, para cada disco mudar toda a sua área da cor azul violácea para rosa claro, por ação da infiltração de suor (Apêndice G). Os valores registrados representaram as médias dos tempos registrados nos três discos, sendo, em seguida, aplicados na seguinte fórmula de acordo com Silva (2000):

$$TS = 38446,6019 / t$$

Legenda:

TS é a taxa de sudção em $\text{g/m}^2/\text{hora}$;

t é o tempo médio, em segundos, para mudança de cor dos três discos de papel.

5.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ENDÓCRINA

O perfil endócrino dos animais foi monitorado durante o período experimental pela determinação das concentrações séricas de cortisol e progesterona. Amostras de sangue de cada vaca foram coletadas semanalmente, 16 a 18 horas antes de cada sessão de aspiração folicular, por meio de punção da artéria ou veia coccígeas diretamente em tubos de vácuo de 10mL sem anticoagulante (Vacutainer®, Becton-Dickinson & Company) em temperatura ambiente. Imediatamente após as colheitas,

cada amostra foi centrifugada (3000g por 10 minutos; Centrífuga Excelsa Baby, Fanem[®]), e o soro obtido foi separado e estocado em tubos esterilizados e identificados a uma temperatura de -20°C. As análises foram realizadas pela técnica de Radioimunoensaio utilizando-se kits comerciais para determinação de cortisol e progesterona por I¹²⁵ em fase sólida (Coat-a-Count[®], DPC Medlab) no Laboratório de Dosagens Hormonais – LDH (Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP; São Paulo - SP). As fêmeas foram consideradas em fase folicular quando apresentavam concentração sérica de progesterona <1,0ng/mL e em fase luteínica quando apresentavam concentração de progesterona igual ou >1,0ng/mL. A duração de uma fase luteínica foi definida como o período compreendido entre duas colheitas nas quais se observou concentração de progesterona <1,0ng/mL.

5.6 EXAME OVARIANO E ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SOM

Para a realização do procedimento ultra-sonográfico (1x/semana), primeiramente as fêmeas de ambos os tratamentos foram retiradas de suas áreas de manejo e encaminhadas até o curral em ambiente termo-neutro. Posteriormente foi realizada a contenção mecânica da fêmea em tronco apropriado, remoção das fezes do reto do animal, limpeza da região perineal com água e álcool 70% e posterior secagem da região com papel toalha. Posteriormente foi realizada tranquilização com 1mL de acepromazina 1% IM (Acepran[®], UNIVET, Brasil) e anestesia epidural com 2 a 3mL de cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor (Lidovet[®], Abravet, Brasil). Em seguida, com auxílio de um ultra-som (Scanner 200s, Pie-medical, Holanda) equipado com transdutor setorial intravaginal de 7,5 MHz acoplado a uma guia transvaginal para punção folicular, foram aferidas a população folicular e o diâmetro em milímetros dos dois maiores folículos. Para análise dos dados, foi caracterizada como codominância folicular, a observação de dois ou mais folículos com diâmetro > 9mm em apenas um ou em ambos os ovários de uma mesma doadora. Após as mensurações, todos os folículos com diâmetro \geq 3mm foram puncionados com auxílio de uma agulha

descartável 19 gauge (40mm x 10mm; BD Precision Guide[®], Brasil) conectada à guia do transdutor, que era substituída a cada novo procedimento ou, quando necessário. O procedimento de OPU foi realizado em ordem alternada vaca/tratamento para evitar efeito do tempo entre a colheita e o início da maturação dos CCO's sobre a produção de embriões nos respectivos tratamentos. A aspiração folicular foi realizada por meio de uma bomba de vácuo portátil, calibrada para uma pressão negativa correspondente a um fluxo de 10mL do fluido de aspiração por minuto. O número de folículos efetivamente puncionados também foi aferido para calcular a taxa de recuperação oocitária (número de oócitos recuperados x 100 / número de folículos efetivamente puncionados).

Após o término de todo o procedimento de OPU, os animais de ambos os tratamentos foram encaminhados simultaneamente de volta ao sistema *tie-stall* em ambiente termo-neutro (Controle) ou à câmara climática (Estresse; Fase II).

5.7 COLHEITA, AVALIAÇÃO E TRANSPORTE DOS COMPLEXOS CÚMULUS-OÓCITOS

O conteúdo folicular foi recuperado via um circuito de Teflon (Handlle Cook, Brasil) de 2mm de diâmetro interno e 80cm de comprimento, ligando a agulha diretamente a um tubo plástico de 50mL contendo 15mL de meio Dulbecco's Phosphate Buffered Saline – DPBS (Nutricell[®], Nutrientes Celulares, Brasil), acrescido de 1% de soro fetal bovino (SFB) e 125 UI de heparina sódica/mL (Liquemine[®], Roche, Brasil) com temperatura entre 35 e 37^oC. Finalizado o procedimento de OPU, o tubo de coleta foi conduzido ao laboratório do campo experimental e os complexos *cúmulus*-oócitos foram lavados em um filtro de coleta de embriões com malha de 80 μ (Millipore[®], Bedford, MA, USA). Os complexos *cúmulus*-oócito recuperados foram transferidos para placas de cultivo celular 100 x 20 mm contendo DPBS acrescido de 1% de SFB a 37^oC e avaliados morfológicamente com auxílio de um estereomicroscópio com aumento final de 50X.

Foram utilizados como critérios de avaliação o aspecto do citoplasma quanto a cor, homogeneidade e integridade, presença, número de camadas e grau de expansão das células do *cúmulus*. Foram definidas categorias de classificação dos complexos *cúmulus*-oócitos segundo Costa (1994), conforme descrito no quadro 1.

Quadro 1 - Critérios para a classificação morfológica dos complexos *cúmulus*-oócitos recuperados

Categoria	Descrição
Grau I	complexos <i>cúmulus</i> -oócito compactos apresentando mais de três camadas de células do <i>cúmulus</i> , oócitos com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades.
Grau II	complexos <i>cúmulus</i> -oócito compactos apresentando menos de três camadas de células do <i>cúmulus</i> , oócitos com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades.
Parcialmente desnudos	Oócitos apresentando áreas inferiores a um terço de sua superfície sem células da granulosa.
Desnudos e/ou degenerados	Oócitos apresentando a maior parte ou a totalidade de sua superfície sem células da granulosa e/ou apresentando sinais evidentes de degeneração, como vacuolização intensa ou desintegração do citoplasma.
Expandidos	complexos <i>cúmulus</i> -oócito apresentando expansão das células do <i>cúmulus</i> , com aumento do volume total e aspecto gelatinoso.
Zona pelúcida	Zona pelúcida rompida, sem o conteúdo citoplasmático.

(Fonte: COSTA, 1994)

Quadro 1 - Critérios para a classificação morfológica dos oócitos recuperados

Foram considerados adequados para o cultivo *in vitro* os complexos *cúmulus*-oócitos de grau I e II. Os complexos *cúmulus*-oócitos selecionados foram acondicionados em criotubos plásticos de 1,5 mL contendo meio TCM-199 acrescido de 25 mM de HEPES (Gibco, Rockville, MD, USA), 10% de SFB, 49,4 µg/mL de Piruvato (0,45 mM), 100 UI/mL penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina. Em seguida, os complexos *cúmulus*-oócitos foram mantidos a uma temperatura de 37 a 39°C durante o transporte ao laboratório de Fertilização *in vitro* (CNPGL-Embrapa; Juiz de Fora – MG), por um período máximo de oito horas entre o início das punções foliculares e o início da maturação *in vitro*.

5.8 MATURAÇÃO, FERTILIZAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO*

Os complexos *cúmulus*-oócitos foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em meio TCM-199 acrescido de 10% de soro de vaca em estro e 20µg/mL de FSH, por 22 horas, em estufa incubadora (Forma Scientific[®], Mod. 3130, Thermo Forma, Brasil) à 39°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após a maturação, os oócitos selecionados foram fertilizados com sêmen descongelado, de touros das raças Gir ou Holandesa de semelhante fertilidade *in vitro* comprovada por meio da taxa de clivagem em oócitos obtidos de ovários coletados em matadouro, tendo como pré-requisitos mínimos motilidade pós-descongelamento de 65% e vigor igual ou superior a 3,5 em meio Fert-Talp (Sigma[®], St. Louis, MO, USA) e taxa de clivagem igual ou superior a 70%. Em cada bateria de OPU-FIV, foi utilizado sêmen de um mesmo touro para ambos os tratamentos. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos e colocado em 1mL de meio Sp-TL (Sigma[®], St. Louis, MO, USA), em tubo com tampa, e levado à estufa de CO₂ a 39°C por 1 hora, onde ocorreu a separação dos espermatozóides vivos e mortos pelo método de *swin-up*. Após a incubação, o sobrenadante foi aspirado e transferido para um tubo de 2mL para a centrifugação. O sedimento foi então ressuscitado em meio Fert-Talp acrescido de heparina (10µg/mL). Antes do *swin-up* e após a centrifugação foram realizadas contagens dos espermatozóides e avaliação da motilidade espermática.

A fecundação *in vitro* foi realizada em gotas de 100 µL de meio Fert-Talp acrescido de 10 µg/mL de heparina, cobertas com óleo mineral, com concentração espermática de 2x10⁶ espermatozóides/mL por um período aproximado de 22 horas (PARRISH et al., 1986).

Os possíveis zigotos foram co-cultivados com células da granulosa em meio CR2aa acrescido de 10% SBF, em gotas de 50µL cobertas com óleo mineral. A avaliação da taxa de clivagem e a renovação de 50% do meio foram realizadas 72 horas pós-fecundação (três dias). A taxa de produção de blastocistos foi avaliada 168 horas pós-fecundação (sete dias). Todas as etapas foram realizadas em estufa

incubadora nas mesmas condições da maturação *in vitro*. Foram utilizados grupos de 10 a 30 oócitos por gota de fecundação/cultivo.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS[®] (SAS, 2001). Através do aplicativo GUIDED DATA ANALISYS do SAS[®], os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias, sendo verificada a necessidade de transformação dos dados (logaritmo na base 10 – $\text{Log}_{10} X$; Raiz quadrada – RQ X; Quadrado – X^2), de tal modo que esses atendessem às pressuposições da análise de variância.

As variáveis dependentes de distribuição normal (paramétricas) foram expressas em média e erro padrão da média (média \pm EPM) e analisadas por ANOVA para medidas repetidas no tempo usando o aplicativo PROC MIXED do SAS[®] (paramétricas) e as de distribuição não-normal (não-paramétricas) pelo teste de Wilcoxon (Aplicativo PROC NPAR1WAY WILCOXON do SAS[®]). As variáveis binárias foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado.

Foram estimados os coeficientes de regressão e seus respectivos coeficientes de determinação e níveis de significância e, ainda, os coeficientes de correlação de Pearson (paramétrica) e Spearman (não paramétrica) entre as variáveis de acordo com a normalidade de cada resposta.

Para cada variável resposta foi verificado efeito da variável classificatória e suas respectivas interações. O nível de significância para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que houve efeito das variáveis classificatórias e das suas interações. Para nível de significância entre 0,05 e 0,1 considerou-se tendência estatística entre as variáveis comparadas.

As variáveis classificatórias (independentes) consideradas no modelo estatístico para verificação dos efeitos e interações foram animal, tratamento, fase e

semana/sessão de OPU. As variáveis resposta (dependentes) analisadas de acordo com os procedimentos experimentais estão descritas no quadro 2:

Quadro 2 - Variáveis resposta analisadas durante o período experimental

Procedimento	Variável resposta
Avaliação climática	Temperatura de bulbo seco, temperatura de bulbo úmido, umidade relativa do ar, índice de temperatura e umidade
Avaliação fisiológica	Consumo de matéria seca, frequência respiratória, temperatura retal, temperatura da superfície da pele, taxa de sudorese
Avaliação endócrina	Concentração sérica de cortisol, concentração sérica de progesterona, duração da fase luteínica.
OPU	População folicular, folículos < 6mm, folículos 6-9mm, folículos > 9mm, Ø maior folículo, Ø 2º maior folículo, codominância, folículos aspirados, oócitos recuperados, taxa de recuperação, percentual de oócitos viáveis.
PIV	Taxa de clivagem, Taxa de produção de blastocistos, embriões produzidos/ doadora

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido a um acidente durante a contenção para realização da OPU, ocorrido 21 dias após o início da fase de estresse (sexta sessão de OPU), um animal do Grupo Estresse foi excluído do experimento. Após este período, permaneceram quatro animais para o Grupo Estresse e cinco animais para o Grupo Controle. As médias inerentes às respostas fisiológicas e à OPU-PIV, até a ocasião da exclusão do referido animal experimental, contam com os dados colhidos de cinco animais/tratamento.

6.1 VARIÁVEIS CLIMÁTICAS

Os resultados da aferição da temperatura de bulbo seco nos períodos pré-experimental e experimental estão apresentados na figura 2. Os respectivos períodos encontraram-se situados entre os meses de janeiro a junho e julho a dezembro, respectivamente. As médias para os períodos pré-experimental e experimental foram $23,1 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$ ($17,1 - 34,9^{\circ}\text{C}$) vs. $21,7 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$ ($14,0 - 30,1^{\circ}\text{C}$), respectivamente no turno da manhã (08:00 h); e de $27,3 \pm 1,9^{\circ}\text{C}$ ($15,4 - 29,4^{\circ}\text{C}$) vs. $25,9 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ ($15,0 - 37,0^{\circ}\text{C}$) no turno da tarde (15:00 h). Na figura 2, verifica-se significativo aumento da temperatura de bulbo seco na fase em que os animais permaneceram na câmara climática em relação à temperatura ambiental nos período pré-experimental e experimental ($P < 0,05$).

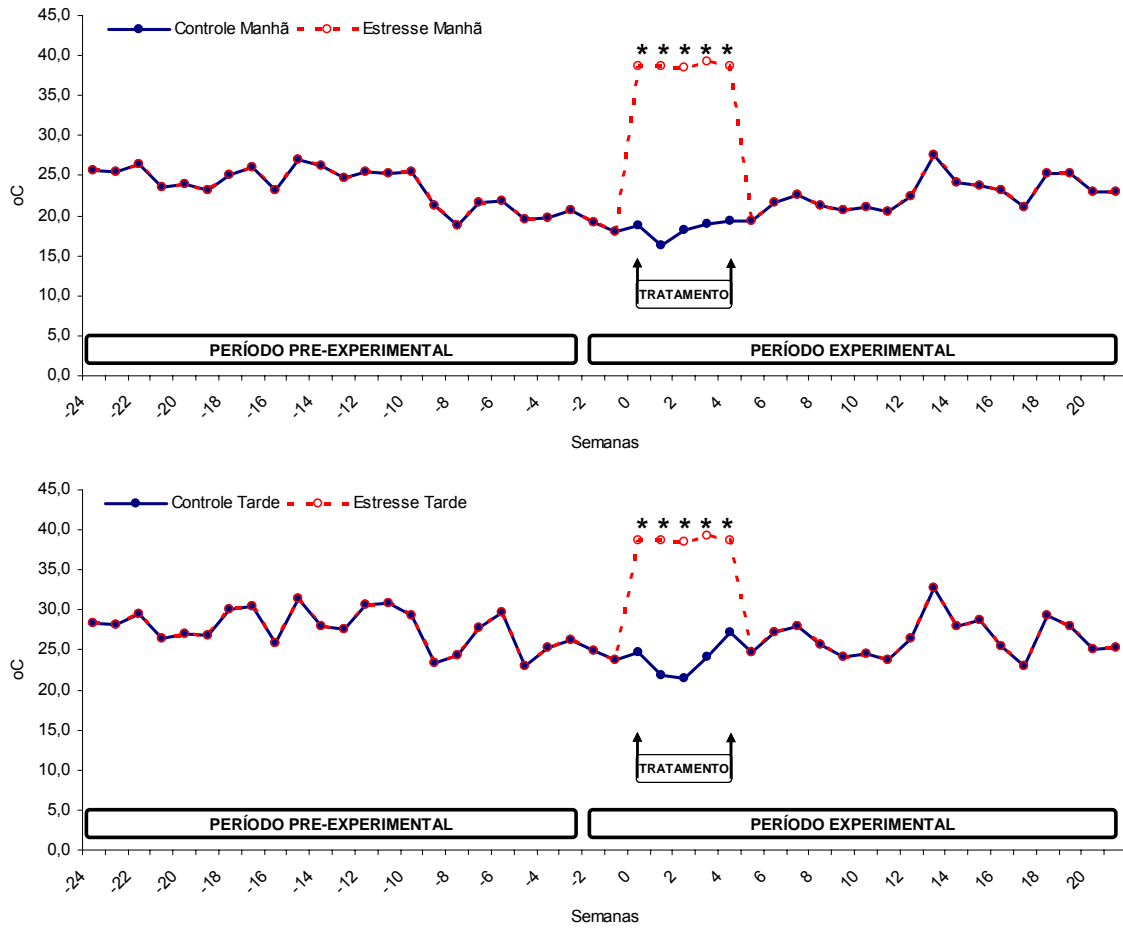


Figura 2 – Média semanal retrospectiva das temperaturas diárias de bulbo seco (TBS) nas instalações experimentais durante o período pré-experimental e experimental nos turnos da manhã (08:00 h; gráfico superior) e da tarde (15:00 h; gráfico inferior). * P<0,05

As variações ocorridas no período de tratamento (Fase II) dentro e fora da câmara climática para os termômetros de bulbo seco e bulbo úmido, além da umidade relativa do ar e do índice de ITU nos turnos da manhã e tarde estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Temperatura de bulbo seco (TBS), temperatura de bulbo úmido (TBU), umidade relativa do ar (UR) e ITU nos Grupos Controle e Estresse durante a fase de tratamento, nos turnos da manhã (08:00 h) e tarde (15:00 h) – Valença – 2005

Turno	Variável	Média ± E.P.M		Mínima		Máxima	
		Controle	Estresse	Controle	Estresse	Controle	Estresse
Manhã (08:00 h)	TBS (°C)	20,0±0,5 ^b	37,5±0,3 ^a	15,5	32,5	24,5	38,3
	TBU (°C)	17,8±0,2 ^b	34,6±0,3 ^a	16,0	28,8	20,5	35,7
	UR (%)	80,4±2,0	81,2±0,7	59,0	73,0	90,0	87,0
	ITU	67,8±0,5 ^b	92,5±0,4 ^a	64,0	84,7	73,0	93,6
Tarde (15:00 h)	TBS (°C)	26,2±0,6 ^b	38,0±0,1 ^a	19,0	36,7	29,0	38,7
	TBU (°C)	19,6±0,4 ^b	35,0±0,1 ^a	14,0	34,2	22,0	36,7
	UR (%)	51,4±2,7 ^b	80,8±0,7 ^a	37,0	75,0	82,0	90,0
	ITU	73,6±0,5 ^b	93,1±0,15 ^a	66,5	91,7	76,6	94,8

^{ab} (P<0,05)

A aferição das condições ambientais (Figuras 3 a 6) concomitante às avaliações das variáveis fisiológicas, características ovarianas e realização de OPU-PIV durante as fases de pré-estresse, estresse e pós-estresse, foi indicativa de que a temperatura e a umidade foram significativamente aumentadas acima dos limites estabelecidos como padrão de conforto térmico em bovinos, caracterizando estresse calórico severo nos animais do Grupo Estresse, segundo o ITU estabelecido por Armstrong (1994) (Anexo A).

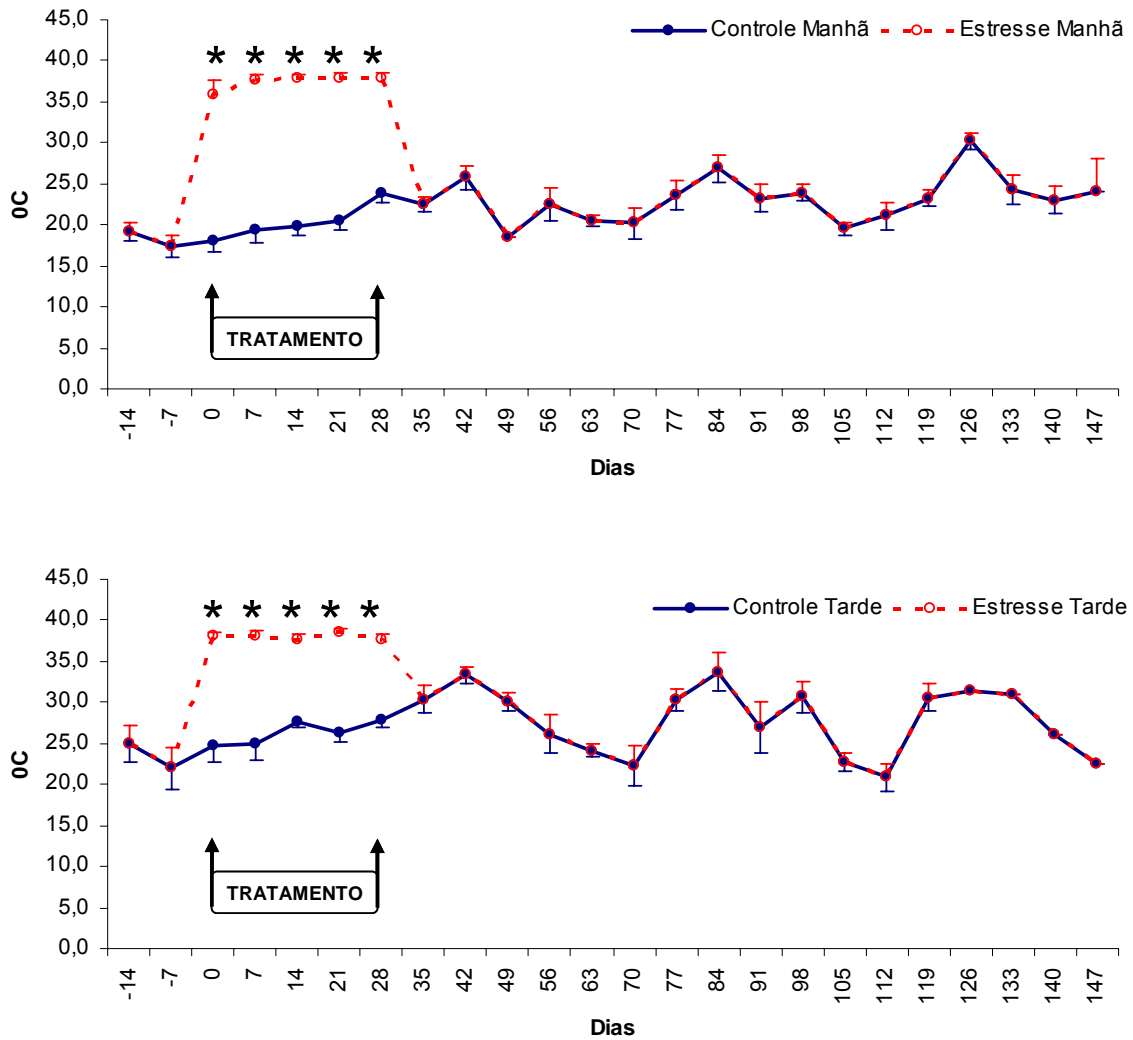


Figura 3 – Média semanal (\pm E.P.M.) das temperaturas diárias de bulbo seco (TBS) nos grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h). * $P < 0,05$

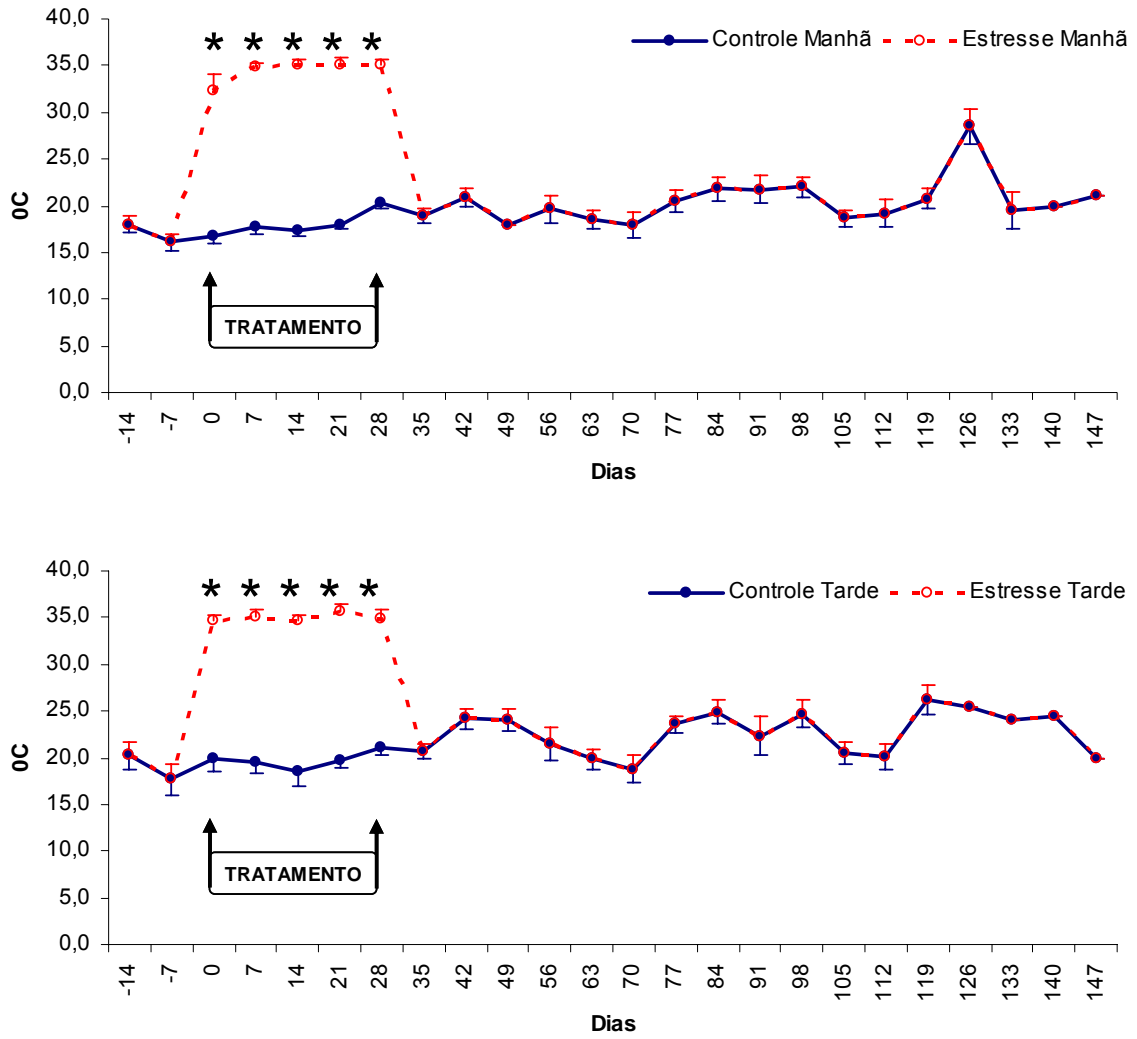


Figura 4 - Média semanal (\pm E.P.M.) das temperaturas diárias de bulbo úmido (TBU) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h). * $P < 0,05$

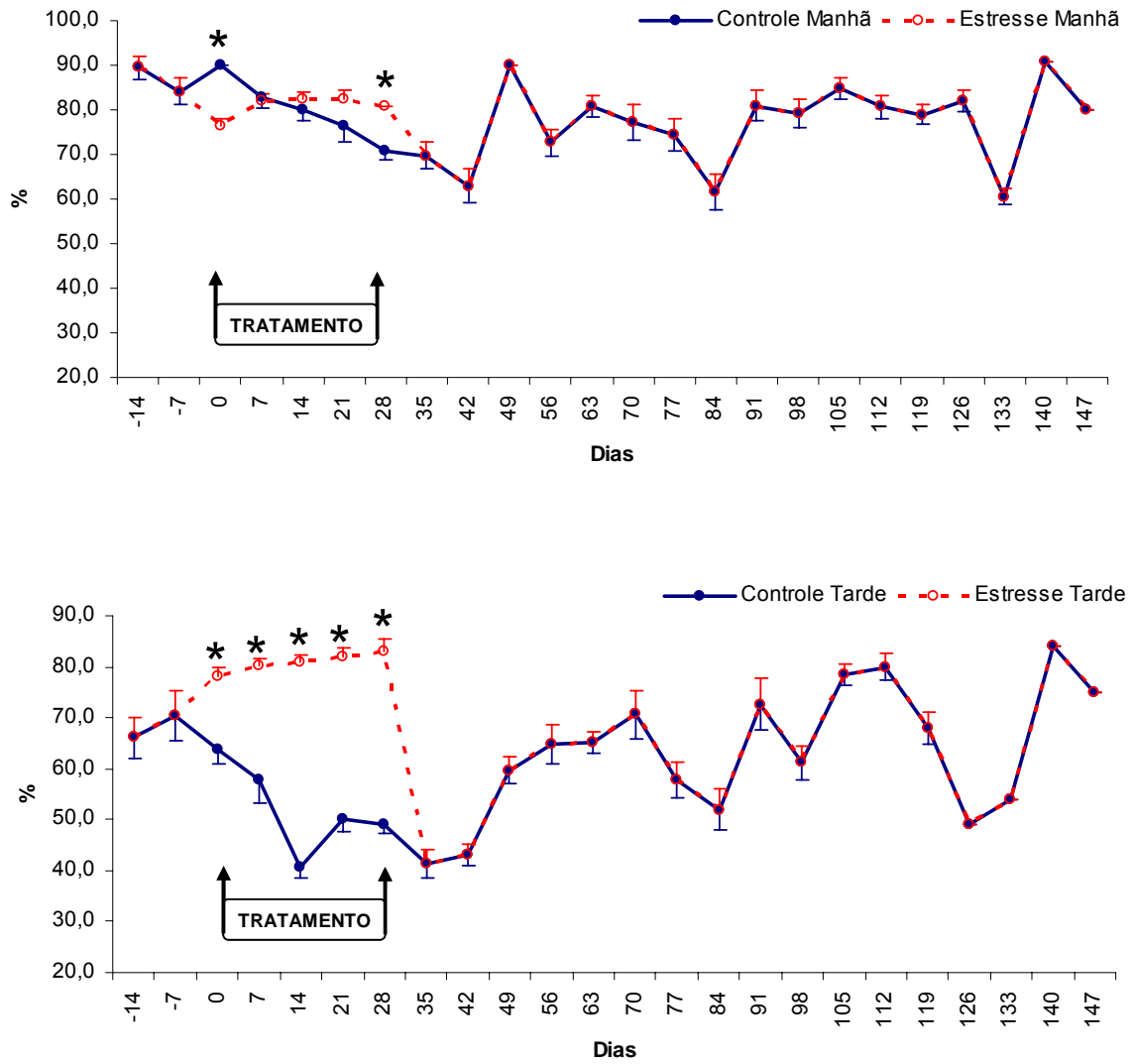


Figura 5 - Média semanal (\pm E.P.M.) da umidade relativa do ar (UR) nos grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h). * $P < 0,05$

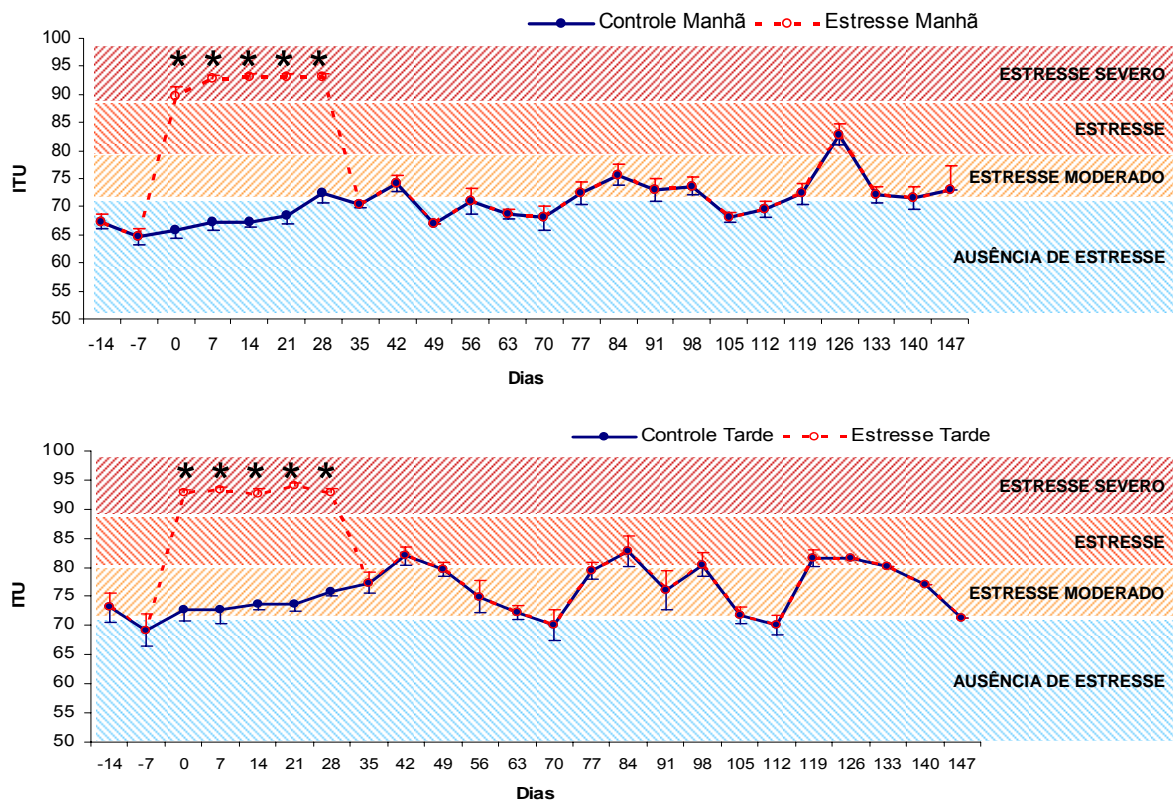


Figura 6 - Caracterização de conforto (média \pm E.P.M.) e estresse térmico em bovinos de acordo com o Índice de Temperatura e Umidade (ITU; Armstrong, 1994) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h). * $P < 0,05$

O ITU médio nas diferentes fases experimentais, para os Grupos Controle e Estresse, foi, respectivamente: Fase I; $69,8 \pm 0,9$ (62,2 – 78,0); [Fase II; Controle; $70,7 \pm 0,6$ (64,0 – 76,6) vs. Estresse; $92,8 \pm 0,2$ (84,7 – 94,8); $P < 0,0001$]; Fase III; $74,3 \pm 0,5$ (62,9 – 87,4). Foi observado efeito significativo de fase experimental para ambos os tratamentos ($P < 0,01$; Tabela 2).

Tabela 2 – Efeitos das variáveis classificatórias para cada variável resposta climática e suas interações

Variável resposta	Efeitos (Valor de P)						
	Tratamento	Fase	Semana	Turno	Tratamento X Fase	Tratamento X Semana	Tratamento X Turno
TBS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	1,0	<0,01
TBU	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	1,0	0,32
UR	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	1,0	<0,01
ITU	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	1,0	<0,01

Durante o período de indução térmica experimental (Fase II), a média da TBS no Grupo Controle tanto no período da manhã quanto da tarde foram inferiores à temperatura de 27°C, limite crítico citado por Fuquay (1981) em relação à ocorrência de estresse calórico em bovinos. Entretanto, no período da tarde, esta mesma variável manteve-se 1,6°C acima da zona de termo-neutralidade de 5 a 25°C, reportada por Youlsef (1985) e Roenfeldt (1998) para *Bos taurus*.

O valor de ITU no turno da manhã foi de $67,8 \pm 0,5$ e permaneceu abaixo do valor crítico para a produção de leite (até 72; segundo JOHNSON, 1987). No turno da tarde o ITU foi de $73,6 \pm 0,5$, estando ligeiramente acima do limite de ausência de estresse para *Bos taurus* em lactação (Até 72; segundo JOHNSON, 1987; ARMSTRONG, 1994).

É importante ressaltar que os animais utilizados no presente experimento são da raça Gir (*Bos indicus*), uma subespécie historicamente conhecida por sua maior adaptabilidade a ambientes com alta temperatura e umidade (GAUGHAN et al., 1999; PIRES 1997; 2002; AZEVEDO et al., 2005). Além disso, os mesmos não estavam em lactação, o que favorece a menor produção de calor endógeno, contribuindo para a manutenção de conforto térmico (LOPEZ et al., 2004; SARTORI et al., 2002,2004; SRIKANDAKUMAR; JOHNSON, 2004; WILTBANK et al., 2006).

6.2 RESPOSTA FISIOLÓGICA

O consumo médio geral de matéria seca foi de $7,4 \pm 0,1$ kg por animal, sendo de $7,5 \pm 0,2$ e $7,2 \pm 0,2$ kg por animal para os Grupos Controle e Estresse, respectivamente ($P=0,33$).

Durantes as avaliações realizadas no período referente à indução de estresse calórico (Fase II; dias 7 a 28), os animais do Grupo Estresse consumiram uma quantidade de matéria seca significativamente menor quando comparados aos animais não-estressados ($6,9 \pm 0,2$ vs. $8,0 \pm 0,3$ kg por animal, respectivamente; $P<0,05$). Nas fases pré e pós estresse o consumo de matéria seca foi similar nos Grupos Controle e Estresse ($6,7\pm 0,4$ vs. $6,9\pm 0,4$ e $8,0\pm 0,4$ vs. $8,4\pm 0,3$, respectivamente).

Comparando-se o consumo médio semanal por tratamento, nota-se uma diminuição do consumo de matéria seca no início do tratamento de estresse calórico que se prolonga até a retirada do fator estressante, apesar de não ter sido verificada diferença significativa entre tratamentos ($P>0,05$; Figura 7).

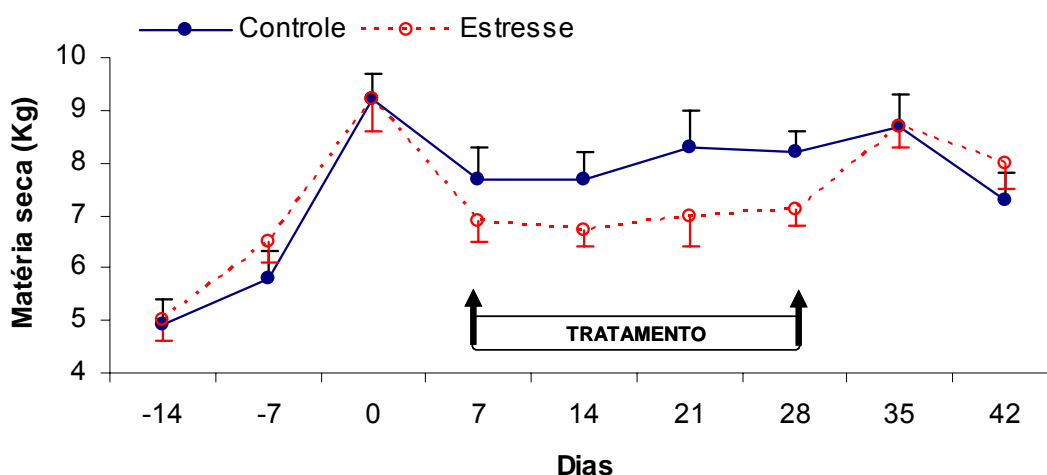


Figura 7 - Média semanal (\pm E.P.M.) do consumo de matéria seca nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental. * $P<0,05$

Já foi anteriormente descrito que o estresse calórico reduz o consumo voluntário de alimentos, tanto em condições experimentais, quanto em condições de campo (FUQUAY, 1981; COLLIER et al., 1982; MCGUIRE et al., 1989; TROUT et

al., 1998). A diferença de 7,4% no consumo de matéria seca observada entre os Grupos Controle e Estresse durante a fase de indução térmica experimental está de acordo com aquela relatada na literatura. Segundo Allen e Donegan (1974) e BLACKSHAW e BLACKSHAW (1994), em temperaturas acima de 35°C há uma redução no consumo de dieta completa que pode variar de 10 a 35%, particularmente em condições de confinamento.

A alta ingestão de alimento aumenta a taxa metabólica, portanto, a sua redução é uma reação imediata ao estresse calórico que funciona como mecanismo regulatório, equilibrando a produção de calor endógeno, além de outros fatores como perdas evaporativas e variações na temperatura corpórea (ALLEN et al., 1962; BLACKSHAW; BLACKSHAW, 1994; TURNER; TAYLOR, 1983). Redução na ingestão de fibra reduz a energia metabolizável e pode diminuir o incremento de calor suficientemente para agir como uma proteção parcial contra os efeitos do estresse calórico (FUQUAY, 1981). O fluxo sanguíneo hepático está diretamente relacionado ao nível de ingestão de matéria seca, declinando cerca de 14% em normotermia adicionada de restrição nutricional ou em estresse calórico com alimento *ad libitum*, ambas comparadas ao conforto térmico com alimento à vontade (MCGUIRE et al., 1989).

Em novilhas holandesas sob estresse calórico de 32°C, com 70% de UR e ITU igual a 84, foi observada redução de 23% no consumo de matéria seca, ocorrência de cistos ovarianos e decréscimo nas concentrações de cortisol e progesterona (RONCHI et al., 1999). Entretanto, vale ressaltar que, nos referidos estudos, somente a redução proporcional no consumo, dissociada do fator estresse calórico, não foi capaz de modificar tais variáveis.

Ainda, no presente experimento, além da relativa diferença no consumo de matéria entre os dois tratamentos, nos animais estressados, ainda houve queda significativa do consumo em relação à última semana da fase pré-estresse, sinalizando que a fase de adaptação dos animais à nova dieta (14 dias) foi suficiente (Figura 7).

Houve resposta fisiológica altamente significativa e sinais característicos de estresse calórico efetivo após a indução térmica (Figuras 8 a 10). Na fase em que os animais permaneceram na câmara climática, sob indução de estresse calórico, houve elevação significativa na FR ($79,2 \pm 1,9$ vs. $20,4 \pm 0,5$ mov./min.; $P < 0,0001$), na TR ($39,3 \pm 0,05$ vs. $38,7 \pm 0,0^\circ\text{C}$; $P < 0,0001$) e na TC ($36,1 \pm 0,1$ vs. $31,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$;

$P < 0,0001$), em relação aos animais do Grupo Controle, respectivamente. Tal elevação correspondeu a um aumento médio de 58,8% (58,8 mov./min.) na FR, de 1,5% (0,6°C) na TR e de 14,1% (5,1°C) na TC ($P < 0,0001$). Nas fases pré e pós-estresse não foram observadas diferenças nas referidas variáveis entre os dois tratamentos ($P > 0,05$; Figuras 8 a 10). Os Efeitos de tratamento, fase, semana e turno sobre as respectivas variáveis são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Efeitos das variáveis classificatórias para cada variável resposta fisiológica e suas interações

Variável resposta	Efeitos (Valor de P)						
	Tratamento	Fase	Semana	Turno	Tratamento X Fase	Tratamento X Semana	Tratamento X Turno
Consumo de matéria seca	0,24	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Frequência respiratória	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Temperatura retal	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Temperatura de superfície cutânea	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

No período da tarde, com o significativo aumento no ITU no ambiente termoneutro (tarde; $73,6 \pm 0,5$ vs. manhã; $67,8 \pm 0,5$; $P < 0,0001$; Figura 6), causado principalmente pela queda na UR (Figura 5), refletiu-se naturalmente na alteração das respostas clínicas do Grupo Controle no turno da tarde em relação ao da manhã [FR ($22,5 \pm 0,8$ vs. $18,6 \pm 0,6$ mov./min.); TR ($39,1 \pm 0,4$ vs. $38,3 \pm 0,4^\circ\text{C}$); TC ($32,8 \pm 0,2$ vs. $29,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$), respectivamente; $P < 0,0001$]. Entretanto, no Grupo Estresse, embora não tenha havido alteração no ITU entre os turnos dentro da câmara climática (manhã; $92,5 \pm 0,1$ vs. tarde; $93,1 \pm 0,4$; $P = 0,15$; Figura 6), também foi demonstrado aumento significativo nas respostas clínicas no período da tarde em relação ao da manhã [FR ($88,1 \pm 2,1$ vs. $70,6 \pm 2,7$ mov./min.); TR ($39,7 \pm 0,0$ vs. $38,8 \pm 0,0^\circ\text{C}$); TC ($36,9 \pm 0,1$ vs. $35,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$), respectivamente; $P < 0,0001$].

Em conformidade aos resultados aqui apresentados, Allen e Donegan (1974) também observaram variações circadianas na frequência respiratória e temperatura retal em vacas leiteiras submetidas a estresse calórico induzido em câmara climática. Contudo, os mesmos autores verificaram que as diferenças observadas para estas variáveis entre os turnos da manhã e tarde diminuíram ao final do período

de exposição ao calor. No presente experimento, a FR foi similar entre os turnos da manhã e da tarde somente nas semanas 3 e 5 após o início do estresse calórico. Tais resultados demonstram que pode haver uma adaptação fisiológica da resposta respiratória de médio a longo prazo em animais sob condições de alta temperatura e umidade.

Segundo Allen et al. (1962), o consumo de alimento, água e a temperatura retal de novilhas *Bos indicus* e *Bos taurus* também sofreram variação circadiana mesmo em ambiente com temperatura alta estável. Quando estas variações foram evidenciadas, valores máximos de resposta fisiológica ao calor aconteceram no começo da tarde, e valores mínimos ao início da manhã, corroborando integralmente com as observações feitas no presente experimento (Figuras 8 a 10 e Tabela 3).

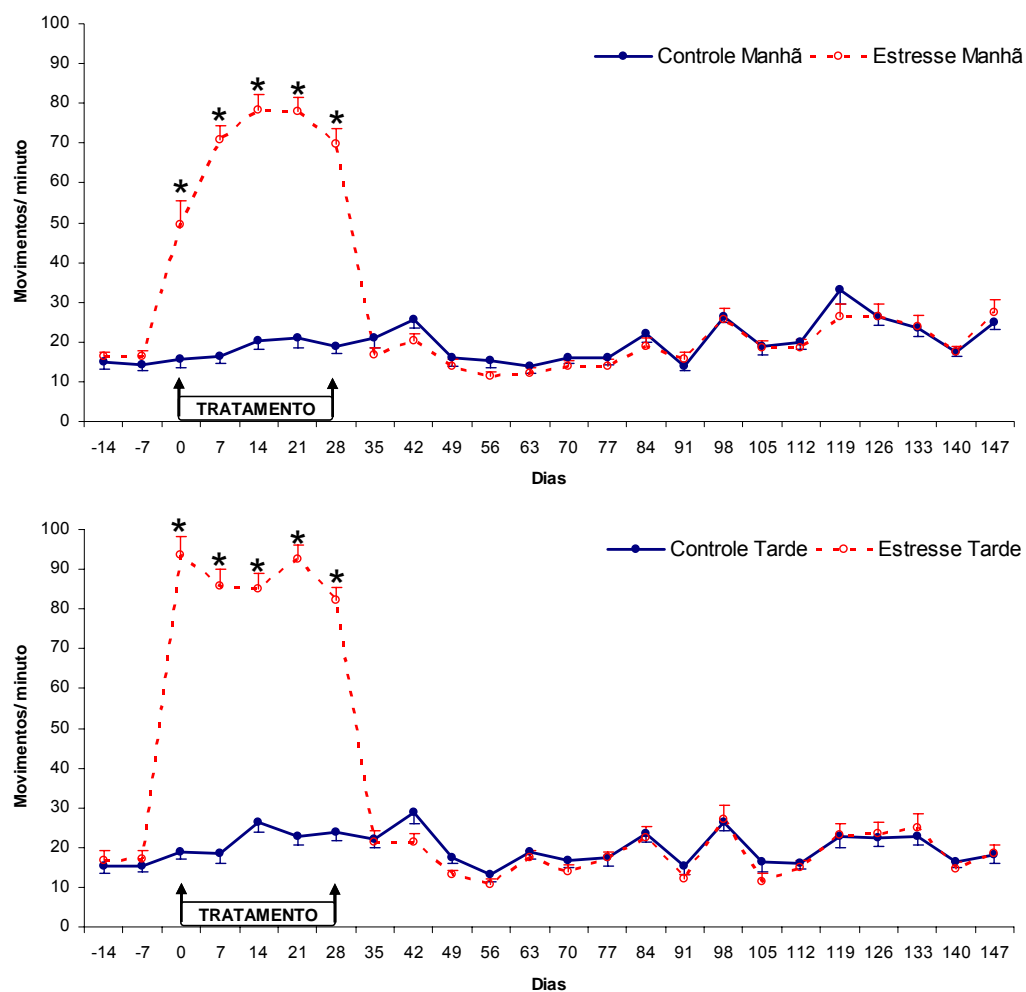


Figura 8 - Média semanal (\pm E.P.M.) da Freqüência respiratória (FR) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h). * P<0,05

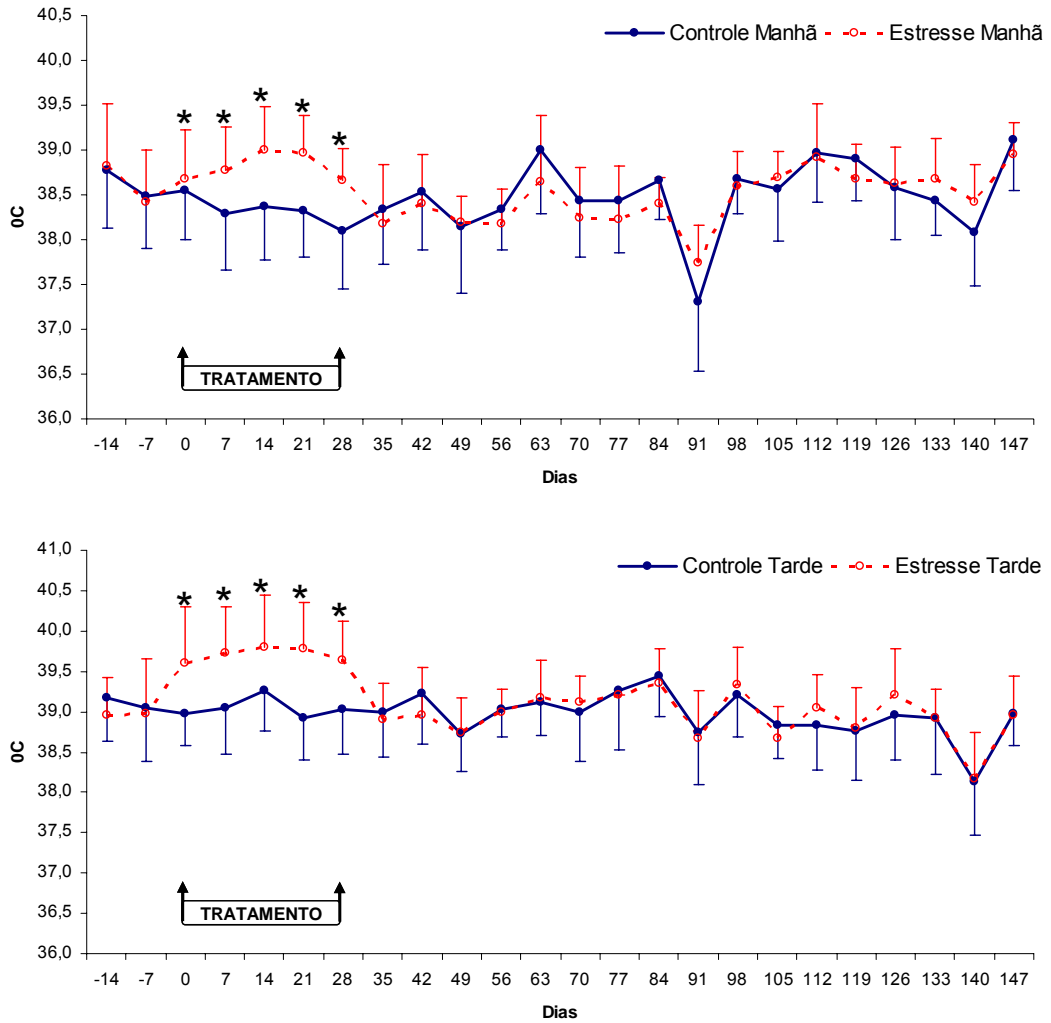


Figura 9 - Média semanal (\pm E.P.M.) da Temperatura retal (TR) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h). * P<0,05

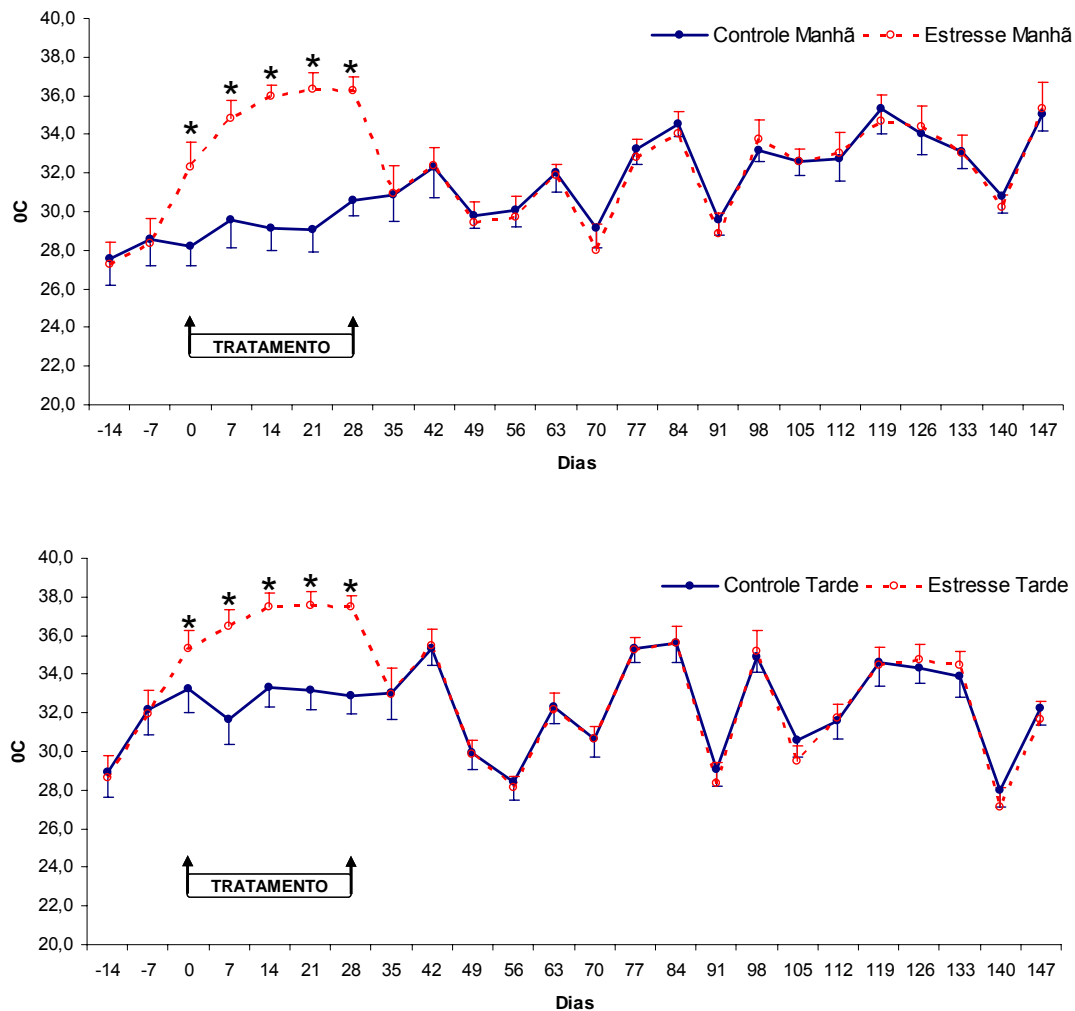


Figura 10 - Média semanal (\pm E.P.M.) da Temperatura da superfície cutânea (TC) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental nos turnos da manhã (08:00 h) e da tarde (15:00 h). * $P < 0,05$

Embora a condição ambiental para o Grupo Controle nas Fases I, II e III, principalmente no turno da tarde, tenha chegado a um ITU correspondente a estresse moderado (ITU; 72 a 79) segundo a escala de Armstrong (1994), a TR não se alterou significativamente ($38,8 \pm 0,1$ vs. $38,7 \pm 0,0$ vs. $38,7 \pm 0,4^\circ\text{C}$; respectivamente; $P > 0,05$), pois, segundo uma pesquisa recente na qual se trabalhou com vacas lactantes 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x zebu em condições ambientais similares, para afetar a variação normal de TR ($38,0$ a $39,0^\circ\text{C}$), foram estimados

valores críticos de ITU iguais a 80, 77 e 75 para os respectivos grupos genéticos (AZEVEDO et al., 2005).

No presente experimento, a FR, TR e TC apresentaram correlação altamente positiva ($P < 0,0001$) entre si, mostrando uma forte associação entre os diferentes mecanismos fisiológicos de termorregulação e perda de calor (Apêndice H). Outros autores afirmaram que os bovinos só manifestam sinais de hipertermia quando apresentam acima de 60 movimentos respiratórios por minuto (BACCARI JR. et al., 2001). Os valores críticos superiores de ITU para FR foram de 79, 77 e 76 em animais dos grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x zebu, respectivamente (AZEVEDO et al., 2005). Embora seja a resposta que apresenta maior grau de variação, e tenha sido diferente entre as fases experimentais, a FR dos animais do Grupo Controle também não se elevou acima dos valores fisiológicos durante o período experimental (Fase I; $14,9 \pm 0,3^b$; vs. Fase II; $20,4 \pm 0,5^a$ vs. Fase III; $20,7 \pm 0,4^a$ mov./min.; $a \neq b$; $P < 0,0001$).

Empregando esse índice na avaliação das raças Hereford, Brahman, Boran e Tuli, uma pesquisa conduzida por Gaughan et al. (1999) revelou que, em um ITU acima de 90, novilhos Brahman apresentaram TR e FR significativamente menores do que os outros genótipos. Entre as raças, a tendência na FR foi similar em ITU menor que 77.

O aumento de 1,5% ($0,6^\circ\text{C}$) aqui observado na TR de fêmeas Gir secas foi inferior ao observado por Gaughan et al. (1999) trabalhando na Austrália com novilhos Holandeses ($2,0^\circ\text{C}$), mestiços Boran e Tulli ($1,5$ a $1,8^\circ\text{C}$) ou Brahman ($1,2^\circ\text{C}$), após 10 horas de estresse agudo em câmara climática com ITU >90 . Todavia, foi similar ao observado por Al-katanani et al. (2002) e por Gwazdauskas, Thatcher e Wilcox (1973), que verificaram que a elevação de $0,5^\circ\text{C}$ na TR foi suficiente para comprometer a competência oocitária *in vitro* e *in vivo*.

A temperatura corporal foi mais alta em vacas holandesas ($P < 0,01$) do que em Jersey ou Zebu Leiteiro Australiano e o aumento compensatório da TR foi mais alto ($P < 0,01$), respectivamente, em Jersey ($0,7^\circ\text{C}$), Holandês ($0,5^\circ\text{C}$) e Zebu Leiteiro Australiano ($0,4^\circ\text{C}$), no período do verão em Omã (ITU; $93 \pm 3,1$), confirmando a alta taxa metabólica e produção de calor endógeno em fêmeas de origem européia, sobretudo em lactação (SRIKANDAKUMAR; JOHNSON, 2004; LOPEZ et al., 2004; SARTORI et al., 2002,2004; WILTBANK et al., 2006).

Embora seja confirmado por estas pesquisas que há uma grande variação nas respostas fisiológicas ao estresse térmico, há uma tendência geral que confirma a alta adaptabilidade e superior termotolerância de animais *Bos indicus*.

O aumento médio de 1°C na TR observado no turno da tarde em relação ao da manhã ($P < 0,0001$) em ambos os grupos experimentais já havia sido relatado por Beatty et al. (2006), que verificaram um aumento de 2,3°C na temperatura corpórea em animais *Bos indicus* submetidos a estresse calórico contínuo durante a manhã (38,1°C às 09:00 h) e à tarde (40,4°C às 16:00). Entretanto, no Grupo Estresse este aumento da FR, TR e TC não foram proporcionais ao aumento do ITU, visto que o ITU não apresentou diferenças entre os turnos (manhã; $92,5 \pm 0,1$ vs. tarde; $93,1 \pm 0,4$; $P = 0,15$). Essa resposta diferenciada da TR em função do ITU nos diferentes turnos provavelmente está associada ao padrão bifásico do ritmo circadiano ou nictemeral da temperatura corporal dos bovinos, observado por Wrenn, Bitmam e Siykes (1961). O horário médio no qual estes autores observaram a menor TR foi às 10:25 h.

Várias evidências comprovam maior tolerância das vacas mestiças a condições consideradas estressantes em relação a animais *Bos taurus*. Assim, é de se esperar que, em razão de sua maior adaptabilidade ao clima tropical, vacas da raça Gir (*Bos indicus*) apresentem valores críticos superiores de temperatura e ITU em relação aos reportados na literatura para *Bos taurus* e seus mestiços (PIRES 1997,2002; GAUGHAN et al., 1999; AZEVEDO et al., 2005). As informações citadas pela literatura, bem como os dados aqui apresentados, permitem inferir que não houve estresse calórico significativo no Grupo Controle durante o período experimental.

No exame seguinte à retirada dos animais da condição de estresse calórico as respostas clínicas já haviam retornado aos valores considerados fisiológicos para a espécie e similares aos dos animais do Grupo Controle. Já foi anteriormente reportado que a normalização das referidas respostas fisiológicas leva em torno de cinco horas após cessação do estresse agudo (PUTNEY et al., 1989).

Devido à ocorrência de tempo chuvoso, algumas avaliações da taxa de sudção correspondentes à fase de pós-estresse não puderam ser realizadas (Figura 11). A taxa de sudção (TS) foi bastante variável e não apresentou perfil constante dentro de nenhuma das fases experimentais, tampouco nos animais do Grupo Estresse durante a indução térmica, com média de $292,8 \pm 31,5$ g/m²/h,

variando de 102,8 a 733,8 g/m²/h. Contudo, conforme mostra a figura 11, na primeira semana da fase de estresse houve aumento significativo na taxa de sudação, enquanto que na fase de pós-estresse imediato houve maior taxa de sudação nos animais do Grupo Controle.

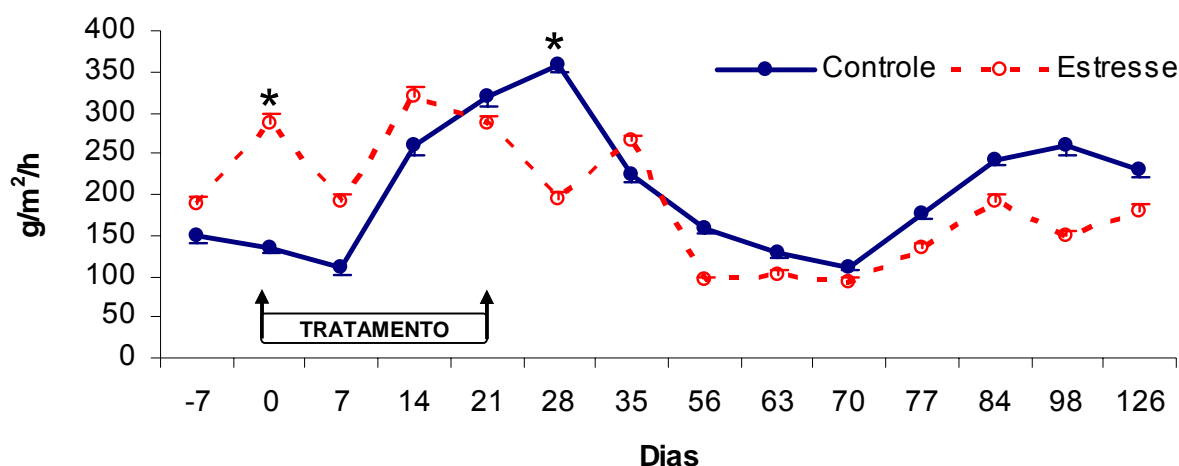


Figura 11 - Média (\pm E.P.M.) da Taxa de sudação (TS) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental. * $P < 0,05$

Embora tenha ocorrido grande variação na TS durante todo o experimento, as diferenças verificadas entre os grupos experimentais na primeira semana das fases de Estresse e Pós-estresse, respectivamente (Figura 11), revelou que pode haver um processo de adaptação da atividade das glândulas sudoríparas a alterações ambientais agudas e crônicas. Conforme ocorrido no presente experimento, o aumento significativo na TS em bovinos adultos no primeiro dia de estresse calórico, seguido de relativa estabilização já havia sido descrito tanto em *Bos indicus* quanto em *Bos taurus* (ALLEN; DONEGAN, 1974). Este mecanismo de adaptação também pôde ser evidenciado após a retirada dos animais da câmara climática, na qual, após a redução da temperatura de $37,8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ na última semana da fase de Estresse para $30,3 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ na primeira semana da fase pós-estresse, houve uma redução significativa na atividade de sudação pelas vacas previamente estressadas.

Carvalho et al. (1995), trabalhando no Brasil, mostraram que o perímetro das glândulas sudoríparas foi maior ($P < 0,001$) em *Bos indicus* nativo ($540,5 \pm 19,1\text{mm}$) do que em animais Simental nativos ($382,0 \pm 27,6\text{mm}$) ou Simental importados de clima temperado ($497,2 \pm 17,4\text{mm}$).

O volume e a densidade da população de glândulas sudoríparas podem variar mesmo entre animais da mesma raça, com alta correlação à taxa de sudação, por isso é comum haver grande variação neste tipo de resposta (ALLEN et al., 1962; CARVALHO et al., 1995). Dependendo da taxa de sudação individual, outros mecanismos de perda de calor podem sofrer maior ou menor ativação. Por exemplo, animais com menor capacidade de sudação apresentam aumento mais significativo na FR e TR (ALLEN et al., 1962).

Há também correlação entre o número de glândulas sudoríparas e a capacidade de adaptação (FINCH, 1986). Carvalho et al. (1995) observaram que bovinos *Bos indicus* possuem um sistema evaporativo mais eficiente do que *Bos taurus*, confirmando o relato de Finch (1986), o qual cita que a transferência de calor para a pele ocorre com maior eficiência em bovinos *Bos indicus*. Além disso, quando a temperatura aumenta, a TS é maior e mais rápida em raças indianas nativas mais adaptadas do que em taurinos (FINCH, 1985). Essa maior adaptação e capacidade de realizar perdas evaporativas em *Bos indicus* podem também ser influenciadas pela grande capacidade desses animais em redirecionar o sangue dos órgãos internos à rede capilar da pele e dissipação de calor (FINCH, 1986).

As mensurações das variáveis inerentes às condições ambientais e à resposta fisiológica dos animais durante o período experimental comprovaram que a indução térmica dentro da câmara climática foi suficiente para ocasionar alterações clínicas nos animais do Grupo Estresse, correspondendo às expectativas do delineamento experimental em causar estresse calórico, de acordo com os objetivos propostos na presente pesquisa.

6.3 RESPOSTA ENDÓCRINA

As variações nas concentrações plasmáticas de cortisol não apresentaram alterações associadas ao estresse calórico (Figura 12), entretanto, o mesmo foi

afetado essencialmente pela fase experimental, tendo sido significativamente maior ($P < 0,0001$; Tabela 4) nos períodos em que os animais se encontravam em regime de confinamento (Fases I e II) do que no período em que permaneceram em regime de pastejo a campo (Fase III), independentemente do grupo experimental. Esta observação confirma que o tipo de manejo adotado foi mais importante do que a temperatura ambiental na determinação das variações de cortisol plasmático (LAMMOGLIA et al., 1997; SMITH; DOBSON, 2002).

Tabela 4 - Média (\pm E.P.M.) das concentrações plasmáticas de Cortisol nos Grupos Controle e Estresse nas diferentes fases experimentais – Valença – 2005

Variável resposta	Fase I		Fase II		Fase III *	
	Controle	Estresse	Controle	Estresse	Controle	Estresse
Cortisol (ng/mL)	2,3 \pm 0,5 ^A	3,2 \pm 0,8 ^A	2,4 \pm 0,2 ^A	2,4 \pm 0,2 ^A	1,9 \pm 0,2 ^B	1,3 \pm 0,1 ^B

* Fase III difere das demais ($P < 0,0001$).

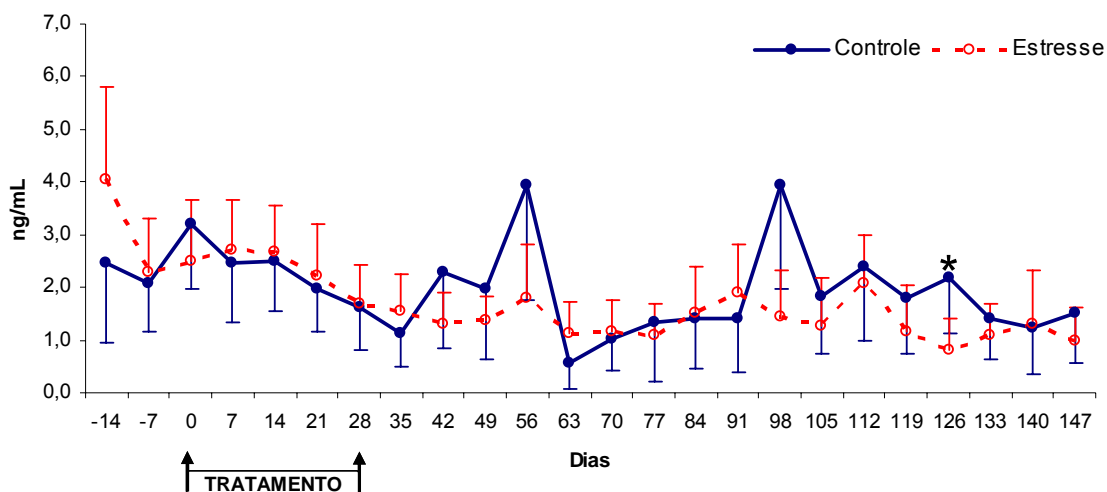


Figura 12 - Média (\pm E.P.M.) das concentrações plasmáticas de cortisol nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental. * $P < 0,05$

Aumentos transitórios principalmente nas concentrações de cortisol dos animais do Grupo Controle ocorreram provavelmente devido ao efeito individual, visto que esta é uma variável que apresentou grande erro padrão.

A concentração plasmática média de progesterona diferiu entre os tratamentos na última semana da indução térmica (Figura 13; $P < 0,05$). Houve diminuição sustentada na concentração média de progesterona no Grupo Estresse, iniciando-se ao final do período de indução térmica experimental (Fase II) e mantendo-se até 21 dias após a retirada do estresse (Fase III; Figura 13).

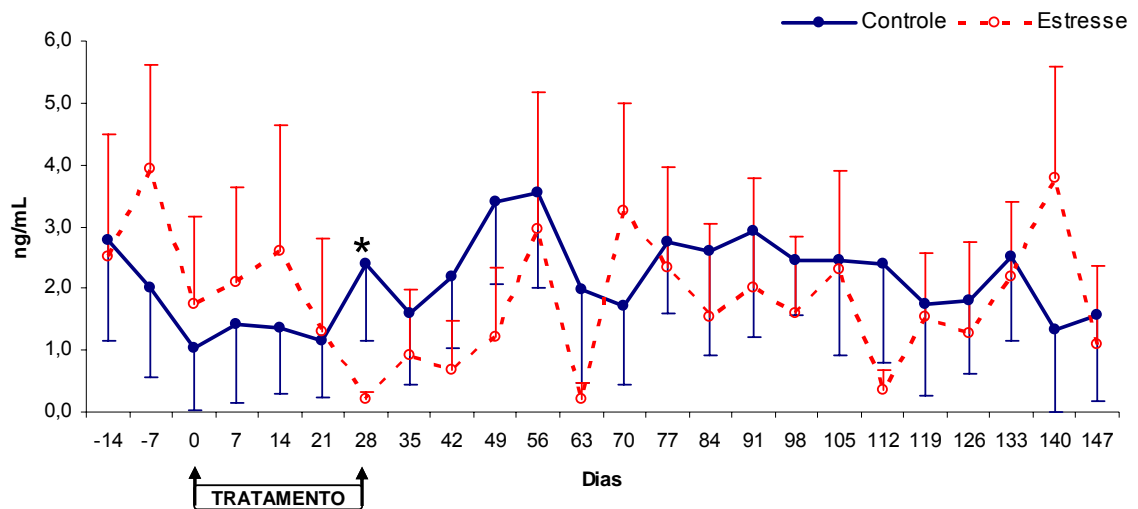


Figura 13 - Média (\pm E.P.M.) das concentrações plasmáticas de progesterona nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental. * $P < 0,05$

A dinâmica do perfil individual de progesterona de cada animal está demonstrada na figura 14. A descrição dos perfis individuais de progesterona mostrou que os animais não estressados apresentaram, em sua maioria, intervalos entre fases luteínicas com duração média proporcional àquela encontrada no ciclo estral de animais não submetidos à aspiração folicular ($22,1 \pm 0,7$ dias; Tabela 5). Já nas fêmeas submetidas a estresse calórico verificou-se longos períodos de aciclicidade (progesterona < 1 ng/mL) ou a ocorrência de ciclos irregulares e, sobretudo, ciclos de curta duração ($18,4 \pm 0,7$ dias; $P < 0,001$; Tabelas 5 e 6).

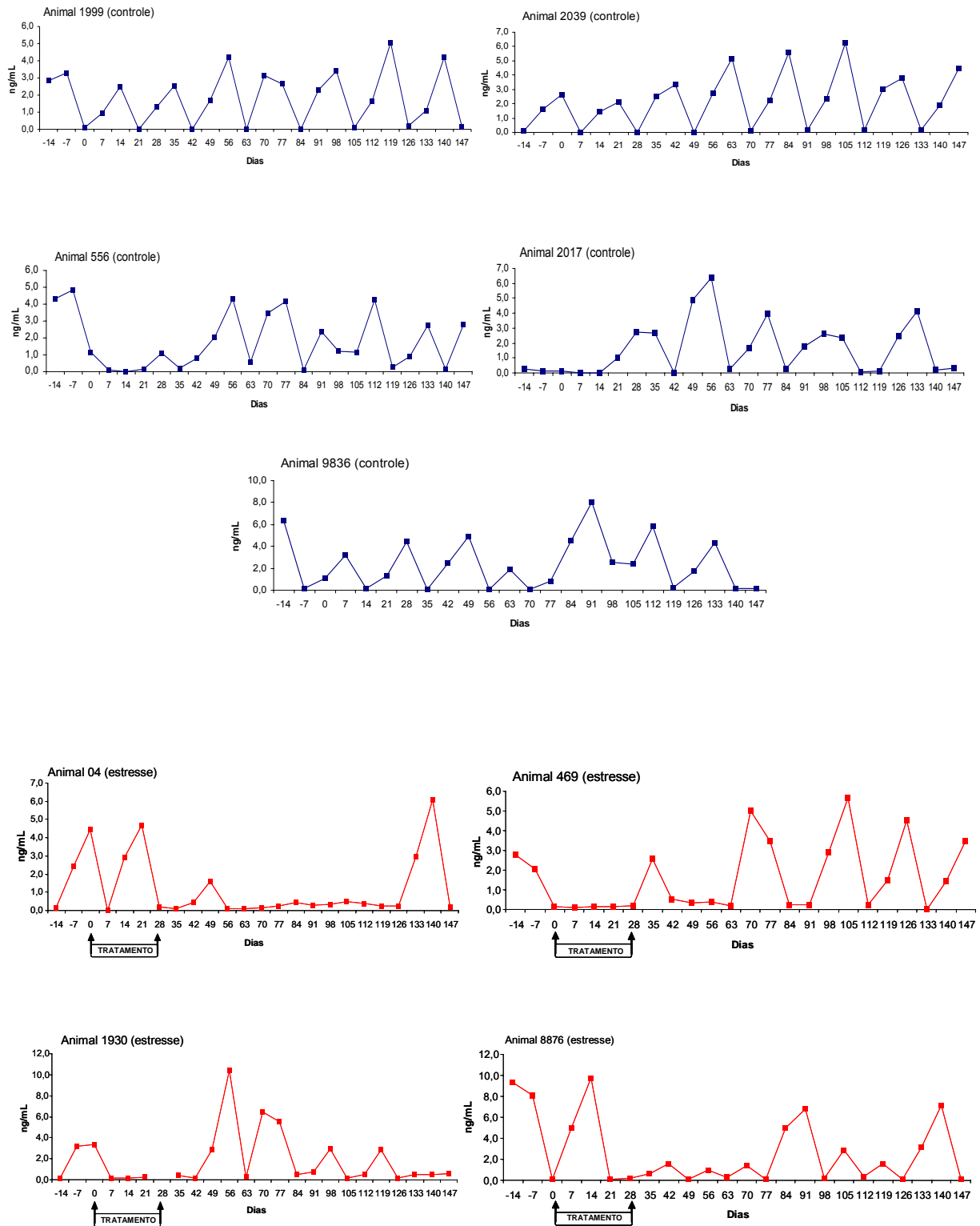


Figura 14 - Perfil plasmático individual de Progesterona nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental

Tabela 5 - Caracterização dos intervalos entre fases luteínicas nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental – Valença – 2005

Intervalos	Controle	Estresse	Valor de P
21 dias	31/35 (88,6%)	15/24 (62,5%)	0,0200
< 21 dias	3/35 (8,6%)	9/24 (37,5%)	0,0086
> 21 dias	1/35 (2,9%)	0/24 (0,0%)	0,2018
Média (dias)	20,6±0,4	18,4±0,7	0,0048

No Grupo Estresse, a diminuição na duração média de uma fase luteínica ocorreu principalmente na fase de pós-estresse, tendo sido o período com menor concentração média de progesterona ($P < 0,05$; Tabela 6).

Tabela 6 - Duração do intervalo entre fases luteínicas e concentrações plasmáticas de Progesterona nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental – Valença – 2005

Variável resposta	Fase I		Fase II		Fase III	
	Controle	Estresse	Controle	Estresse	Controle	Estresse
Fase luteínica (dias)	---	---	19,8±1,2	21,0±0,0	20,7±0,5 ^a	17,5±0,8 ^b
Progesterona (ng/mL)	2,4±0,7	3,1±1,2	1,5±0,3	1,7±0,5	2,3±0,2 ^a	1,7±0,3 ^b

^{ab} ($P < 0,05$)

Enquanto os animais do Grupo Controle apresentaram 86,6% de ciclicidade regular durante o período experimental, os estressados apresentaram ciclos irregulares com curta duração ou prolongados períodos de aciclicidade (Figuras 13 e 14 e Tabela 5). A manutenção da ciclicidade mesmo em animais aspirados regularmente corrobora com as observações feitas por Kruij et al. (1994); Pieterse et al. (1991) e Roth et al. (2001a) que realizaram pelo menos quatro sessões de OPU a intervalos regulares entre os dias 3 e 15 de, no mínimo três e no máximo quatro, ciclos estrais consecutivos, obtendo intervalos entre fases foliculares com média de 20 a 22 dias.

Os efeitos de tratamento, fase e semana experimental sobre a resposta endócrina estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Efeitos das variáveis classificatórias para cada variável resposta endócrina e suas interações

Variável resposta	Efeitos (Valor de P)				
	Tratamento	Fase	Semana	Tratamento X Fase	Tratamento X Semana
Concentração de Cortisol	0,25	<0,001	0,24	0,16	0,85
Concentração de Progesterona	0,33	0,33	0,95	0,42	0,90
Duração da fase luteínica	<0,01	0,24	---	0,10	---

O perfil endócrino de progesterona aqui apresentado e sua inter-relação com a dinâmica ovariana e produção *in vitro* de embriões serão novamente abordados e rediscutidos nos itens a seguir.

6.4 CARACTERÍSTICAS OVARIANAS E ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SOM

A técnica de OPU foi realizada por um único operador e o tempo médio gasto foi de 00h25min \pm 00h04min por vaca. (Controle; 00h25min \pm 00h04min vs. Estresse; 00h25min \pm 00h05min por vaca; $P>0,05$), totalizando tempo de 05h40min \pm 01h12min (Controle; 05h38min \pm 01h17min vs. Estresse; 05h42min \pm 01h17min; $P>0,05$) entre o início da OPU e o início da MIV (tempo de transporte).

Houve efeito da sessão de OPU no número de folículos visualizados e oócitos recuperados, mostrando diminuição significativa ($P<0,05$) dos mesmos após 24 sessões semanais de OPU (Figuras 15 a 17).

O número médio de folículos visualizados foi de 18,9 \pm 0,6 por vaca (Controle; 18,3 \pm 0,6 vs. Estresse; 19,6 \pm 0,9 folículos por vaca; $P>0,05$), tendo sido aspirados 83,3% (3653/4386) destes [Controle; 82,7% (1895/2292) vs. Estresse; 83,9% (1758/2094)].

Foram ainda obtidos um total de 2195 oócitos ($9,6 \pm 0,4$ oócitos/vaca/sessão), sendo 1137 ($9,2 \pm 0,6$) para o Grupo Controle e 1058 ($10,0 \pm 0,7$) para o Grupo Estresse.

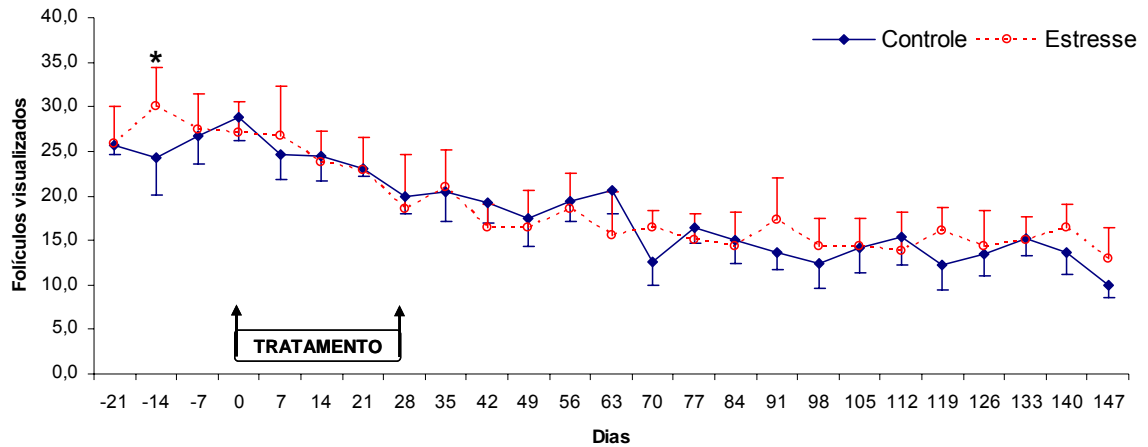


Figura 15 - Média (\pm E.P.M.) de folículos visualizados no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental. * $P < 0,05$

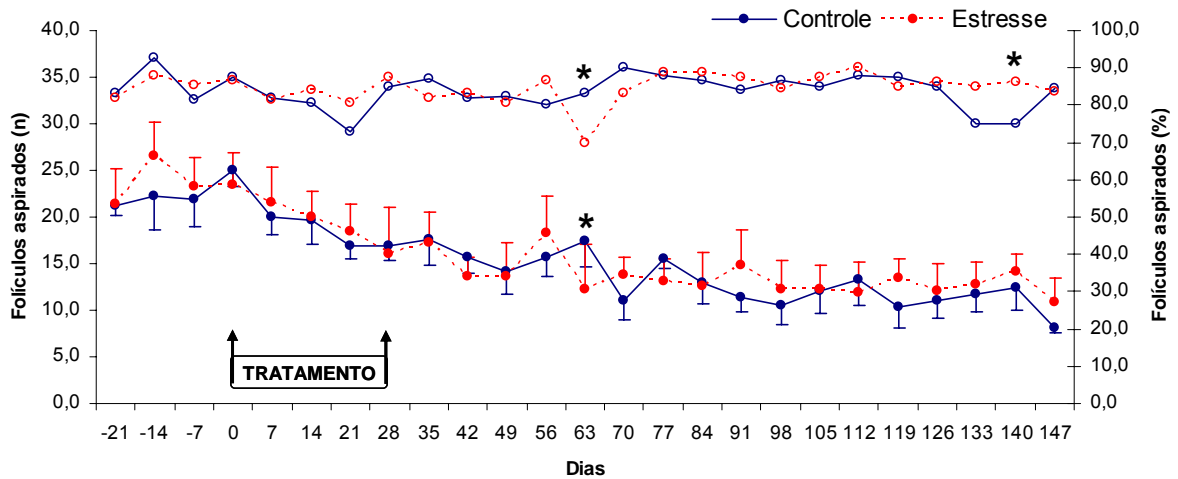


Figura 16 - Média (\pm E.P.M.) e percentual de folículos aspirados no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental. * $P < 0,05$

O estresse calórico não interferiu no recrutamento folicular, visto que a população total de folículos >3mm e o número de CCO's recuperados não apresentou diferença significativa entre os tratamentos.

Embora já tenha sido descrito efeito individual de doadora sobre estas variáveis, a variância entre os dois tratamentos mostrou que o exame ultrasonográfico prévio proporcionou um balanceamento efetivo dos animais nos respectivos tratamentos (Figura 15), visto que há também grande repetibilidade e previsibilidade na população folicular por onda de crescimento em um mesmo animal após vários meses de seguidas sessões de OPU (BONI et al., 1997; TAMASSIA et al., 2002).

Outros autores já relataram que o número de folículos de 3 a 5mm não é afetado pelo estresse calórico agudo em curto ou longo prazo (ROTH et al., 2000; 2001b). Putney et al. (1989) também não observaram diferença significativa no número de folículos ovulatórios ($9,8 \pm 1,5$ vs. $8,0 \pm 1,8$), embriões colhidos ($3,7 \pm 0,7$ vs. $5,0 \pm 0,5$) e taxa de recuperação (33,3% vs. 62,5%) entre novilhas holandesas superestimuladas em ambiente termoneutro com microaspersão ($24 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) ou sob estresse calórico agudo ($42^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$), respectivamente.

O número de CCO's recuperados em relação à quantidade de folículos aspirados (taxa de recuperação) foi de 60,1% (2195/3653) [Controle; 60,2% (1058/1758) vs. Estresse; 60,0% (1137/1895); $P>0,05$]. Não houve efeito de sessão de OPU sobre a taxa de recuperação ($P=0,52$; Figuras 17 e 18; Tabela 13).

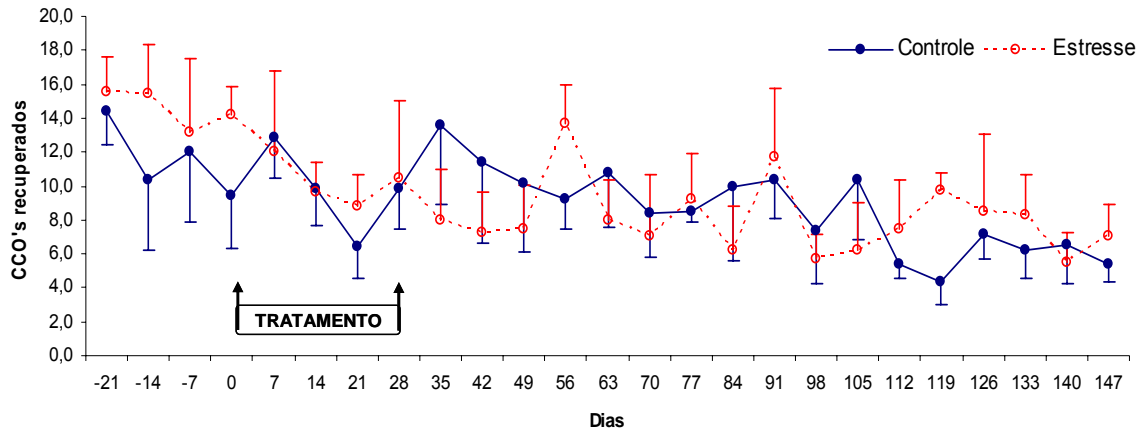


Figura 17 – Média (\pm E.P.M.) de complexos cúmulus-oócitos recuperados por sessão de aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental

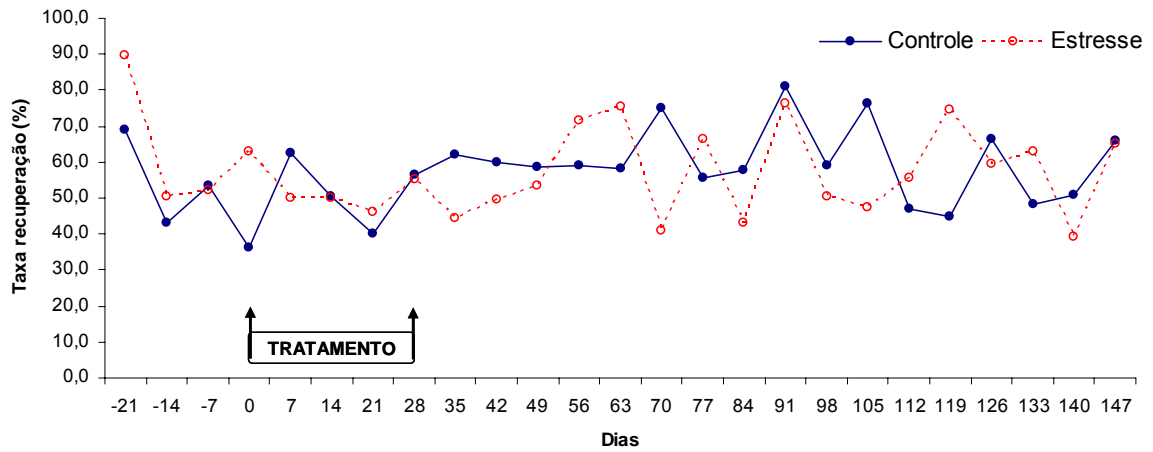


Figura 18 - Percentual de complexos cúmulus-oócitos recuperados em relação ao número de folículos puncionados (taxa de recuperação) nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental

A taxa de recuperação aqui observada está dentro da faixa de variação verificada em alguns trabalhos realizados em fêmeas bovinas (PIETERSE et al., 1991; GIBBONS et al., 1994; KRUIP et al., 1994; BUNGARTZ et al., 1995; GARCIA; SALAHEDDINE, 1998; MANCHATKOVÁ et al., 2000; TAMASSIA et al., 2003). O número de estruturas coletadas no presente experimento ($9,6 \pm 0,4$ CCO's/vaca/sessão de OPU) foi próximo ao relatado por Viana et al. (2004) em vacas da raça Gir sob o mesmo regime de coleta ($8,9 \pm 0,8$ CCO's/vaca/sessão de OPU), com taxa de recuperação de 74%.

A queda no número de folículos visualizados e CCO's recuperados em ambos os tratamentos durante a condução do experimento foi provavelmente causada pelo efeito mecânico prolongado de sucessivas aspirações foliculares. A possibilidade do uso de repetidas aspirações foliculares por longo período pode, ocasionalmente, levar a alterações degenerativas, fibroses ou aderências no estroma ovariano, bem como aumentar a ocorrência de mediadores inflamatórios locais, que podem ser deletérios à esteroidogênese e ao metabolismo do oócito (ESPEY, 1994; PETYIM et al., 2001; VIANA, 2002).

O número de folículos pequenos também sofreu diminuição significativa após repetidas sessões de OPU, em ambos os tratamentos ($P < 0,01$) no período experimental (Figura 19). Não houve efeito de fase experimental e de tratamento sobre o número de folículos médios (Figura 20). Nas figuras 21 a 23 estão apresentadas variações ocorridas no número de folículos grandes, bem como nos diâmetros do maior e do segundo maior folículos, principalmente depois da terceira semana após o início do estresse.

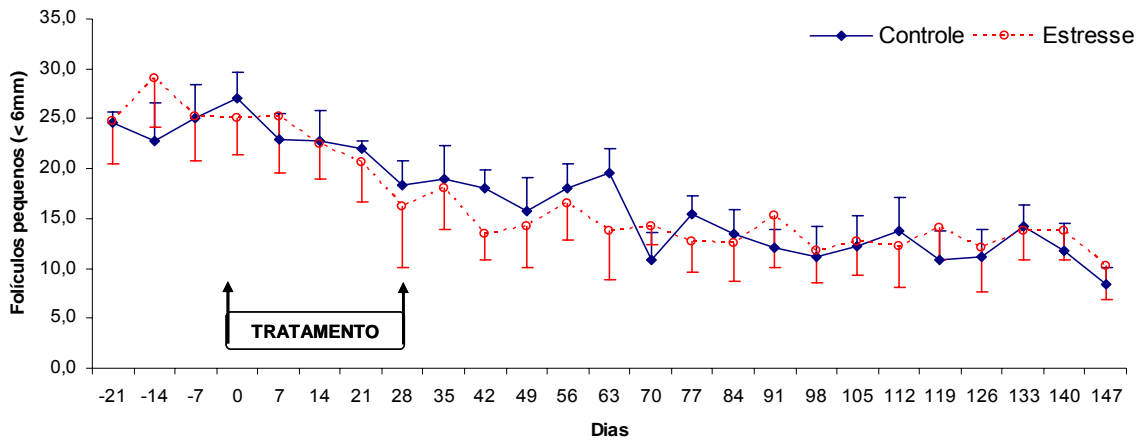


Figura 19 - Média (\pm E.P.M.) de folículos pequenos (<6mm de diâmetro) observados no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental

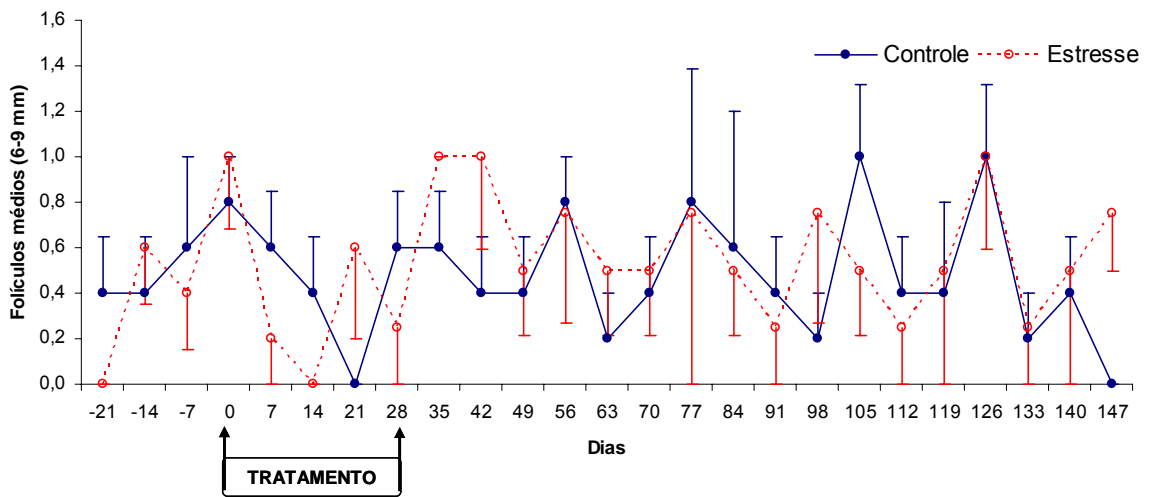


Figura 20 - Média (\pm E.P.M.) de folículos médios (6-9mm de diâmetro) observados no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental

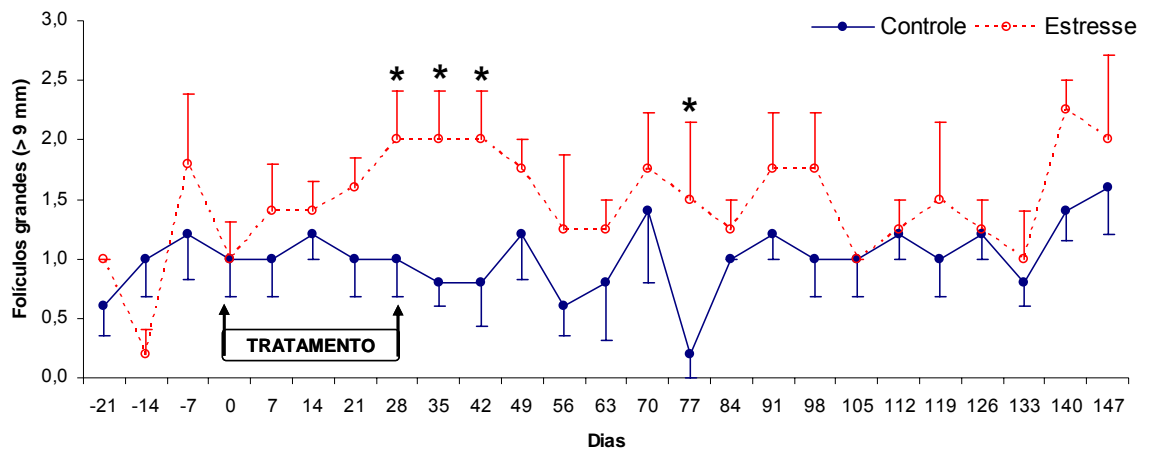


Figura 21 - Média (\pm E.P.M.) de folículos grandes (>9mm de diâmetro) observados no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental. * P<0,05

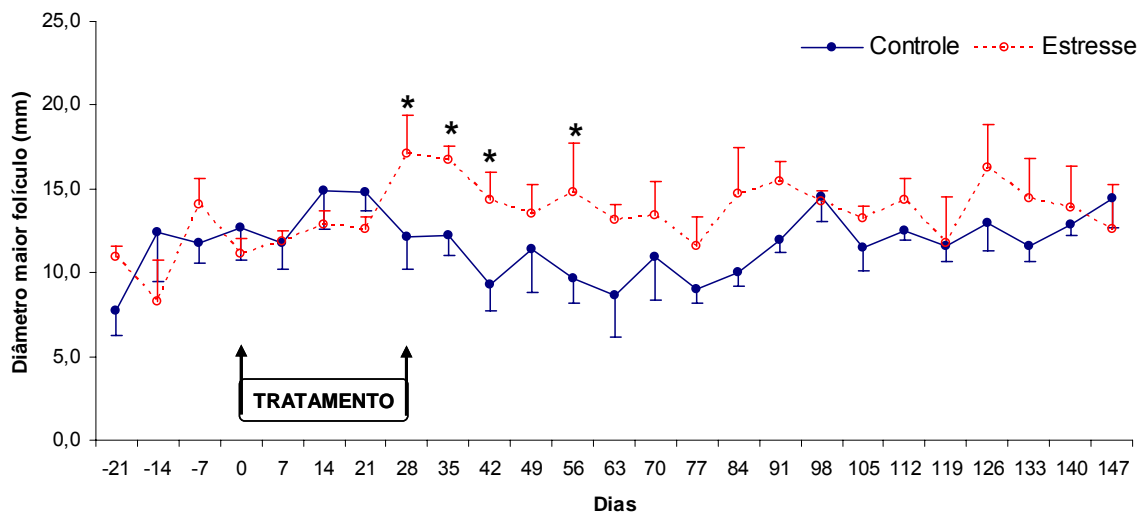


Figura 22 – Média (\pm E.P.M.) do diâmetro do maior folículo observado no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental. * P<0,05

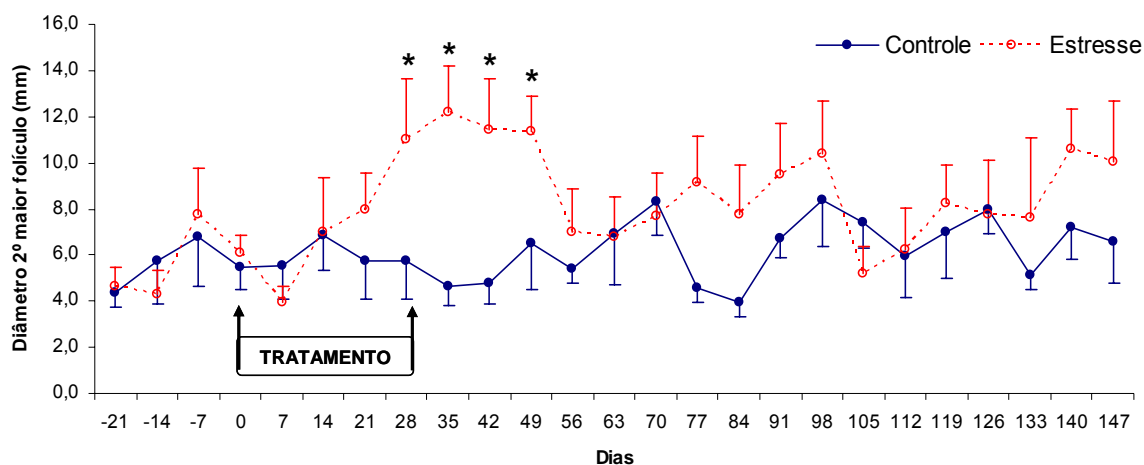


Figura 23 - Média (\pm E.P.M.) do diâmetro do segundo maior folículo observado no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental. * $P < 0,05$

As principais características ovarianas inerentes à OPU em cada uma das fases experimentais estão descritas na tabela 8.

Tabela 8 - Características ovarianas observadas no momento da aspiração folicular nos Grupos Controle e Estresse durante as diferentes fases experimentais – Valença – 2005

Variável resposta	Fase I		Fase II		Fase III	
	Controle	Estresse	Controle	Estresse	Controle	Estresse
Folículos visualizados	25,5 \pm 2,5	28,5 \pm 2,8	24,2 \pm 1,1	24,0 \pm 1,9	15,3 \pm 0,6	15,8 \pm 0,8
Folículos pequenos (<6mm)	23,9 \pm 2,4	26,9 \pm 3,1	22,6 \pm 1,1	22,1 \pm 2,0	13,8 \pm 0,7	13,6 \pm 0,8
Folículos médios (6-9mm)	0,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
Folículos grandes (>9mm)	1,1 \pm 0,2	1,0 \pm 0,4	1,0 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1 ^b	1,6 \pm 0,1 ^a
Diâmetro do maior folículo	12,1 \pm 1,5	11,1 \pm 1,7	13,3 \pm 0,8	13,0 \pm 0,6	11,4 \pm 0,4 ^b	14,0 \pm 0,4 ^a
Diâmetro do 2º maior folículo	6,2 \pm 1,3	6,0 \pm 1,2	5,9 \pm 0,6	7,1 \pm 0,8	6,3 \pm 0,3 ^b	8,7 \pm 0,5 ^a
CCO's recuperados	11,2 \pm 2,8	14,3 \pm 2,5	9,6 \pm 1,0	11,0 \pm 1,3	8,6 \pm 0,7	7,9 \pm 0,6
Taxa de recuperação	112/220 (50,9%)	143/273 (52,4%)	241/491 (49,1%)	265/480 (55,2%)	712/1076 (66,2%) ^a	535/897 (59,6%) ^b

^{ab} ($P < 0,05$)

Não houve efeito do estresse calórico sobre a população total de folículos, folículos pequenos e folículos médios (Figuras 15, 19 e 20). Contudo, na fase de estresse houve aumento ($P < 0,05$) no número de folículos grandes nos animais do Grupo Estresse (Figura 21), iniciando-se após a quarta semana de indução térmica (Fase II) e sobressaindo-se na fase pós-estresse imediato (até 21 dias após o término do estresse). Esta elevação no número de folículos grandes iniciou-se ainda no período de estresse devido ao significativo aumento do diâmetro do maior folículo e, principalmente, dos segundos e/ou terceiros maiores folículos (Figuras 22 e 23). Este fenômeno foi caracterizado como codominância folicular e significa que o mecanismo de seleção do folículo dominante foi afetado pelo estresse calórico.

A emergência de cada onda de crescimento folicular é estimulada por uma onda de FSH (ADAMS et al., 1992). Após a emergência, os folículos passam por uma fase de crescimento comum e então a onda de FSH declina até os níveis basais próximo ao momento da divergência (GINTHER et al., 1998). Este declínio transitório é o componente chave para o processo de seleção folicular e é neste momento que a administração exógena de FSH ocasiona múltipla dominância folicular (MIHM et al., 1997). A inibina atua limitando a duração dos pulsos de FSH por meio de feed-back hipofisário e sua ação supressiva é crítica para a ocorrência da seleção de um único folículo dominante (FAUSER; VAN HEUSDEN, 1997).

Independentemente do mecanismo que conduz à codominância folicular, associada a alterações no perfil plasmático dos esteróides, diminuição da inibina e aumento das concentrações de FSH circulante, estes achados têm sido unânimes entre as pesquisas, tanto as relacionadas ao estresse sazonal quanto ao agudo (WILSON et al., 1998a,b; ROTH et al., 2000; LOPEZ; SARTORI; WILTBANK, 2004). Já, no caso dos esteróides ovarianos, não há uma caracterização padrão estabelecida para bovinos sob estresse calórico.

A frequência de codominância folicular no momento da aspiração folicular para os Grupos Controle e Estresse foi de, respectivamente, 19,2% (24/125) vs. 34,6% (37/107; $P = 0,0082$). Não houve efeito de sessão de OPU sobre a frequência de codominância folicular. Dentre as variáveis estudadas, as respostas observadas para os animais com codominância (Com/COD) vs. sem codominância (Sem/COD) estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 - Efeito da codominância folicular sobre as características ovarianas observadas no momento da aspiração folicular - Valença – 2005

Variável resposta	Com/COD	Sem/COD
	71	161
População folicular	17,2 ± 1,0 ^b	19,5 ± 0,7 ^a
Folículos pequenos (< 6mm)	14,6 ± 1,0 ^b	18,1 ± 0,7 ^a
Folículos médios (6-9mm)	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,0
Folículos grandes (> 9mm)	2,2 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,4 ^b
Diâmetro do maior folículo	16,1 ± 0,5 ^a	11,2 ± 0,2 ^b
Diâmetro do 2º maior folículo	13,2 ± 0,8 ^a	5,4 ± 0,2 ^b
Oócitos recuperados vaca/sessão	7,9 ± 0,7 ^b	10,2 ± 0,6 ^a
Taxa de recuperação	477/1047 (45,5%) ^b	1718/3339 (51,4%) ^a

^{ab} (P<0,05)

O estresse calórico, tanto agudo quanto sazonal, também já foi descrito como causa de atraso e/ou ineficiência no mecanismo de dominância folicular (BADINGA et al., 1993; WOLFENSON et al., 1995; WILSON et al., 1998a,b; ROTH et al., 2000; 2001a,b), ocasionando codominância folicular (SARTORI et al., 2004; LOPEZ et al., 2006), atraso na ovulação (SARTORI et al., 2004) ou mesmo duplas ovulações (RYAN et al., 1991; LÓPEZ-GATIUS et al., 2005), ambos estando negativamente correlacionados com fertilidade. O mecanismo que conduz a esses processos já foi evidenciado por diferentes estudiosos que apresentaram duas principais justificativas para explicar tais fenômenos, envolvendo síntese e metabolismo de hormônios esteróides.

Em testes realizados com a utilização de choque térmico *in vitro* ou estresse calórico materno *in vivo* foi verificada diminuição na produção de androstenediona e, conseqüentemente, de estradiol pelas células foliculares, devido à diminuição do substrato de andrógenos e baixa atividade de aromatase. Por outro lado, a produção intra-folicular de progesterona em ambos os casos foi aumentada, sinalizando que há uma diferenciação e luteinização prematura das células foliculares (WOLFENSON et al., 1995,1997; ROTH et al., 2001b; BRIDGES; BRUSIE; FORTUNE, 2005).

Outro fator que pode interferir na esteroidogênese é a alteração no *status* oxidativo das células foliculares e/ou luteínicas (KATO et al., 1997). As Espécies

Reativas de Oxigênio (ROS) podem também afetar a produção de progesterona devido a prejudicarem a função dos receptores de LH (GATZULI et al., 1991; VEGA et al., 1995) ou inibirem a atividade enzimática que possibilita a conversão mitocondrial do colesterol em progesterona (BEHRMAN; ATEN, 1991; CARLSON et al., 1995).

Ambas as pesquisas demonstraram haver uma queda na viabilidade das células da granulosa e da teca, além de um efeito de longo prazo que pode interferir na esteroidogênese e no desenvolvimento de folículos médios e pré-ovulatórios por até 20 a 26 dias após o término do estresse, respectivamente (WOLFENSON et al., 1997, 2002; ROTH et al., 2001b).

Segundo Roth et al. (2001b), o percentual de folículos atrésicos foi numericamente maior em vacas estressadas do que nas não estressadas (62 vs. 44%, respectivamente; $P > 0,05$). Além destes, outros autores concluíram que o grau de atresia pode estar associado à baixa produção androstenediona pelas células da teca, de estradiol pelas células da granulosa e do desequilíbrio na relação progesterona vs. estradiol encontrado no fluido folicular dos animais estressados (MCNATTY et al., 1984). Uma das hipóteses para esta falha no processo de esteroidogênese em animais que sofrem estresse calórico é que pode haver uma diminuição compensatória na taxa de perfusão vascular ovariana, influenciando diretamente a captação de nutrientes e liberação de hormônios pelo folículo (LUBLIN; WOLFENSON, 1996; ROTH et al., 2001b).

Outro importante mecanismo que afeta o padrão endócrino é o metabolismo dos esteróides. A hipótese de Sartori et al. (2004) é que após a luteólise, as vacas de alto metabolismo requerem mais tempo para alcançar o limiar pré-ovulatório de estradiol, atrasando o estro e ocasionando a ovulação de folículos maiores.

Já havia sido previamente reportada uma alta taxa de metabolismo de esteróides em vacas lactantes devido à alta ingestão de alimento (Sangsritavong et al., 2002) e maiores concentrações de estradiol em novilhas do que em vacas lactantes (INBAR et al., 2001; SARTORI et al., 2002).

Estudos comparando vacas em lactação ou secas mostraram que vacas em lactação desenvolvem folículos subordinados e dominantes maiores (DE LA SOTA et al., 1993; BEAM¹, 1995 apud SARTORI et al., 2002a, p. 2819), mas com altas

¹ Beam, S.W. 1995. Follicular development in postpartum dairy cattle: effects of energy balance and dietary lipid. Ph.D. Diss., Cornell University, Cornell.

(LOPEZ et al., 2004), similares (DE LA SOTA et al., 1993) ou reduzidas concentrações de estradiol (BEAM¹, 1995 apud SARTORI et al., 2002a, p. 2819). Foi constatado que vacas em lactação apresentam diâmetro folicular ovulatório maior no verão (18,6mm), em relação ao inverno (17,4mm; SARTORI et al.; 2002a), ou aumento no diâmetro do segundo maior folículo, sobretudo em condições de estresse calórico agudo, tanto em vacas lactantes quanto em novilhas (WILSON et al., 1998a,b).

De forma similar ao observado por Lopez, Sartori e Wiltbank (2004) que trabalharam com vacas em lactação apresentando codominância de folículos, Roth et al. (2000), também observaram aumento nas concentrações de FSH e diminuição na Inibina em vacas lactantes submetidas a estresse calórico agudo. Ainda, na pesquisa de Roth et al. (2000), mesmo as vacas de ambos os grupos estando em alta lactação (em média 35 kg de leite/ dia), houve diminuição significativa nas concentrações de estradiol ($P < 0,01$) e inibina ($P < 0,02$) no grupo estressado em relação ao não-estressado, reforçando a hipótese de que há um efeito deletério aditivo do estresse calórico e da lactação que influencia negativamente os mecanismos endócrinos e a dinâmica ovariana em bovinos.

É sabido que a alta taxa de metabolismo de esteróides em vacas lactantes é devida à alta ingestão de alimento (SANGSRITAVONG et al., 2002). De maneira oposta, no presente experimento e em muitos outros, a resposta termorregulatória imediata ao estresse calórico é a redução do consumo de matéria seca e do fluxo sanguíneo hepático (BLACKSHAW; BLACKSHAW, 1994; MCGUIRE et al., 1989; TROUT et al., 1998), o que provavelmente também diminui o metabolismo hepático dos esteróides.

De acordo com as considerações apresentadas, é possível inferir que o decréscimo das concentrações de progesterona, estrógenos e inibina, e o conseqüente aumento da pulsatilidade de FSH em animais com estresse calórico, resultam de alterações na função das células da granulosa (WOLFENSON et al., 1995; ROTH et al., 2000,2001a,b) e que a lactação afeta no metabolismo de

esteróides (INBAR et al., 2001; SANGSRITAVONG et al., 2002; SARTORI et al., 2002; LOPEZ; SARTORI; WILTBANK, 2004).

Assim, a hipótese sugerida no presente trabalho é que o efeito deletério aditivo do estresse calórico e da lactação provém de mecanismos inicialmente distintos, mas que culminam com efeitos similares à dinâmica ovariana, competência oocitária e desenvolvimento embrionário. Este efeito poderia se estabelecer por dois principais caminhos. Primeiramente, o estresse calórico provoca redução na esteroidogênese e na síntese de inibina, devido a danos nas células e/ou receptores foliculares e luteínicos, que poderiam ocasionar injúrias ao metabolismo folicular e diminuição da competência oocitária, desde a fase de folículo pré-antral. Posteriormente, na fase de seleção e dominância folicular em vacas lactantes de alta produção, além da reduzida esteroidogênese, a alta taxa de metabolismo dos esteróides produzidos colaboraria reduzindo ainda mais a disponibilidade de tais hormônios na regulação hipotalâmico-hipofisária da liberação de FSH e LH, comprometendo a dominância folicular e ocorrência do pico pré-ovulatório de LH.

Os resultados aqui apresentados mostram que também houve efeito tardio do estresse calórico sobre o crescimento folicular, visto que a codominância de folículos e o significativo aumento no diâmetro folicular, associado a uma diminuição sustentada das concentrações séricas de progesterona, persistiu por 21-28 dias após a retirada do estresse, correspondendo a 49-56 dias após o início do estresse (Figura 24).

Esta observação pode ser explicada pelo fato de os folículos ovarianos e, possivelmente os oócitos, serem precocemente susceptíveis ao efeito adverso da alta temperatura ambiental (BADINGA et al., 1993; WOLFENSON et al., 1995), considerando que leva aproximadamente 40 a 50 dias para os mesmos desenvolverem-se do início da fase antral até a fase pré-ovulatória (LUSSIER; MATTON; DUFOUR, 1987).

Ainda, nossos resultados corroboram com outros estudos realizados no Hemisfério Norte e em Israel, nos quais, mesmo com a queda do ITU, a taxa de fertilidade dos rebanhos nos dois primeiros meses do outono continua mais baixa do que no final do outono e no inverno (HANSEN, 1997; WOLFENSON et al., 1997; ROTH et al., 2001a).

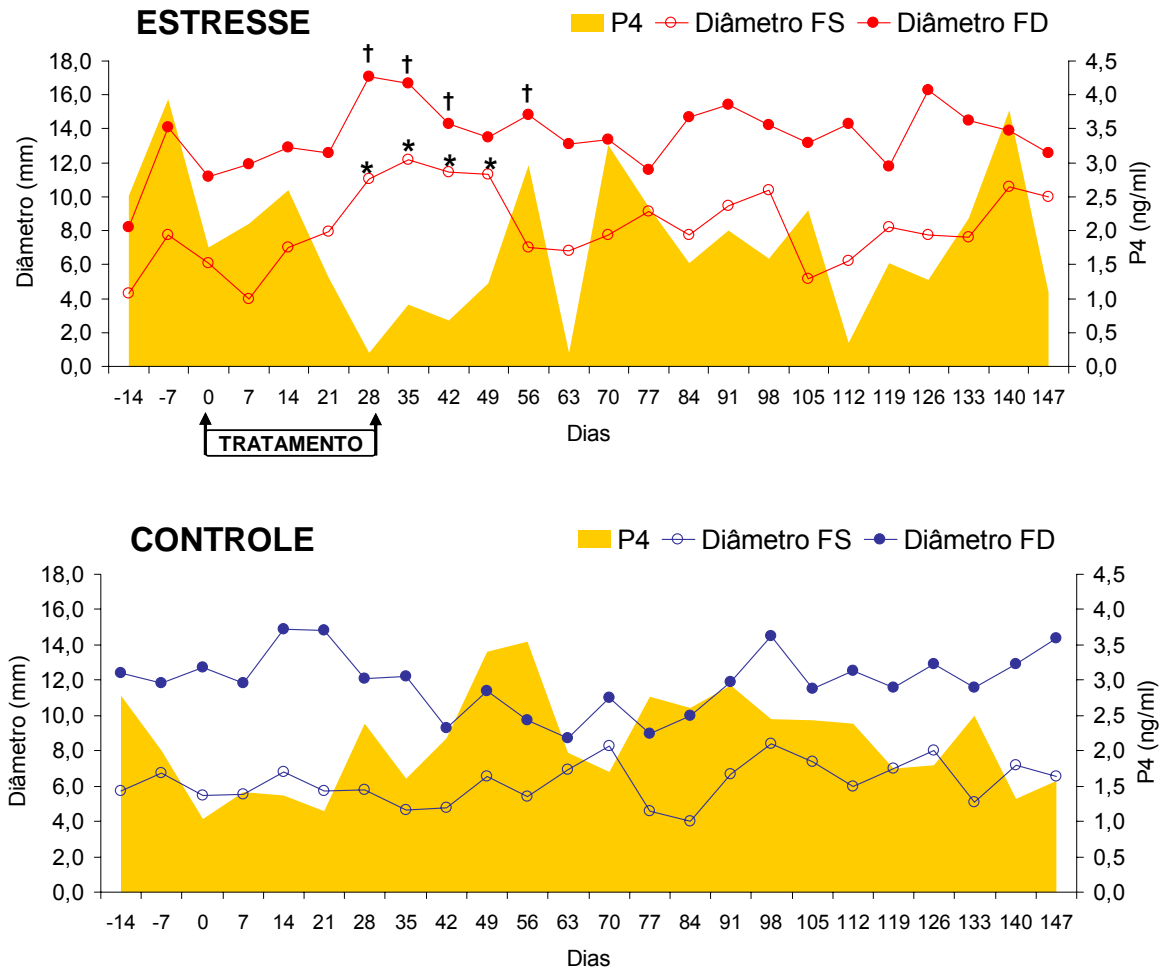


Figura 24 - Média (\pm E.P.M.) do diâmetro do folículo dominante (FD; linhas com círculos sólidos) e do maior folículo subordinado (FS; linhas com círculos abertos) visualizados no momento da aspiração folicular e concentração plasmática de progesterona (P4; área amarela) nos Grupos Controle (gráfico inferior) e Estresse (gráfico superior) durante o período experimental. † = Diâmetro do FD difere entre os tratamentos ($P < 0,05$); * = Diâmetro do FS difere entre os tratamentos ($P < 0,05$)

Os diâmetros do maior e segundo maior folículos no momento da aspiração foram respectivamente $11,7 \pm 0,6$ e $6,0 \pm 0,5$ mm nas aspirações realizadas sob fase folicular (progesterona <1 ng/mL) prévia à fase luteínica (1 semana antes) e de $13,4 \pm 0,5$ e $7,9 \pm 0,5$ mm nas aspirações realizadas durante a primeira colheita em fase luteínica (progesterona ≥ 1 ng/mL).

Embora os diâmetros foliculares tenham sido significativamente menores ($P < 0,01$) nos exames realizados na fase folicular (progesterona <1 ng/mL), a presença de folículos grandes uma semana antes do início da fase luteínica (progesterona ≥ 1 ng/mL) demonstra que está ocorrendo ou ovulação de um folículo codominante no intervalo entre as punções foliculares, ou luteinização do folículo aspirado na semana anterior.

A possível ocorrência de ovulações no intervalo entre aspirações é coerente com a observação de que a realização de até três punções durante o ciclo estral não afeta a duração do mesmo (PIETERSE et al., 1991; GIBBONS et al., 1994; AMIRIDIS et al., 1999; VIANA et al., 2004). Por outro lado, se esta segunda hipótese puder ser comprovada em estudos futuros, poderá se concluir que a simples aspiração de folículos em fase pré-ovulatória pode produzir estímulo endócrino suficiente para que haja a ocorrência de luteinização folicular parcial ou total, permitindo a ciclicidade ovariana com intervalos entre fases foliculares similares aos encontrados no ciclo estral fisiológico (em torno dos 21 dias de duração), principalmente em animais não estressados (Figuras 14 e 25).

O diâmetro do folículo dominante e as concentrações de progesterona em cada um dos animais experimentais estão ilustrados individualmente na figura 25.

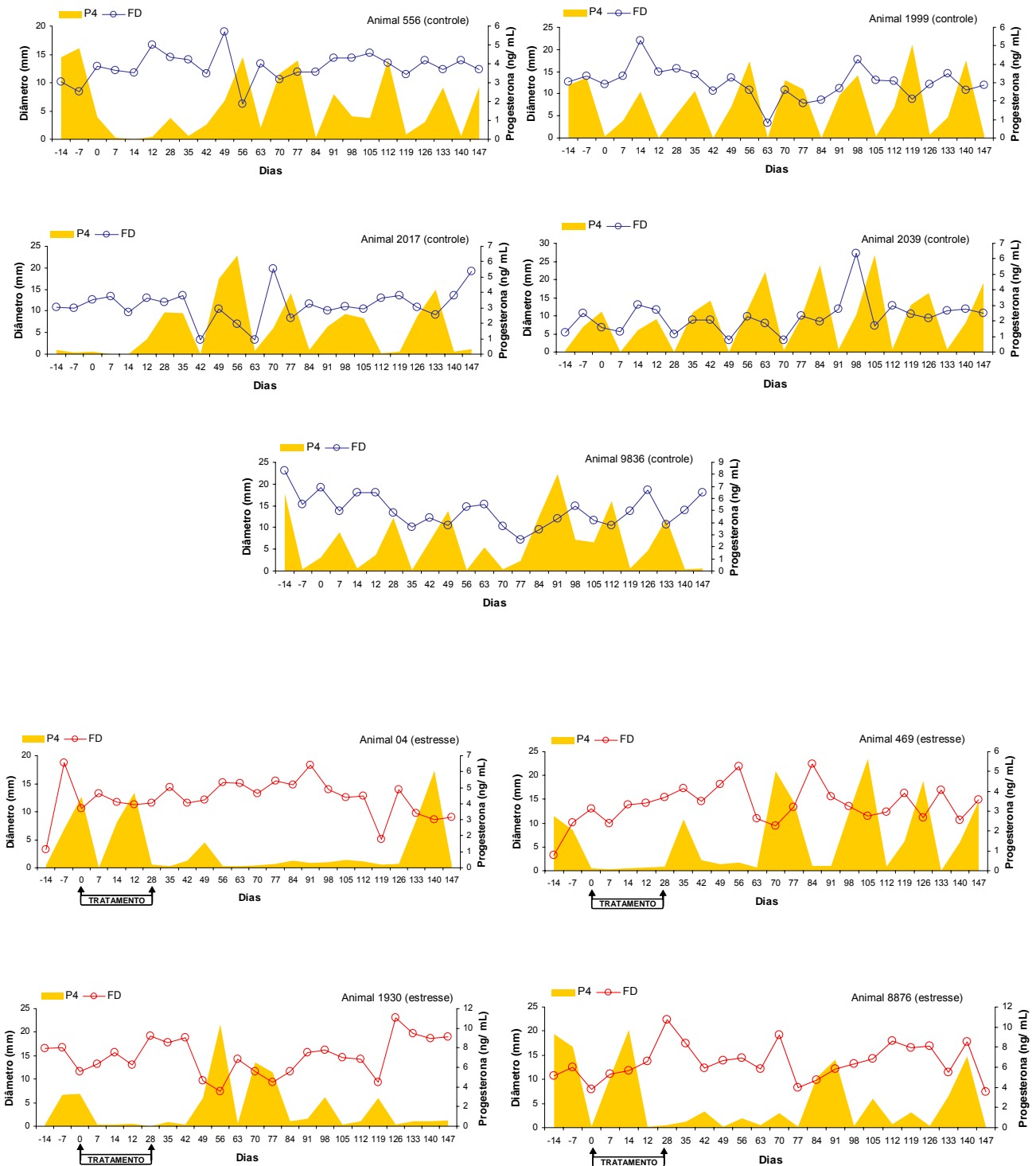


Figura 25 - Perfil plasmático individual de progesterona (P4; área amarela) e diâmetro do folículo dominante (FD; linhas com círculos abertos) visualizado no momento da aspiração folicular nos animais dos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental

Os resultados aqui apresentados estão em concordância com os observados em vacas lactantes durante o verão (JONSSON et al., 1997; SARTORI et al., 2004) ou em estresse calórico agudo induzido (RONCHI et al., 2001) nos quais foi observada diminuição tanto na progesterona quanto no estradiol plasmáticos. No entanto, os trabalhos que estudam o efeito do estresse calórico materno sobre a concentração intra-folicular e a capacidade esteroidogênica de células foliculares cultivadas *in vitro*, apontam que há aumento na progesterona produzida localmente (WOLFENSON et al., 1997; ROTH et al., 2001b; BRIDGES; BRUSIE; FORTUNE, 2005) ou que não houve diferença significativa entre animais estressados e não estressados (ROTH et al., 2000; GUZELOGLU et al., 2001).

No presente estudo, as alterações no desenvolvimento folicular em resposta ao estresse calórico ocasionaram menor percentual de ovulações e/ou luteinização de folículos entre as aspirações (Grupo Estresse; Figuras 25), correspondendo a uma menor produção de corpos lúteos e, conseqüentemente, diminuição do número de dias com progesterona acima de 1ng/mL.

Outra possível explicação para a redução da progesterona plasmática em bovinos submetidos a ambientes muito quentes é a baixa disponibilidade de colesterol a ser usado como substrato para biossíntese de esteróides sexuais devido à diminuição do metabolismo lipídico provocado pela queda no consumo de matéria seca (RONCHI et al., 1999). Baixa concentração de progesterona pode, ainda, aumentar a freqüência dos pulsos de LH (ROBERSON et al., 1989; BERGFELT et al., 1991; ADAMS et al., 1992), causando maturação oocitária prematura (REVAH; BUTLER, 1996) e queda na qualidade do oócito à ovulação, com conseqüente diminuição na viabilidade embrionária após a fertilização (AHMAD et al., 1995).

Também foi observada luteólise precoce (dias 11 a 14) no ciclo estral correspondente à indução de estresse térmico em câmara climática (32°C por dois ciclos consecutivos) em novilhas (RONCHI et al., 2001). Estes resultados concordam com os observados no presente experimento, no qual houve um alto percentual (37,5%) de ciclos luteínicos de curta duração (Grupo Estresse; Tabela 5).

Por outro lado, Wilson et al. (1998a,b) observaram que o estresse calórico de $32,2 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ entre os dias 13 e 22 do ciclo estral de novilhas e vacas lactantes, ocasionou atraso na luteólise do referido ciclo. Os autores sugerem que este atraso pode ser causado pela diminuição no estradiol folicular e plasmático que leva a uma falha em iniciar o estímulo à síntese de receptores endometriais de oxitocina e

ativação das enzimas associadas com a síntese de Prostaglandina F_{2α}, que culminam com a luteólise (SILVIA et al., 1991).

Segundo Rensis e Scaramuzzi (2003) e Wilson et al. (1998a,b), as discrepâncias observadas entre os diferentes trabalhos são devidas ao efeito de outros fatores não controlados que podem afetar as concentrações dos esteróides sexuais, como por exemplo, a severidade ou o tipo de estresse calórico (agudo ou crônico), além de diferenças em relação ao *status* fisiológico ou à ingestão de matéria seca que podem confundir as interpretações, visto que as concentrações plasmáticas são determinadas pela diferença entre a produção folicular ou luteínica e a taxa de metabolismo hepático.

6.5 QUALIDADE OOCITÁRIA E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Dos 2195 CCO's coletados, 1239 (56,4%) foram considerados viáveis e selecionados para MIV, sendo 845 (31,8%) Grau I e 394 (68,2%) Grau II. Os resultados da classificação dos CCO's recuperados nos respectivos grupos e fases experimentais estão demonstrados na tabela 10. Não houve efeito do tratamento de estresse calórico sobre o percentual de oócitos considerados viáveis à maturação e fertilização *in vitro*, pois a diferença ($P < 0,05$) ocorrida na fase de pré-estresse foi provavelmente devido ao efeito individual, visto que o número (n) de sessões e total de CCO's produzidos nesta fase foi menor do que nas fases posteriores, favorecendo as diferenças existentes entre doadoras. Considerando a avaliação mais criteriosa dos CCO's, pôde-se observar que, na fase de estresse calórico, houve aumento significativo no percentual de estruturas degeneradas ($P < 0,05$) e tendência a um maior percentual de CCO's com zona pelúcida sem ooplasma ou rompida ($P < 0,1$).

Tabela 10 – Qualidade oocitária (número e percentual) nos Grupos Controle e Estresse durante as diferentes fases experimentais – Valença – 2005.

Classificação CCO's	Fase I		Fase II		Fase III	
	Controle	Estresse	Controle	Estresse	Controle	Estresse
Grau I	31 (27,7%)	45 (31,5%)	64 (26,6%)	65 (24,5%)	118 (16,6%)	76 (14,2%)
Grau II	38 (33,9%)	63 (44,1%)	100 (41,5%)	107 (40,4%)	308 (43,3%)	229 (42,8%)
Parcialmente Desnudo	13 (11,6%)	8 (5,6%)	22 (9,1%)	23 (8,7%)	83 (11,7%)	71 (13,3%)
Desnudo	11 (9,8%) ^a	2 (1,4%) ^b	20 (8,3%)	19 (7,2%)	63 (8,8%)	45 (8,4%)
Cúmulus expandido	5 (4,5%)	9 (6,3%)	17 (7,1%) ^x	9 (3,4%) ^y	35 (4,9%)	16 (3,0%)
Degenerado	11 (9,8%)	15 (10,5%)	15 (6,2%) ^b	32 (12,1%) ^a	57 (8,0%)	45 (8,4%)
Zona pelúcida	3 (2,7%)	1 (0,7%)	3 (1,2%) ^y	10 (3,8%) ^x	48 (6,7%)	53 (9,9%)
CCO's viáveis	69 (61,6%) ^b	108 (75,5%) ^a	164 (68,0%)	172 (64,9%)	426 (59,8%)	305 (57,0%)
TOTAL (n)	112	143	241	265	712	535

^{ab} (P<0,05); ^{xy} (P<0,1)

Conforme mostrado na análise semanal (Figura 26), o percentual de oócitos viáveis foi bastante variável, e diminuiu significativamente no terço final do experimento, comprovando ter havido efeito do número de sessões de OPU sobre a qualidade oocitária (P<0,01).

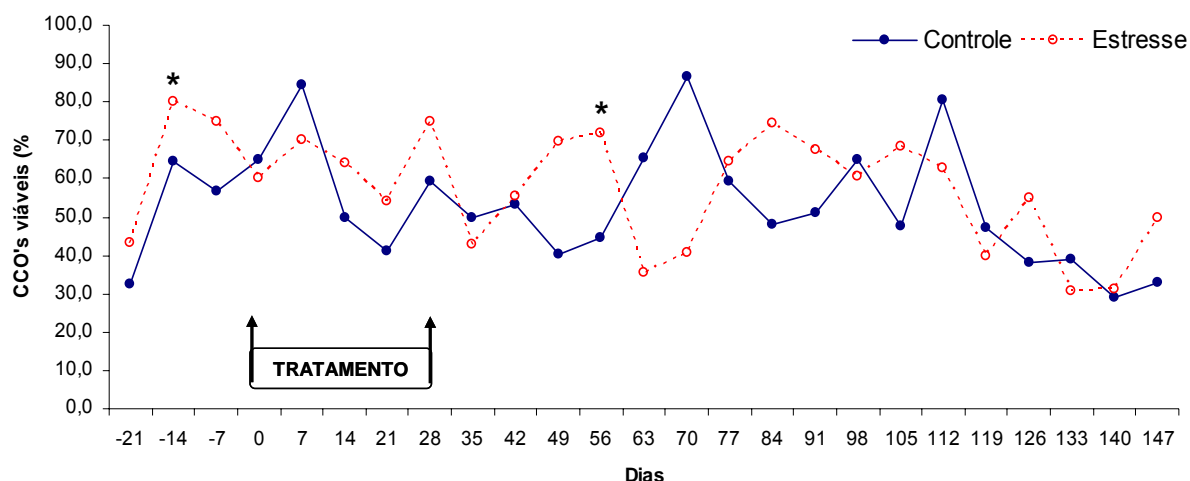


Figura 26 - Percentual de oócitos viáveis selecionados para maturação *in vitro* nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental. * P<0,05

A qualidade oocitária também foi afetada negativamente pela codominância de folículos no momento da aspiração folicular. As características relativas à

qualidade dos CCO's, influenciadas pela codominância, estão apresentadas na tabela 11. As variáveis inerentes à competência oocitária *in vitro* não foram influenciadas pela codominância folicular (Tabela 11).

Tabela 11 - Efeito da codominância folicular sobre a qualidade oocitária e a produção *in vitro* de embriões – Valença – 2005

Variável resposta	Com/COD	Sem/COD
Taxa de recuperação	477/1047 (45,5%) ^b	1718/3339 (51,4%) ^a
Oócitos grau 1 vaca/sessão	1,2 ± 0,2 ^b	2,0 ± 0,2 ^a
Oócitos grau 1	74/477 (15,5%) ^b	341/1718 (19,84%) ^a
Oócitos viáveis vaca/sessão	4,6 ± 0,6 ^b	6,3 ± 0,4 ^a
Oócitos viáveis	278/477 (58,3%)	1040/1718 (60,5%)
Taxa de Clivagem	128/171 (74,8%)	531/762 (69,7%)
Taxa de Blastocistos	34/128 (26,5%)	155/579 (26,8%)
Embriões vaca/sessão	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1

^{ab} (P<0,05)

Das 24 sessões de OPU-PIV realizadas, sete (29,2%) não produziram blastocistos em ambos os grupos experimentais, sendo que as cinco primeiras sofreram problemas relacionados à contaminação nos meios de cultivo. As duas últimas sessões de OPU-PIV (dias 140 e 147; não incluídos nas figuras 27 e 28) representaram punções foliculares nas quais o número de CCO's viáveis por grupo foi geralmente baixo (7,3±1,5; 4 a 9 CCO's por gota) e com apenas 37% dos CCO's fecundados apresentando qualidade equivalente a Grau I, o que pode ter prejudicado o desenvolvimento embrionário *in vitro* já desde a fase de clivagem.

Segundo Merton et al. (2003), a produção *in vitro* de blastocistos foi afetada quando houve reduzido número de CCO's por gota no meio de maturação, principalmente nos CCO's de Grau II, que corresponderam em média a 68,2% das estruturas viáveis aqui apresentadas.

Considerando que somente os CCO's de Grau I e II foram selecionados para MIV, este critério de seleção e classificação de estruturas pareceu exercer influência somente sobre as taxas de clivagem, visto que esta também não apresentou alterações associadas ao estresse calórico. Contudo, a qualidade dos CCO's maturados e o desenvolvimento dos embriões até 72 horas pós-inseminação (taxa de clivagem) não apresentaram correlação direta com a taxa de produção de blastocistos sete dias pós-inseminação.

Estes resultados encontram-se em concordância com os relatos de Blondin e Sirard (1995) e Wurth e Kruij (1992), nos quais foi verificado que animais com alto número de CCO's Grau I e II não apresentaram necessariamente altas taxas de produção de blastocistos. Por outro lado, estes achados contradizem, até certo ponto, as observações feitas por Hashimoto et al. (1998) e Merton et al. (2003), que afirmam que a competência de oócitos bovinos é induzida proporcionalmente à densidade de células do *cúmulus* que o rodeiam.

A tendência do Grupo Estresse em apresentar menor frequência de CCO's maturados (*cúmulus* expandido) pode ser devido a falhas no processo de reativação da meiose oocitária LH-dependente (ROTH; HANSEN, 2005). Segundo Wiltbank et al. (2006), a diminuição nas concentrações circulantes de esteróides sexuais retarda e diminui a amplitude do pico pré-ovulatório de LH, comprometendo a viabilidade do oócito ovulado.

A taxa de clivagem não variou entre os tratamentos experimentais nem sofreu efeito de sessão de aspiração folicular (Figura 27 e Tabela 12). Somente foi observada uma tendência do Grupo Estresse em apresentar clivagem com apenas duas células na fase de pós-estresse [Controle; 8,5% (27/317) vs. Estresse; 13,0% (30/230); $P < 0,1$], o que provavelmente contribuiu para a diminuição da taxa de produção de blastocistos nesta fase (Figura 28 e Tabela 12).

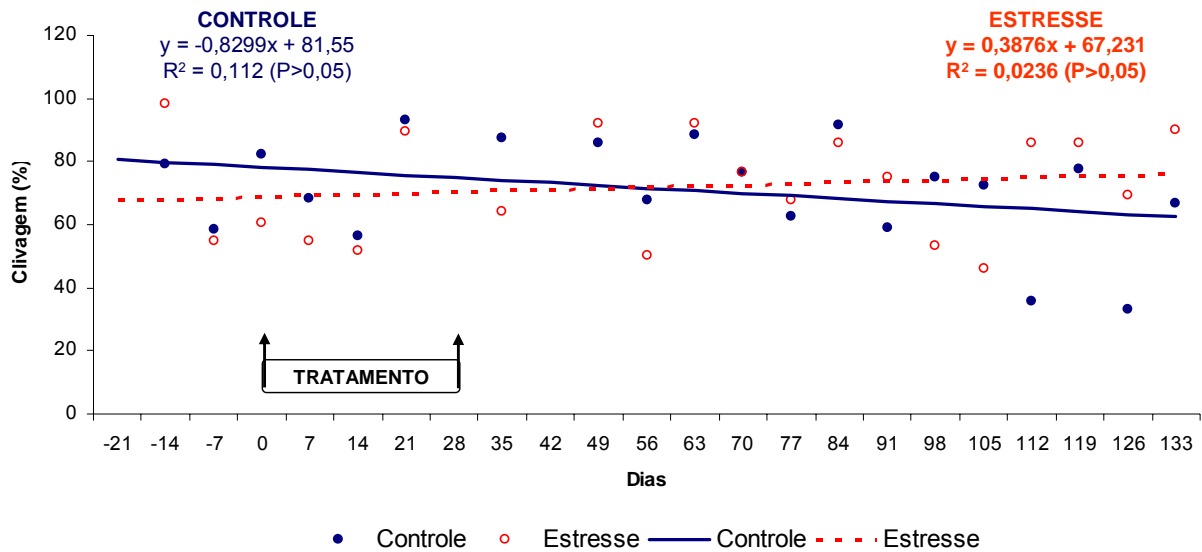


Figura 27 - Percentual de estruturas clivadas *in vitro* nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental

No presente experimento, a taxa de clivagem total não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$; Figura 26 e Tabela 12), corroborando com Putney et al. (1989), que observaram taxa de fertilização de oócitos *in vivo* similar para novilhas com estresse calórico ou em ambiente termoneutro, e concluíram que oócitos bovinos são capazes de responder à fertilização iniciando o processo de clivagem, apesar da elevação da temperatura corpórea, tal qual ocorreu no estudo aqui apresentado e em muitos outros (ROCHA et al., 1998; RUTLEDGE et al., 1999; RIVERA et al., 2000; AL-KATANANI et al., 2002). Também foi reportado não haver efeito do choque térmico logo após a fertilização *in vitro* no desenvolvimento inicial de oócitos em bovinos (BARROS et al., 2006) ou do estresse calórico materno *in vivo* sobre a taxa de fertilização *in vivo* em camundongos e em ovelhas (DUTT, 1963; BAUNGARTNER; CHRISMAN; 1981). Contudo, em ambos os trabalhos, a exposição dos oócitos a elevada temperatura resultou em mortalidade embrionária pré e pós-implantação, tendo apresentado retardo no desenvolvimento e falhas de até 85% na capacidade de ultrapassar o estágio de 8-16 células. O mesmo tem ocorrido quando se provoca choque térmico *in vitro* em zigotos tanto *Bos taurus* quanto *Bos indicus* (BARROS et al., 2006).

Em inúmeros trabalhos também já havia sido citado que após choque térmico *in vitro*, não há alteração no desenvolvimento embrionário até a fase de 8 a 16 células, porém com diminuição significativa na produção de blastocistos e na taxa de eclosão embrionária (EDWARDS; HANSEN, 1996,1997; KRININGER III et al., 2003; PAULA-LOPES et al., 2003; BARROS et al., 2006).

De forma contrastante, outros estudos demonstraram haver efeito sazonal também na taxa de fertilização/clivagem (MONTY; RACOWSKY, 1987; ZERON et al., 2001). No presente experimento a taxa de clivagem com somente duas células tendeu a ser maior no Grupo Estresse em relação ao Controle ($P < 0,01$). Já foi descrito anteriormente que o choque térmico *in vitro* em oócitos ainda na fase de vesicular germinativa (PAYTON et al., 2004) ou mesmo tardiamente, durante o estágio de maturação (EDWARDS; HANSEN, 1997; ROTH; HANSEN, 2004a,b), induz apoptose, prejudicando o processo final da maturação e o potencial de desenvolvimento embrionário pós-inseminação (ROTH et al., 2005).

As linhas ajustadas por regressão linear apresentadas na figura 28 mostram que houve queda significativa na produção de blastocistos no Grupo Estresse ($P < 0,001$) e uma tendência de aumento na diferença entre os grupos experimentais com o passar das sessões de OPU.

O Grupo Controle apresentou diminuição da taxa de produção de blastocistos durante o período experimental, mas não se verificou efeito significativo ($P > 0,05$; Figura 28).

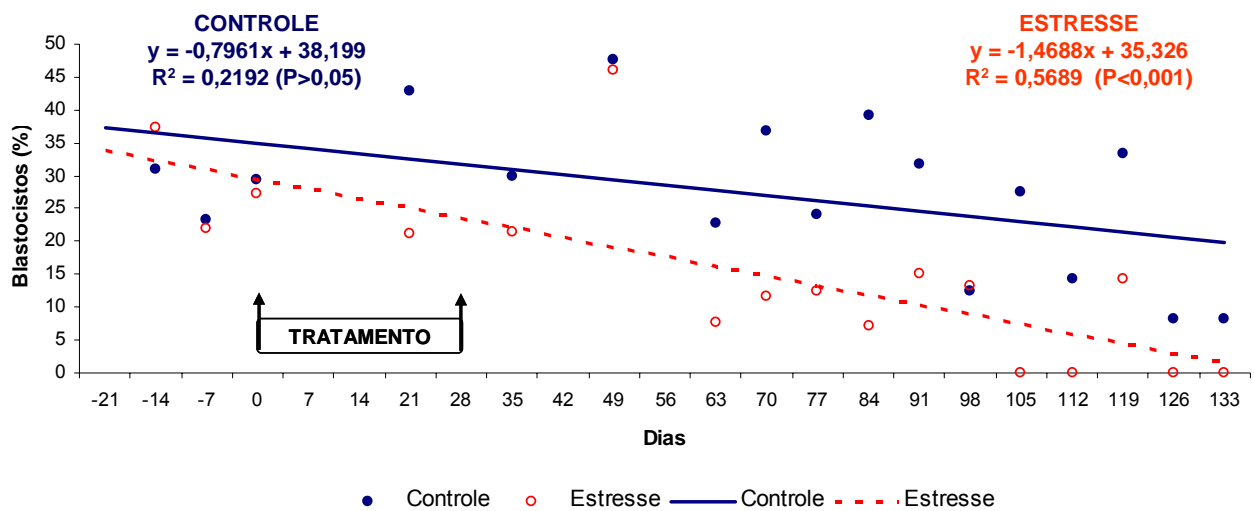


Figura 28 - Percentual de blastocistos produzidos *in vitro* Grupos Controle e Estresse durante o período experimental

Não foi observada melhoria na produção de blastocistos no Grupo Estresse até o final do experimento, que correspondeu a 105 dias após a retirada do fator estressante (Figura 28 e Tabela 12).

Tabela 12 - Competência *in vitro* (número e percentual) de oócitos coletados por aspiração folicular *in vivo* nos Grupos Controle e Estresse durante o período experimental – Valença – 2005

Variável resposta	Fase I		Fase II		Fase III	
	Controle	Estresse	Controle	Estresse	Controle	Estresse
Clivagem (3 dias)	n=59	N=105	n=101	n=121	n=317	n=230
2 células	9 (15,3%)	9 (8,6%)	21 (20,8%)	18 (14,9%)	27 (8,5%) ^y	30 (13,0%) ^x
4 a 8 células	19 (32,2%)	36 (34,3%)	37 (36,6%)	41 (33,9%)	143 (45,1%)	88 (38,3%)
> 8 células	16 (27,1%)	39 (37,1%)	14 (13,9%)	15 (12,4%)	56 (17,7%)	41 (17,8%)
Total	44 (74,6%)	87 (82,9%)	72 (71,3%)	74 (61,2%)	226 (71,3%)	159 (69,1%)
Embriões (7 dias)	n=59	n=105	n=31	n=52	n=279	n=188
BI	11 (18,6%)	16 (15,2%)	2 (6,5%)	5 (9,6%)	27 (9,7%)	11 (5,9%)
BL	8 (13,6%)	17 (16,2%)	6 (19,4%)	6 (11,5%)	41 (14,7%) ^a	13 (6,9%) ^b
BLX	4 (6,8%)	8 (7,6%)	3 (9,7%)	2 (3,8%)	8 (2,9%) ^x	1 (0,5%) ^y
Total	16 (27,1%)	33 (31,5%)	11 (35,5%)	13 (25,0%)	76 (27,2%) ^a	25 (13,3%) ^b
Embriões/ Doadora	2,1±1,1^y	4,1±1,0^x	0,4±0,3	0,5±0,3	0,9±0,2^x	0,4±0,1^y

^{ab} (P<0,05); ^{xy} (P<0,1); BI = blastocisto inicial; BL = blastocisto; BX = blastocisto expandido

Os efeitos de tratamento, fase experimental e sessão de OPU-PIV são apresentados na tabela 13.

Tabela 13 – Efeitos das variáveis classificatórias para cada variável resposta inerente à OPU-PIV e suas respectivas interações

Variável resposta	Efeitos (Valor de P)				
	Tratamento	Fase	Sessão	Tratamento X Fase	Tratamento X Sessão
Folículos visualizados	0,26	<0,01	<0,01	0,57	0,98
Folículos pequenos (<6mm)	0,61	<0,01	<0,01	0,51	0,98
Folículos médios (6-9 mm)	0,62	0,32	0,44	0,64	0,92
Folículos grandes (>9mm)	<0,01	0,30	0,08	0,23	0,69
Diâmetro do maior folículo	<0,01	0,04	0,07	0,05	0,21
Diâmetro do 2º maior folículo	<0,01	0,02	0,19	0,06	0,35
Folículos aspirados	0,22	<0,01	<0,01	0,69	0,98
CCO's recuperados	0,39	<0,01	0,03	0,15	0,93
Embriões/ doadora	0,02	<0,01	0,01	0,05	0,58

Vários estudos indicam que oócitos e embriões *Bos indicus* são mais resistentes ao choque térmico do que *Bos taurus* (MALAYER; HANSEN, 1990; KAMWANJA et al., 1994; PAULA-LOPES et al., 2003; HERNÁNDEZ-CERÓN; CHASE JR.; HANSEN, 2004). De forma contrastante, esta diferença entre subespécies e/ou raças não foi observada para embriões na fase de 2 a 4 células (KRININGER III et al., 2003). Por outro lado, embriões Nelore, principalmente 12 horas pós-inseminação (2 células; BARROS et al., 2006) ou Brahman 96 horas pós-inseminação (>8 células; PAULA-LOPES et al., 2003) foram mais resistentes ao choque térmico do que Holandês, Angus ou ½ sangue *indicus x taurus* em mesmo estágio de desenvolvimento. Adicionalmente, foi citado que os bovinos *Bos taurus* adaptados (Romosinuano e Senepol) apresentaram alta resistência de oócitos e linfócitos ao choque térmico (KAMWANJA et al., 1994; PAULA-LOPES et al., 2003; HERNÁNDEZ-CERÓN; CHASE JR.; HANSEN, 2004).

Há, ainda, relatos de que o choque térmico *in vitro* aumenta a síntese e secreção de proteínas para o lúmen em explantes de endométrio e ovidutos,

principalmente em animais *Bos indicus* (MALAYER; HANSEN, 1990; PAULA-LOPES et al., 2003), podendo estar associado à manutenção de um ambiente mais favorável ao desenvolvimento embrionário em condições de estresse calórico materno.

Segundo Krininger III et al. (2003), a provável explicação para as discrepâncias nos resultados *in vitro* é a diferença entre as fases de desenvolvimento dos embriões no momento em que o choque térmico foi aplicado, ou ainda a intensidade e duração do mesmo (RENSIS; SCARAMUZZI, 2003).

Ainda, tais achados podem ser devidos ao fato de que as primeiras clivagens correspondem à fase crítica na qual a ativação genômica ocorre, passando do controle materno para o embrionário (KING; NAIR; BETTERIDGE, 1985; SCHULTZ, 2002). Neste período parece haver relativa susceptibilidade ao estresse calórico, conduzindo à falhas na ativação do genoma embrionário e no desenvolvimento de blastocistos.

Visto que o genoma embrionário não é ativado completamente até a fase de 8 a 16 células, é possível que alguns dos genes que conferem resistência celular ao choque térmico em *Bos indicus* ainda não tenham sido expressados na fase de 2 a 4 células (MEMILI; FIRST, 2000).

Outros possíveis efeitos de variação sobre a competência oocitária, segundo Eberhardt (2005), podem ser o ambiente e adaptabilidade local das doadoras, efeito de raça dentro da mesma subespécie, qualidade nos oócitos de abatedouro ou diferenças nos meios de cultivo, já que, deste ponto de vista, os efeitos do choque térmico aparentemente foram menos deletérios em embriões Nelore obtidos no Brasil (EBERHARDT, 2005) do que em embriões Brahman obtidos nos Estados Unidos (KRININGER III et al., 2003; PAULA-LOPES et al., 2003).

Nos resultados aqui apresentados, o estresse calórico materno ocasionou diminuição significativa na produção de embriões em doadoras *Bos indicus*, sobretudo na fase de 28 a 133 dias (fase pós-estresse). Na fase de estresse agudo (0 a 21 dias) a taxa de produção de blastocistos foi maior no Grupo Controle do que no Grupo Estresse (35,5 vs. 25,0%, respectivamente), mas esta diferença não foi significativa ($P=0,15$).

Os efeitos do estresse calórico materno já haviam sido anteriormente citados por Rocha et al. (1998), que observaram queda na qualidade ($P=0,02$), na taxa de clivagem ($P=0,06$) e no desenvolvimento *in vitro* de blastocistos ($P=0,003$).

produzidos a partir de oócitos de vacas Holandesas e cruzamentos Angus (*Bos taurus*) na Louisiana (USA) durante o verão (22,0 a 30,4°C; 82% UR) em relação ao inverno (11,5 a 18,0°C; 78% UR).

Porém, de forma contrastante, os mesmos autores observaram alta proporção de CCO's de boa qualidade e alta taxa de blastocistos em oócitos coletados de doadoras Brahman (*Bos indicus*), não apresentando diferença em nenhuma das referidas variáveis entre as estações do ano ($P=0,6$), embora a taxa de blastocistos tenha caído em torno de 10% (inverno; $52,3 \pm 13,5\%$ vs. final do verão; $41,3 \pm 7,0\%$) conforme ocorreu na fase de estresse (Fase II) do experimento aqui apresentado (Tabela 12). Vale ressaltar que, no estudo aqui relatado, as fêmeas *Bos indicus* foram submetidas a ITU mais elevado, caracterizando uma condição de estresse calórico severo (38°C; 80% UR) com 28 dias de duração, o que pode ter ocasionado danos substancialmente maiores.

Outra observação interessante feita por Rocha et al. (1998) é a de que há efeito cumulativo do calor em relação à competência oocitária, mostrando que, em vacas Holandesas, houve queda na produção *in vitro* de blastocistos de $32,7 \pm 14,2\%$ no inverno para $6,0 \pm 16,8\%$ ao início do verão, e de $29,0 \pm 14,8\%$ no inverno para $0,0 \pm 0,0\%$ ao final do verão. Este efeito cumulativo também foi observado em oócitos de matadouro, que produziram taxa de blastocistos maior no início do que no final do verão (RUTLEDGE et al., 1999).

Quanto se inseminou artificialmente vacas Holandesas em Israel, foi necessário um período equivalente a 3-4 ciclos estrais para a baixa fertilidade adquirida no verão ser restaurada no período do outono (RON; BAR-ANAN; WIGGANS, 1984). Estes dados de campo são similares a outros, nos quais a viabilidade embrionária *in vivo* em vacas Holandesas superestimuladas diminuiu de 59% no dia sete, para 27% no dia 14 na estação quente, mas não mostrou queda na estação fria (RYAN et al., 1993). Putney et al. (1989) observaram ainda que somente 12,0% dos embriões colhidos *in vivo* de novilhas holandesas com hipertermia apresentavam-se morfológicamente normais, contra 68,4% das doadoras em conforto térmico.

Ao contrário do verificado em pesquisas realizadas com animais *Bos taurus*, já foi citado que fêmeas *Bos indicus* sofrem problemas na função reprodutiva associados ao frio, tanto na fertilidade à inseminação artificial quanto no número e qualidade dos embriões coletados nos meses de inverno (BASTIDAS; RANDEL, 1987; STAHRINGER; NEUENDORFF; RANDEL, 1990). Observando resultados de

diferentes pesquisas, a interpretação de Rutledge et al. (1999), é que há outras variáveis que influenciam nos padrões sazonais de fertilidade nas fêmeas bovinas, tais como fotoperíodo e localização geográfica, além da disponibilidade nutricional, raça, idade e lactação (AL-KATANANI et al., 2002; DAHL; PETITCLERC, 2003).

Diferenças na taxa de produção de blastocistos entre fêmeas têm sido relatadas em alguns estudos (KRUIP et al., 1994; DAYAN et al., 2000; CAMARGO, 2002). Tamassia et al. (2003) observaram grandes variações no número de oócitos recuperados e na taxa de produção de blastocistos produzidos *in vitro*, porém maior produção de oócitos não implicou necessariamente em maior taxa de blastocistos. Assim, os referidos autores acreditam que o efeito individual da doadora sobre o potencial do oócito em se desenvolver até blastocisto após a fecundação deve ser levado em consideração em um programa de produção *in vitro* de embriões.

Embora esta variação individual possa ser considerada, nossos resultados mostram que as diferenças observadas na taxa de produção de blastocistos entre os Grupos Controle vs. Estresse na Fase II (35,5 vs. 25,0%, respectivamente; $P=0,15$) e, sobretudo na Fase III (27,2 vs. 13,3%, respectivamente; $P<0,001$) foram decorrentes do efeito deletério do estresse calórico materno, visto que não houve diferença significativa desta variável na fase pré-estresse (27,1 vs. 31,5%; respectivamente; $P=0,3$).

Outras variáveis que, segundo Tamassia et al. (2003) e Camargo (2002) poderiam incorrer em efeito de doadora, também não apresentaram diferenças entre os respectivos grupos, como por exemplo, número total de CCO's fertilizados (Controle; 477 vs. Estresse; 456; $P>0,05$) e clivados [Controle 342/477 (71,7%) vs. Estresse 320/456 (70,2%); $P>0,05$].

Nas condições experimentais aqui apresentadas, o estresse calórico causou diminuição na taxa de produção de blastocistos ao longo do tempo ($P<0,001$; Grupo Estresse; Figura 28). Ainda, foi verificado que um período de até 105 dias após a retirada dos animais da condição de estresse calórico agudo não foi suficiente para a recuperação da competência oocitária em fêmeas da raça Gir (*Bos indicus*).

Um outro estudo realizado no sul da Flórida (USA) também mostrou que a climatização de vacas por um período de 42 dias após um verão quente de 90 a 120 dias não suplantou os efeitos deletérios na qualidade e competência oocitária *in vitro* (AL-KATANANI et al., 2002). Entretanto, Roth et al. (2001a) verificaram que a eliminação do *pool* folicular, por meio de OPU freqüente, minimizou o efeito

prolongado do estresse calórico materno sofrido no verão. No referido estudo, as fêmeas submetidas a apenas uma sessão de OPU por ciclo estral permaneceram com baixa produção *in vitro* de embriões (1 a 3%) durante todo o outono, enquanto que, aquelas submetidas a quatro OPU por ciclo aumentaram o percentual de blastocistos produzidos de 10 para 20% nos ciclos 3 e 4 do outono, respectivamente.

No estudo aqui apresentado, não foi possível transpor o efeito prolongado do estresse calórico severo por meio de repetidas sessões de OPU. Além disso, houve queda numérica, porém não-significativa, na produção de embriões ao longo das 24 sessões de OPU realizadas em ambiente termoneutro ($P > 0,05$; Grupo Controle; Figura 28). Estes achados são sugestivos de que pode ter havido uma sobreposição do efeito de longo prazo do estresse calórico, adicionado ao fator mecânico de lesão ovariana contínua, conforme já descrito na literatura (ESPEY, 1994; WOLFENSON et al., 1997,2002; PETYIM et al., 2001; ROTH et al., 2000,2001a,b; AL-KATANANI et al., 2002; VIANA, 2002).

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, apoiados pelos relatos de Badinga et al. (1993); Kamwanja et al. (1994); Wolfenson et al. (1995; 1997); Hansen (1997; 2004); Rocha et al. (1998); Wilson et al. (1998 a,b); Roth et al. (2000; 2001a,b); Al-Katanani et al. (2002); Sangsritavong et al. (2002); Paula-Lopes et al. (2003) e Hernández-Cerón; Chase Jr.; Hansen (2004), pode-se sugerir que o estresse calórico afeta negativamente algumas funções ovarianas, causando efeitos deletérios estruturais e/ou metabólicos nos oócitos. Este efeito pode se manifestar anteriormente ao início da fase antral (42 dias; LUSSIER; MATTON; DUFOUR, 1987), ou mesmo primária (85 dias; PICTON et al., 1998; MCNATTY et al., 1999), culminando com a diminuição do potencial de desenvolvimento embrionário por um período superior ao relatado na literatura.

As respostas obtidas e as hipóteses levantadas no presente experimento estão sumarizadas na figura 29.

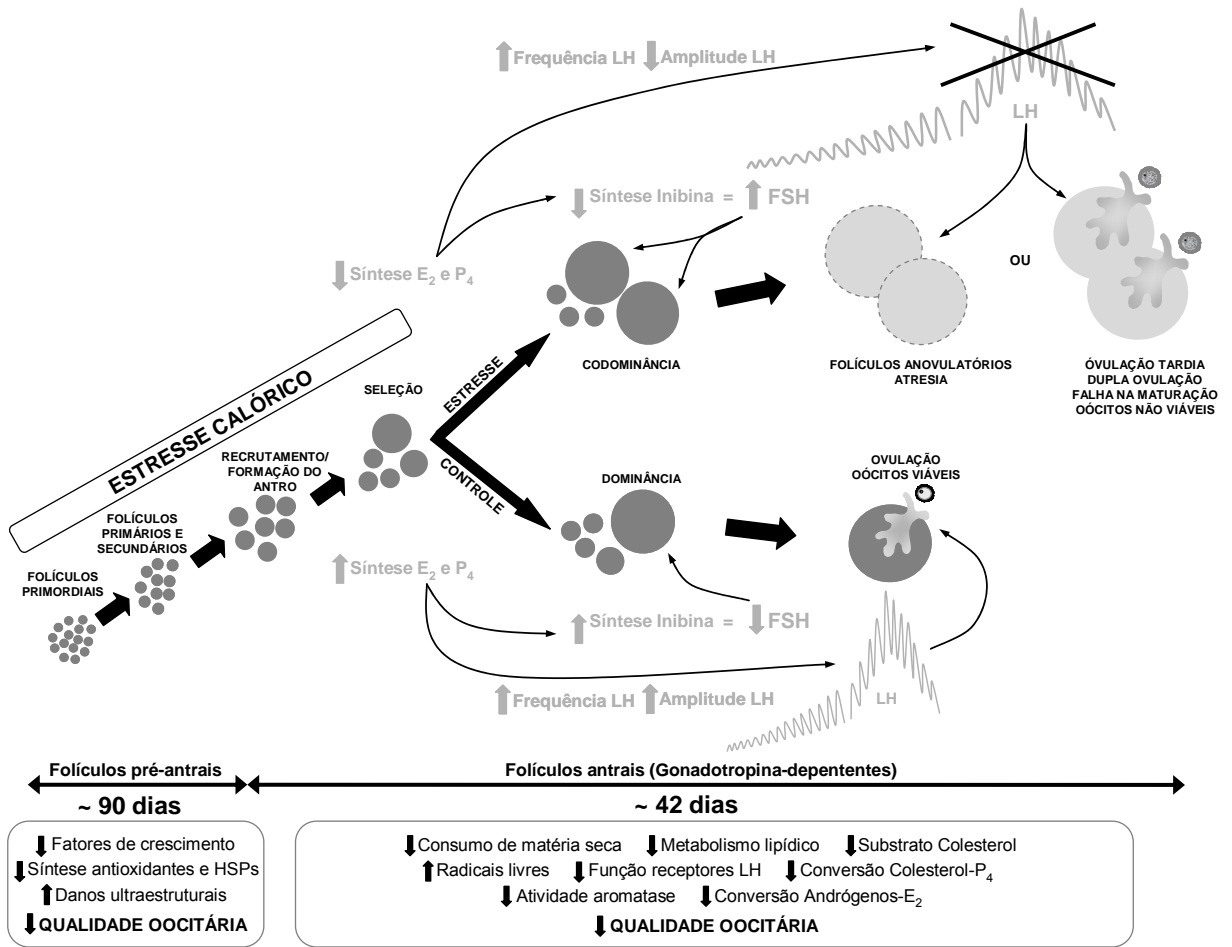


Figura 29 – Implicações do estresse calórico materno na dinâmica ovariana e competência oocitária. Modelo hipotético das interações multifatoriais que culminam com falhas reprodutivas em bovinos

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- O estresse calórico materno induzido foi suficiente para ocasionar alterações fisiológicas em fêmeas bovinas da raça Gir (*Bos indicus*).
- O estresse calórico materno não interferiu nas concentrações plasmáticas de Cortisol.
- O estresse calórico materno ocasionou diminuição significativa nas concentrações de progesterona no período pós-estresse e aumentou o percentual de animais com fase luteínica curta.
- O estresse calórico materno não afetou o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular, o número de folículos aspirados, a taxa de recuperação e o número de CCO's recuperados.
- O estresse calórico materno ocasionou aumento na quantidade e no diâmetro dos folículos grandes, e a ocorrência de codominância folicular sete dias após aspiração folicular.
- O estresse calórico materno aumentou o percentual de oócitos degenerados, entretanto, não alterou o percentual de estruturas viáveis selecionadas para a maturação *in vitro*.
- O estresse calórico materno ocasionou diminuição nas taxas de produção embrionária *in vitro* em doadoras da raça Gir (*Bos indicus*), sobretudo na fase de 28 a 147 dias pós-estresse, demonstrando haver efeito deletério de longo prazo no desenvolvimento de embriões.

8 CONCLUSÃO

A hipótese inicial de que o estresse calórico induzido artificialmente afeta os parâmetros fisiológicos, a dinâmica ovariana, a competência oocitária e a produção *in vitro* de embriões em fêmeas bovinas da raça Gir (*Bos indicus*) foi comprovada.

REFERÊNCIAS

ADAMIAK S. J.; MACKIE, K.; WATT, R. G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Impact of Nutrition on Oocyte Quality: Cumulative Effects of Body Composition and Diet Leading to Hyperinsulinemia in Cattle. **Biol Reprod.**, v. 73, p. 918–926, 2005.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J Reprod Fertil.**, v. 94, p. 177-188, 1992.

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

AL-KATANANI, Y. M.; HANSEN, P. J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 62, n. 2, p. 174-180, 2002.

AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, v. 85, n. 2, p. 390-396, 2002.

AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 2611-2616, 1999.

ALLEN, T. E. Responses of Zebu, Jersey, and Zebu × Jersey crossbred heifers to rising temperature, with particular reference to sweating. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 13, p. 165–179, 1962.

ALLEN, T. E.; DONEGAN, S. M. Bos indicus and Bos Taurus Crossbred Dairy Cattle in Australia. III: A Climate Room Test of Heat Tolerance Used in the Selection of Young Sires for Progeny Testing. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 25, p. 1023-1035, 1974.

ALLEN, T. E.; PAN, Y. S.; HAYMAN, R. H. The effect of feeding on evaporative heat loss and body temperature in zebu and jersey heifers. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 14, p. 580-593, 1963.

AMBROSE, J. D.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; THATCHER, M. J.; KASSA, T.; BINELLI, M. HANSEN, P. J.; CHENOWETH, P. J.; THATCHER, W. W. Efficiency of timed embryo transfer with

fresh or frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 2369-2376, 1999.

AMIRIDIS, G. S.; ROBERTSON, L. REID, S.; BOYD, J. S.; O'SHAUGHNESSY, P. J.; JEFFCOATE, I. A. Plasma estradiol, FSH and LH concentration after dominant follicle aspiration in the cow. **Theriogenology**, v. 52, p. 995-1003, 1999.

ARÉCHIGA, C. F.; EALY, A. D.; HANSEN, P. J. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation mouse embryos. **Biol. Reprod.** v. 52, p. 1296-1301, 1995.

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

AZEVEDO M.; PIRES, M. F. A.; SATURNINO, H. M.; LANA, A. M. Q.; SAMPAIO, I. B. M.; MONTEIRO, J. B. N.; MORATO, L. E. Estimativa de Níveis Críticos Superiores do Índice de Temperatura e Umidade para Vacas Leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês-Zebu em Lactação. **R. Bras. Zootec.**, v. 34, n. 6, p. 2000-2008, 2005.

BACCARI JR., F. A temperatura corporal dos bovinos. **Gado Holandês**, v. 51, n. 138, p. 15-19, 1987b.

BACCARI JR., F. **Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes**. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 2001. 142 p.

BACCARI JR., F. Stress e estressores. Stress climático. **Gado Holandês**, v. 51, n. 138, p. 11-18, 1987a.

BADINGA L.; THATCHER, W. W.; DIAZ, T.; DROST, M.; WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 39, p. 797-810, 1993.

BAËTA, F. C. **Responses of lactating dairy cows to the combined effects of temperature, humidity and air velocity in the warm season**. 1985. 218 f. Tesis (Doctor of Philosophy) – University of Missouri, Columbia, 1985.

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

BASTIDAS, P.; RANDEL, R. D. Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. **Theriogenology**, v. 28, p. 531-539, 1987.

BAUMGARTER, A. P.; CHRISMAN, C. L. Embryonic mortality caused by maternal heat-stress during mouse oocyte maturation. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 14, p. 309-316, 1987.

BAUMGARTER, A. P.; CHRISMAN, C. L. Ovum morphology after hyperthermic stress during meiotic maturation and ovulation in the mouse. **J. Reprod. Fertil.**, v. 61, p. 91-96, 1981.

BEAM, S. W. Follicular development in postpartum dairy cattle: effects of energy balance and dietary lipid. 1995. 218 f. Tesis (Doctor of Philosophy) - Cornell University, Cornell, 1995.

BEATTY, D. T.; BARNES, A.; TAYLOR, E.; PETHICK, D.; MCCARTHY, M.; MALONEY, S. K. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. **J. Anim. Sci.**, v. 84, p. 972-985, 2006.

BEHRMAN, H. R.; ATEN, R. F. Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. **Endocrinology** v. 128, p. 2958-2966, 1991.

BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone treated heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 24, p. 193-204, 1991.

BLACKSHAW, J. K.; BLACKSHAW, A. W. Heat stress in cattle and the effect of shade on production and behavior: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 34, p. 285- 295, 1994.

BLOCK, J.; CHASE, C. C. JR.; HANSEN, P. J. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal versus paternal contribution. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 63, p. 32-37, 2002.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biol Reprod.**, v. 66, p. 38-43, 2002.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** v. 41, p. 54-62, 1995.

BOLS, P. E. J.; VANDENHEEDE, J. M. M.; VAN SOOM, A.; DE KRIUF, A. Transvaginal ovum pick-up(OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, p. 677-687, 1995.

BOLS, P. E.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; VANDENHEEDE, J. M. M.; KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus–oocyte complex morphology and developmental capacity of ovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 1001-1014, 1996.

BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE; M. C.; KOGUT, J.; KRUIP, T. A. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v. 48, p. 227- 289, 1997.

BRIDGES, P. J.; BRUSIE, M. A.; FORTUNE, J. E. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles **Dom Anim Endocr.**, v. 29, p. 508-522, 2005.

BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; NIEMANN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, v. 43 p. 667-675, 1995.

CARLSON, J. C.; SAWADA, M.; BOONE, D. L.; STAUFFER, J. M. Stimulation of progesterone secretion in dispersed cells of rat corpora lutea by antioxidants. **Steroids** v. 60, p. 272–276, 1995.

CARTWRIGHT, T. C. Responses of beef cattle to high ambient temperatures. **J. Anim. Sci.** v. 14, p. 350-362, 1955.

CARVALHO, F. A.; LAMMOGLIA, M. A.; SIMOES, M. J.; RANDEL, R. D. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 3570-3573, 1995.

CECCONI, S.; CICCARELLI, C.; BARBERI, M. Granulosa cell-oocyte interactions. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 115, n. 1, p. 19-22, 2004.

CHANDOLIA, R. K.; PELTIER, M. R.; TIAN, W.; HANSEN, P. J. Transcriptional Control of Development, Protein Synthesis, and Heat-Induced Heat Shock Protein 70 Synthesis in 2-Cell Bovine Embryos. **Biol Reprod.**, v. 61, p. 1644-1648, 1999.

CHRISTISON, G. I.; JOHNSON, H. D. Cortisol turnover in heat-stressed cows. **J. Anim. Sci.**, v. 35, p. 1005–1010, 1972.

-
- COLLIER, R. I.; BEEDE, D. K.; THATCHER, W. W.; ISRAEL, L. A.; WILCOX, C. J. Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. **J. Dairy Sci.** v. 65, p. 2213, 1982.
- COMIZZOLI, P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B. O.; HEYMAN, Y. O.; RENARD, J. P. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. **Biol Reprod.**, v. 62, p. 1677–1684, 2000.
- COSTA, E. P.; VALE FILHO, V. R.; NOGUEIRA, J. C.; SÁ, W. F.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, A. H. A. Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas: III Capacidade de desenvolvimento após fecundação *in vitro*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 49, n. 5, p. 575-581, 1997.
- CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 454 p.
- DAHL, G. E.; PETITCLERC, D. Management of photoperiod in the dairy herd for improved production and health. **J. Anim. Sci.**, v. 81, n. 3, p. 11-17, 2003.
- DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, p. 181-185, 2000.
- DE LA SOTA, R. L.; LUCY, M. C.; STAPLE, R. C.; THATCHER, W. W. Effects of recombinant bovine somatotropin (somatotrovi) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 1002-1013, 1993.
- DE SOUSA, P. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A.; BILODEAU-GOESEELS, S. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 51, p. 112-121, 1998.
- DOBSON, H.; GHUMAN, S.; PRABHAKAR, S.; SMITH, R. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. **Reproduction**, v. 125, p. 151–63, 2003.
- DOBSON, H.; TEBBLE, J. E.; SMITH, R. F.; WARD, W. R. Is stress really all that important? **Theriogenology**, v. 55, p. 65-73, 2001.
- DUPREEZ, J. H. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 4, p. 263-271, 2000.

DUTT, R. H. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. **J. Anim. Sci.**, v. 22, p. 713-719, 1963.

EALY, A. D.; DROST, F. M.; HANSEN, P. J. Developmental Changes in Embryonic Resistance to Adverse Effects of Maternal Heat Stress in Cows. **J Dairy Sci.**, v. 76, p. 2899-2905, 1993.

EALY, A. D.; HOWELL, J. L.; MONTERROSO, V. H.; ARECHIGA, C. F.; HANSEN, P. J. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. **J Anim Sci.**, v. 73, p. 1401-1407, 1995.

EBERHARDT, B. G. **Influência da raça do touro (*Bos indicus* vs *Bos taurus*) e da raça da vaca (*Bos indicus*, *Bos taurus* e mestiça) na resistência de embriões bovinos ao estresse calórico *in vitro*, durante a fase inicial de desenvolvimento**. 2005. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 46, n. 2, p. 138-145, 1997.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biol Reprod**, v. 55, p. 341-346, 1996.

EID, L. N.; LORTON, S. P.; PARISH, J. J. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. **Biol Reprod.**, v. 51, p. 1232-1237, 1994.

ESPEY, L. L. Current status of hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 233-238, 1994.

FAUSER, B. C. J. M.; VAN HEUSDEN, A. M. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. **Endocr Rev.**, v. 18, p. 71-106, 1997.

FERREIRA, A. M.; TORRES, C. A. A. Perda de peso e cessação da atividade ovariana luteínica cíclica em vacas mestiças leiteiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p. 411-418, 1993.

FERRELL, C. L.; JENKINS, T. G. Body composition and energy utilization by steers of diverse genotypes fed a high concentrate diet during the finishing period: II. Angus, Boran, Brahman, Hereford, and Tuli sires. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 647-657, 1998.

FINCH, V. A. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the tropics. **J. Anim. Sci.**, v. 62, p. 531–542, 1986.

FINCH, V. A. Comparison of non-evaporative heat transfer in different cattle breeds. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 38, p. 497, 1985.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C. Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, p. 1133-1143, 1999.

FUQUAY, J. W. Heat stress as it affects animal production. **J. Ani. Sci.** v. 52, p. 164, 1981.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effects of repeated ultrasoundguided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development **Theriogenology**, v. 50, p. 575–585, 1998.

GATZULI, E.; ATEN, R.F.; BEHRMAN, H. R. Inhibition of gonadotropic action and progesterone synthesis by xanthine oxidase in rat luteal cells. **Endocrinology** v. 128 p. 2253-2258, 1991.

GAUGHAN, J. B.; MADER, T. L.; HOLT, S. M.; JOSEY, M. J.; ROWAN, K. J. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **J. Anim. Sci.**, v. 77, p. 2398-2405, 1999.

GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L.; FABER, E. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v. 42, p. 405-419, 1994.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biol Reprod.**, v. 57, p. 1066-1073, 1997.

GILAD, E.; MEIDAN, R.; BERMAN, A.; GRABER, Y.; WOLFENSON, D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentrations of oes triadiol in plasma of cyclic cows. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p. 315-321, 1993.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle.

Theriogenology, v. 50, p. 507-519, 1998.

GOOD, T. E. M.; WEBER, P. S. D.; IRELAND, J. L. H.; PULASKI, J.; PADMANABHAN, V.; SCHNEYER, A. L.; LAMBERT-MESSERLIAN, G.; GHOSH, B. R.; MILLER, W. L.; GROOME, N.; IRELAND, J. J. Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. **Biol Reprod.**, v. 53, p. 1478-1488, 1995.

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

GWAZDAUSKAS, F. C.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination which may affect conception. **J Dairy Sci.**, v. 56, p. 873-877, 1973.

HAHN, G. L. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. **J Anim Sci.**, v. 77, n. 2, p. 10-20, 1999.

HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; CHASE JR., C. C.; BOWERS, E. J.; RANDEL, R. D.; MURPHY, C. N.; VOGT, D. W.; TEWOLDE, A. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 295-303, 1996.

HANSEN, L. B. Consequence of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. **J Dairy Sci.**, v. 83, p. 1145-1150, 2000.

HANSEN, P. J. Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the mammalian preimplantation embryo from heat shock. **Ann Rev Biochem Sci.**, v. 1, p. 5-29, 1999.

HANSEN, P. J. Effects of environment on bovine reproduction. In: YOUNGQUIST, R. S. **Current therapy in large animal theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, 1997. p. 4003-415.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim Reprod Sci** v. 82, p. 349-360, 2004.

HANSEN, P. J.; ARECHIGA, C. F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **J Anim Sci.**, v. 77, p. 36-50, 1999. Supplement, 2.

-
- HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; CHASE JR., C. C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, p. 91-103, 2001.
- HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; STEENWEG, W. N. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes **Theriogenology**, v. 53, p. 11-20, 2000;.
- HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; CHASE JR, C. C.; HANSEN, P. J. Differences in Heat Tolerance Between Preimplantation Embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. **J. Dairy Sci.**, v. 87, p. 53-58, 2004.
- HOWELL, J. L.; FUQUAY, J. W.; SMITH, A. E. Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. **J. Dairy Sci.**, v. 77, p. 735-739, 1994.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; KALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.
- INBAR, G.; WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 465, 2001. Supplement, 1.
- JOLLY, P. D.; MCDUGALL, S.; FITZPATRICK, L. A.; MACMILLAN, K. L.; ENTWHITSLE, K. Physiological effects of under nutrition on postpartum anoestrous in cows. **J Reprod Fertil Suppl.**, v. 49, p. 477-492, 1995.
- JONSSON, N. N.; MCGOWAN, M. R.; MCGUIGAN, K.; DAVISON, T. M.; HUSSAIN, A. M.; KAFI, M.; MATSCHOSS, A. Relationships among calving season, heat load, energy balance and postpartum ovulation of dairy cows in a subtropical environment. **Anim Reprod Sci.**, v. 47, p. 315-326, 1997.
- JU, J. C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. **Anim. Reprod.**, v. 2, n. 2, p. 79-90, 2005.
- JU, J. C.; PARKS, J. E.; YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after shortterm heat shock. **Mol Reprod Dev.**, v. 53, p. 336-340, 1999.
- KAMWANJA, L. A.; CHASE JR.; C. C.; GUTIERREZ, J. A.; GUERRIERO, J. R. V.; OLSON, T. A.; HAMMOND, A. C.; HANSEN, P. J. Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 438-444, 1994.

KATO, H.; SUGINO, N.; TAKIGUCHI, S.; KASHIDA, S.; NAKAMURA, Y. Roles of reactive oxygen species in the regulation of luteal function. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 81–83, 1997.

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

KING, W. A.; NAIR, A.; BETTERIDGE, K. J. The nucleolus organizer regions of early bovine embryos. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 249, 1985. Supplement, 2.

KRININGER III, C. E.; BLOCK, A. J.; AL-KATANANI, Y. M.; RIVERA, R. M.; CHASE JR., C. C.; HANSEN, P. J. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, p. 13-24, 2003.

KRUIP, T. A.; BONI, R.; WURTH, Y. A.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle **Theriogenology**, v. 42, p. 675–684, 1994.

LAMMOGLIA, M. A.; BELLOWS, R. A.; SHORT, R. E.; BELLOWS, S. E.; BIGHORN, E. G.; STEVENSON, J. S.; RANDEL, R. D. Body Temperature and Endocrine Interactions Before and After Calving in Beef Cows. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p. 2526-2534, 1997.

LAY JR., D. C.; WILSON, M. E. **Physiological indicators of stress in domestic livestock**. 2001. Disponível em: <<http://www.fass.org/fass01/pdfs/Lay.pdf>> Acessado em: 07 jan. 2007.

LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE, D. L. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 1745-1753, 2000.

LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D. Z.; SATTER, L. D.; FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. **J Dairy Sci.**, v. 88, p. 2783–2793, 2005.

LOPEZ, H.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. Reproductive Hormones and Follicular Growth during Development of One or Multiple Dominant Follicles in Cattle. **Biol. Reprod.**, v. 72, p. 788-795, 2005.

-
- LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Anim Reprod Sci.**, v. 81, p. 209–223, 2004.
- LÓPEZ-GATIUS, F.; LÓPEZ-BÉJARB, M.; FENECHB, M.; HUNTERA, R. H. F. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. **Theriogenology**, v. 63, p. 1298–1307, 2005.
- LUBLIN, A.; WOLFENSON, D. Effect on blood flow to mammary and reproductive systems in heat-stressed rabbits. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 277-285, 1996.
- LUCY, M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle **J Dairy Sci.**, v. 83, p. 1635-1647, 2000.
- LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J Anim Sci.**, v. 70, p. 3615–3626, 1992.
- LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fert.**, v. 81, p. 301-307, 1987.
- MADAN, M. L.; JOHNSON, H. D. Environmental heat effects on bovine luteinizing hormone. **J Dairy Sci.**, v. 56, p. 1420–1423, 1973.
- MALAYER, J. R.; HANSEN, P. J. Differences between Brahman and Holstein cows in heat-shock induced alterations of protein secretion by oviducts and uterine endometrium. **J. Anim. Sci.**, v. 68, p. 266–280, 1990.
- MANCHATKOVÁ, M.; JOKESOVA, E.; HORKY, F.; KREPELOVA, A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. **Theriogenology**, v. 54, p. 543-550, 2000.
- MARTELLO, L. S. **Diferentes recursos de climatização e sua influência na produção de leite, na termorregulação dos animais e no investimento das instalações.** 2002. 67 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.
- MCDOWELL, R. E.; LEE, D. H. K.; FOHRMAN, M. H. The relationship of surface area to heat tolerance in Jerseys and Sindhi-Jersey (F1) crossbred cows. **J. Anim. Sci.**, v. 12, p. 747–756, 1953.

MCGUIRE, M. A.; BEEDE, D. K.; DELORENZO, M. A.; WILCOX, C.J.; HUNTINGTON, G. B.; REYNOLDS, C. K.; COLLIER, R. J. Effects of thermal stress and level of feed intake on portal plasma flow and net fluxes of metabolites in lactating Holstein cows. **J Anim Sci.**, v. 67, n. 4, p. 1050-60, 1989.

MCNATTY, K. P.; HEATH, D. A.; HENDERSON, K. M.; LUN, S.; HURST, P. R.; ELLIS, L. M.; MONTGOMERY, G. W.; MORRISON, L.; THURLY, D. C. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. **J Reprod Fert.**, v. 72, p. 39–53, 1984.

MCNATTY, K. P.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; FIDLER, A. E.; QUIRKE, L.; O'CONNELL, A.; SMITH, .; GROOME, N; TISDALL, D. J. Control of early ovarian follicular development. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v. 54, p. 3-16, 1999.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, p. 87–96, 2000.

MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry **Theriogenology**, v. 59, p 651-674, 2003.

MIHM, M.; GOOD, T. E. M.; IRELAND, J. L. H.; IRELAND, J. J.; KNIGHT, P. G.; ROCHE, J. F. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in the selection of the dominant follicle in heifers. **Biol Reprod.**, v. 57, p. 1328-1337, 1997.

MIYANO, T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. **Theriogenology**, v. 59, p. 61-72, 2003.

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

MOTA, L. S. Adaptação e interação genótipo-ambiente em vacas leiteiras. 1997. 69 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

NÃÃS, I. A.; SOUZA, S. R. L. Desafios para a produção de leite nos trópicos – conforto térmico. In: ZOOTEC, 2003, Uberaba, **Anais...** Uberaba: Associação Brasileira de Zootecnicos, 2003. v.1, p. 64-74.

O'CALLAGAN, D.; BOLAND, M. P. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. **Anim Sci.**, v. 68, p. 299–314, 1999.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE JR., C. C.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER III, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSON, T. A.; HANSEN, P. J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: Differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 125, n. 1-2, p. 285-294, 2003.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat Shock-Induced Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos Is a Developmentally Regulated Phenomenon. **Biol Reprod.**, v. 66, p. 1169-1177, 2002.

PAYTON, R.R.; ROMAR, R.; COY, P.; SAXTON, A. M.; LAWRENCE, J. L.; EDWARDS, J. L. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. **Biology of Reproduction** v. 71 p. 1303-1308, 2004.

PETYIM, S.; BÁ, R. G. E.; FORSBERG, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B. Effects of Repeated Follicular Punctures on Ovarian Morphology and Endocrine Parameters in Dairy Heifers. **J. Vet. Med.**, v. 48, p. 449-463, 2001.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 145, p. 27-37, 1998.

PIETERSE, M. C.; VOS, P. L. A. M.; KRUIP, T. A. M.; WILLEMSE, A. H.; TAVERNE, M. A. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 35, p. 401-413, 1991.

PIRES, M. F. A. **Comportamento, parâmetros fisiológicos e reprodutivos de fêmeas da raça Holandesa confinadas em free stall durante o verão e o inverno.** 1997. 151 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

PIRES, M. F. A.; CAMPOS, A. T.; AZEVEDO, M.; NOVAES, L. P.; SATURNINO, H. M.; MONTEIRO, J. B. N. Respostas fisiológicas de vacas mestiças Holandês x Zebu às condições climáticas de verão e de inverno. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002.

PIRES, M. F. A.; SATURNINO, H. M.; VERNEQUE, R. S. Efeito das estações (inverno e verão) na temperatura retal e frequência respiratória de vacas Holandesas confinadas em free stall. **Arq Bras Med Vet Zootec.**, v. 50, n. 6, p. 747-752, 1998.

RABIEE, A. R.; LEAN, I. J.; GOODEN, J. M.; MILLER, B. J.; SCARAMUZZI, R. J. An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous difference methods in dairy cattle. **Anim Reprod Sci.**, v. 48, p. 9-25, 1997.

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

REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v. 106, p. 39-47, 1996.

RIVERA, R. M.; AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Short communication: Seasonal effects on development of bovine embryos produced by in vitro fertilization in a hot environment. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 305-307, 2000.

RIVERA, R. M.; KELLEY, K. L.; ERDOS, G. W.; HANSEN, P. J. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically-relevant heat shock. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 2068-2077, 2003a.

RIVERA, R. M.; KELLEY, K. L.; ERDOS, G. W.; HANSEN, P. J. Effects of a physiologically-relevant heat-shock on the cytoskeleton of 2-cell bovine embryos. In: RESEARCH SYMPOSIUM FOR THE ANIMAL MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1., 2003, Marineland. **Proceedings...** Marineland: Whitney Laboratory, 2003b, 6 p.

ROBERSON, M. S.; WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biol. Reprod.**, v. 41, p. 997-1003, 1989.

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

ROENFELDT, S. You can't afford to ignore heat stress. **Dairy Manage.** v. 35, n. 5, p. 6-12, 1998.

RON, M.; BAR-ANAN, R.; WIGGANS, G. R. Factors affecting conception rate of Israeli Holstein cows. **J Dairy Sci.**, v. 67, p. 854-860, 1984.

RONCHI, B.; BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; VERINI SUPPLIZI, A.; NARDONE, A. Distinct and common effects of heat stress and restricted feeding on metabolic status in Holstein heifers. **Zoot. Nutr. Anim.**, v. 25, p. 71-80, 1999.

RONCHI, B.; STRADAIOLI, G.; VERINI SUPPLIZI, A.; BERNABUCI, U.; LACETERA, N.; ACCORSI, P. A. Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17beta, LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. **Livestock Prod Sci.**, v. 68, p. 231-41, 2001.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v. 122, p. 737-744, 2001a.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R.; BOR, A.; WOLFENSON, D. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocytes aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. **J. Dairy Sci.**, v. 85, n. 6, p. 1398-1405, 2002.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction** v. 129, p. 235–244, 2005.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction** v. 71, p. 1898–1906, 2004a.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. **Biology of Reproduction** v. 71, p. 2072–2078, 2004b.

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

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

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

RUTLEDGE, J. J.; MONSON, R.; NORTHEY, D. L.; LEIBFIED-RUTLEDGE, M. L. Seasonality of cattle embryo production in a temperate region. **Theriogenology**, v. 51, p. 330, 1999.

RYAN, D. P.; BOLAND, M. P. Frequency of twin births among Holstein-Friesian cows in a warm dry climate. **Theriogenology**, v. 36, p. 1-10, 1991.

RYAN, D. P.; PRICHARD, J. F.; KOPEL, E.; GODKE, R. A. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. **Theriogenology**, v. 39, p. 719-737, 1993.

SANCHEZ, W. K.; MCGUIRE, M. A.; BEEDE, D. K. Macromineral Nutrition by Heat Stress Interactions in Dairy Cattle: Review and Original Research 1. **J Dairy Sci.**, v. 77, p. 2051-2079, 1994.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **J Dairy Sci.**, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **J Dairy Sci.**, v. 87, p. 905-920, 2004.

SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian Structures and Circulating Steroids in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter **J. Dairy Sci.**, v. 85, p. 2813-2822, 2002a.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p. 2803-2812, 2002b.

SAS - STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics**. Versão 8.0. Cary: SAS, 2000.

SCHLEGER, A. V.; BEAN, K. G. Factors determining sweating competence of cattle skin. **Aust J Biol Sci.**, v. 24, p. 1291-1300, 1971.

SCHLEGER, A. V.; TURNER, H. G. Sweating rates of cattle in the field and their reaction to diurnal and seasonal changes. **Aust J Agric Res.**, v. 16, p. 92-106, 1965.

SCHULTZ, R. M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Hum. Reprod. Update.**, v. 8, p. 323-331, 2002.

SHEARER, J. K.; BEEDE, D. K. Heat stress. Part 1: Thermoregulation and physiological responses of dairy cattle in hot weather. **Agricultural Practice**, v.11, n. 4, p. 5-17, 1990.

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

SILVA, R. G.; GONDIM, A. G. Comparação entre as raças Sindi e Jersey e seus mestiços, relativamente á tolerância ao calor na região Amazônica. I. Raça Sindi e os mestiços $\frac{3}{4}$ Sindi $\frac{1}{4}$ Jersey e $\frac{5}{8}$ Jersey $\frac{3}{8}$ Sindi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Série Veterinária, v. 6, p. 37-44, 1971.

SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; MCCRACKEN, J. A.; THATCHER, W. W.; WILSON, L. J. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂ α during luteolysis in ruminants. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 655-663, 1991.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna dos grandes animais**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1993. v. 1, cap. 1, p. 3-15.

SMITH, R. F.; DOBSON, H. Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. **Dom Anim Endocr.**, v. 23 p. 75-85, 2002.

SRIKANDAKUMAR, A.; JOHNSON, E. H. Effect of heat-stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian Milking Zebu cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 36, p. 685-692, 2004.

STAHRRINGER, R. D.; NEUENDORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Seasonal variations in characteristics of oestrus cycles in pubertal Brahman heifers. **Theriogenology**, v. 34, p. 407-417, 1990.

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues performance of lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 856-871, 1998.

STÖBER, M.; GRÜNDER, H. D. **Sistema circulatório**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1993. cap. 5, p. 98-131.

ST-PIERRE, N. R.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic Losses from Heat Stress by US Livestock Industries. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 52-77, 2003.

THRIFT, T. A.; BERNAL, A.; LEWIS, A. W.; NEUENDORFF, D. A.; WILLARD, C. C.; RANDEL, R. D. Effects of induced hypothyroidism on weight gains, lactation, and reproductive performance of primiparous Brahman cows. **J. Anim. Sci.**, v. 77, p. 1844-1850, 1999.

TITO, E. A. L. Clima: influência na produção de leite. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AMBIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE LEITE, 1., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 10-23.

TROUT, J. P.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Characteristics of the Estrous Cycle and Antioxidant Status of Lactating Holstein Cows Exposed to Heat Stress 1. **J Dairy Sci** v. 81, p. 1244–1250, 1998.

TURNER, H. G. Coat characters of cattle in relation adaptation. Proceedings **Australian Society Animal Production**, v. 5, p. 181-187, 1964.

TURNER, H. G.; TAYLOR, St C. S. Dynamic factors in models of energy utilization with particular reference to maintenance requirements of cattle. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 42, p. 135-90, 1983.

VEGA, M.; CARRASCA, I.; CASTILLO, T.; TRONCOSO, J. L.; VIDELA, I. A.; DEVOTO, L. Functional luteolysis in response to hydrogen peroxide in human luteal cells. **Journal of Endocrinology**, v. 147, p. 177-182, 1995.

VIANA, J. H. M. **Punção e aspiração folicular orientada por ultra-som em vacas da raça Gir**. 2002, 124 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; MARQUES JR., A. P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Anim Reprod Sci.**, v. 84, p. 1-12, 2004.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Mol Reprod Dev.**, v. 60, p. 47–55, 2001.

-
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 63-74, 2004.
- WEBB, R.; GOSDEN, R. G.; TELFER, E. E.; MOOR, R. M. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Anim Sci.**, v. 68, p. 257-284, 1999.
- WEST, J. W. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 2131-2144, 2003.
- WILSON, S. J.; KIRBY, C. J.; KOENIGSFELD, A. T.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. **J. Dairy Sci.**, v. 81, n. 8, p. 2132-2138, 1998b.
- WILSON, S. J.; MARION, R. S.; SPAIN, J. N.; SPIERS, D. E.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v. 81, n. 8, p. 2124-2131, 1998a.
- WILTBANK, M. C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.
- WILTBANK, M. C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GUMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, p. 17-29, 2006.
- WISE, M. E.; ARMSTRONG, D. V.; HUBER, J. T.; HUNTER, .; WIERSMA, F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. **J. Dairy Sci.**, v. 71, n. 9, p. 2480-2485, 1988.
- WOLFENSON, D.; LEW, B. J.; THATCHER, W. W.; GRABER, Y.; MEIDAN, R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 47, p. 9-19, 1997.
- WOLFENSON, D.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L.; SAVIO, J. D.; MEIDAN, R. LEW, B. J.; BRAW-TAL, R.; BERMAN, A. effect of heat stress on follicular development during the oestrous cycle in lactating dairy cattle. **Biol Reprod.**, v. 52, p. 1106-1113, 1995.
- WOLFENSON, D. A.; SONEGO, H.; BLOCH, A.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; KAIMB, M.; FOLMAN, Y.; MEIDAN, R. Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells. **Dom Anim Endocr.**, v. 22, p. 81-90, 2002.

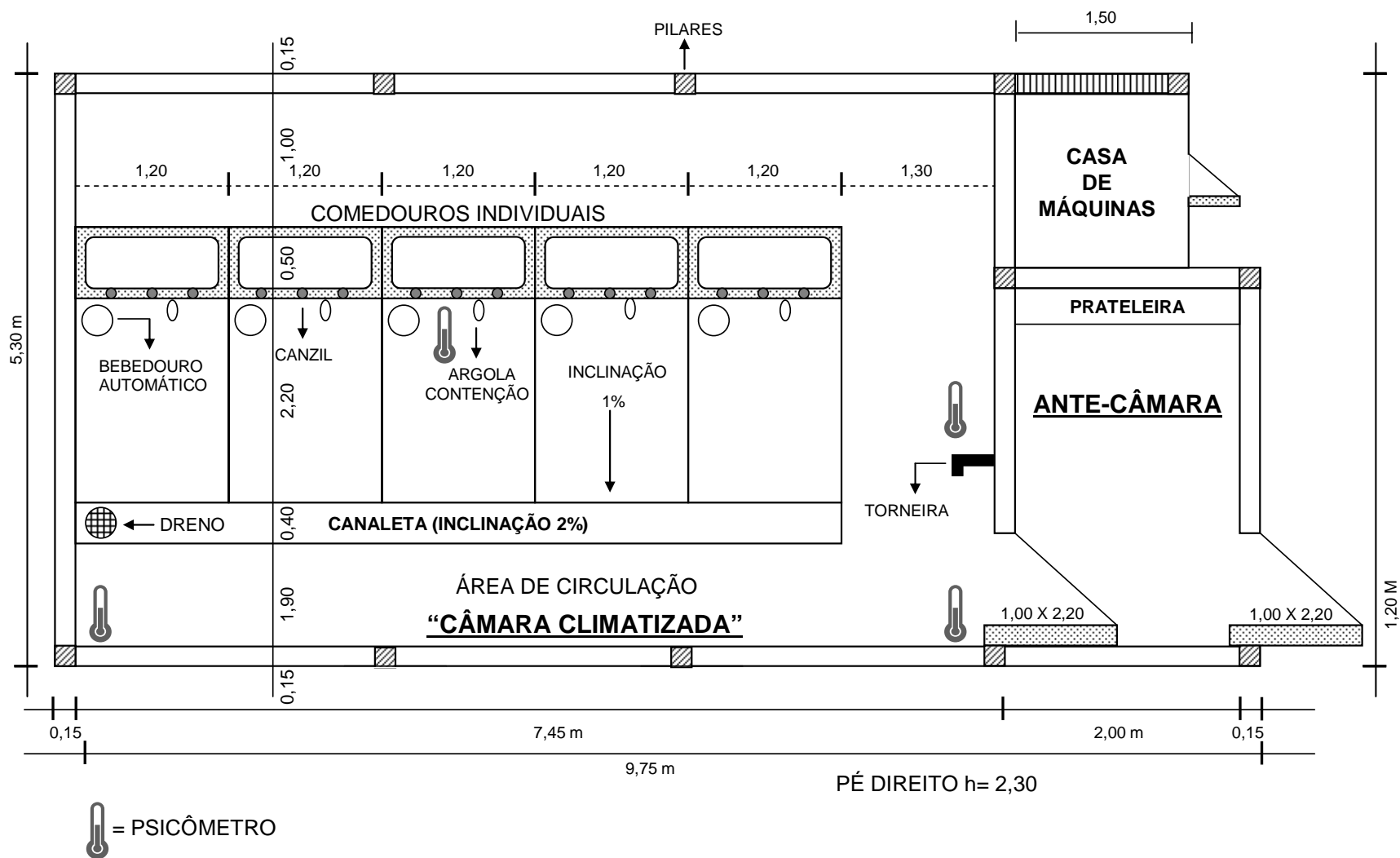
WRENN, T. R.; BITMAM, N. J.; SIYKES, J. F. Diurnal patterns of bovine body temperature. **J Dairy Sci.**, v. 44, p. 2077-2080, 1961.

YOULSEF, M. K. **Stress physiology in livestock**. Boca Raton: CRC Press, 1985. 217p.

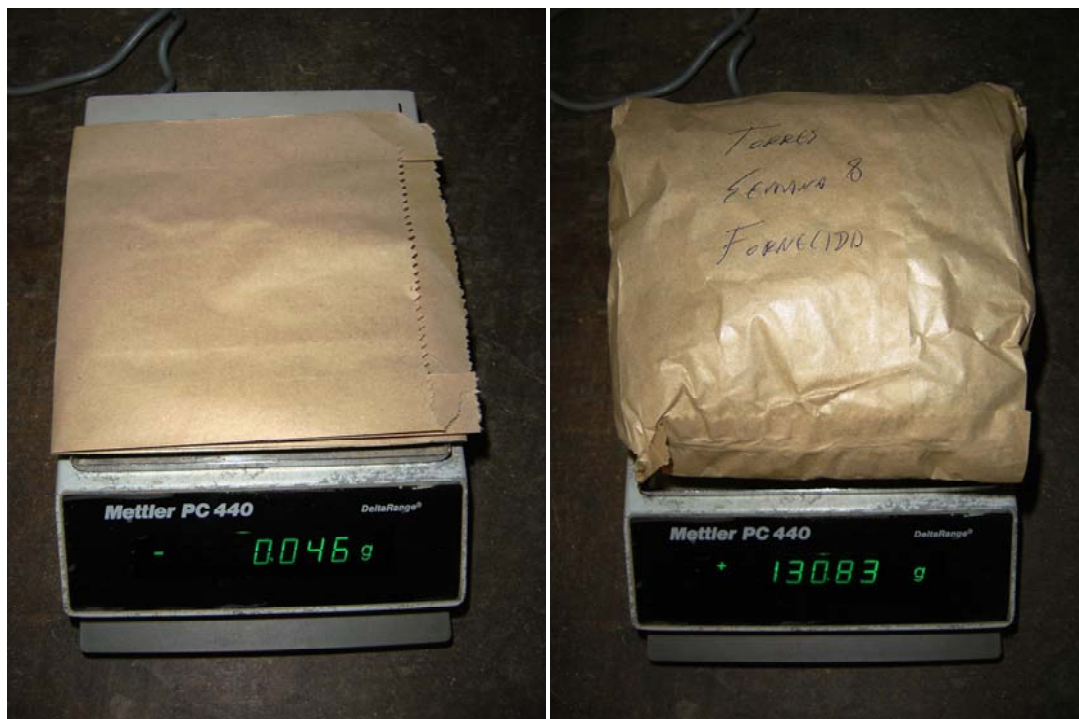
YOUNAS, M.; FUQUAY, J. W.; SMITH, A. E.; MOORE, A. B. Estrous and endocrine responses of lactating Holsteins to forced ventilation during summer. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 430–436, 1993.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, n. 3, p. 447-454, 2001.

APÊNDICE A - Planta baixa da câmara climática utilizada no experimento



APÊNDICE B: Pesagem das amostras de dieta total em balança analítica



APÊNDICE C: Disposição das amostras de dieta total em estufa de secagem.



APÊNDICE D: Cálculo do percentual de matéria seca de cada amostra e do consumo individual de matéria seca por animal.

$$\text{PMS} = \frac{\text{peso amostra seca} \times 100}{\text{peso amostra úmida}}$$

$$\text{SF} = \text{UF} \times (\text{PMS} \times 10^{-2})$$

$$\text{SS} = \text{US} \times (\text{PMS} \times 10^{-2})$$

$$\text{CMS} = \text{SF} - \text{SS}$$

Legenda:

PMS = percentual de matéria seca na amostra

SF = peso em matéria seca fornecida

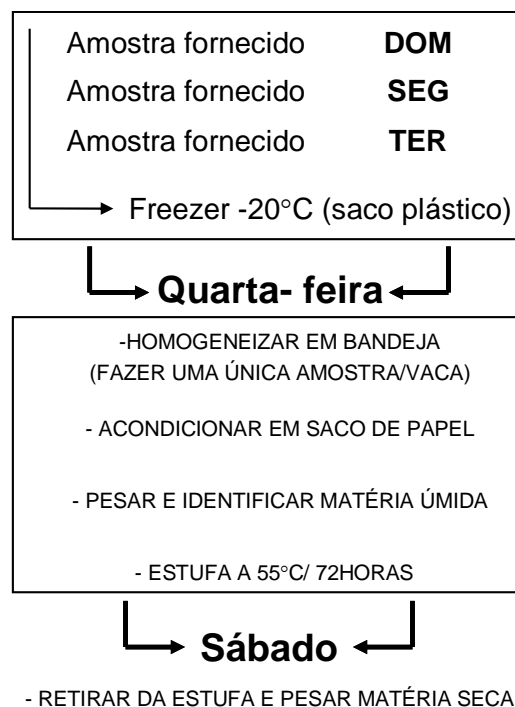
UF = peso úmido fornecido

SS = peso em matéria seca da sobra

US = peso úmido da sobra

CMS = consumo de matéria seca

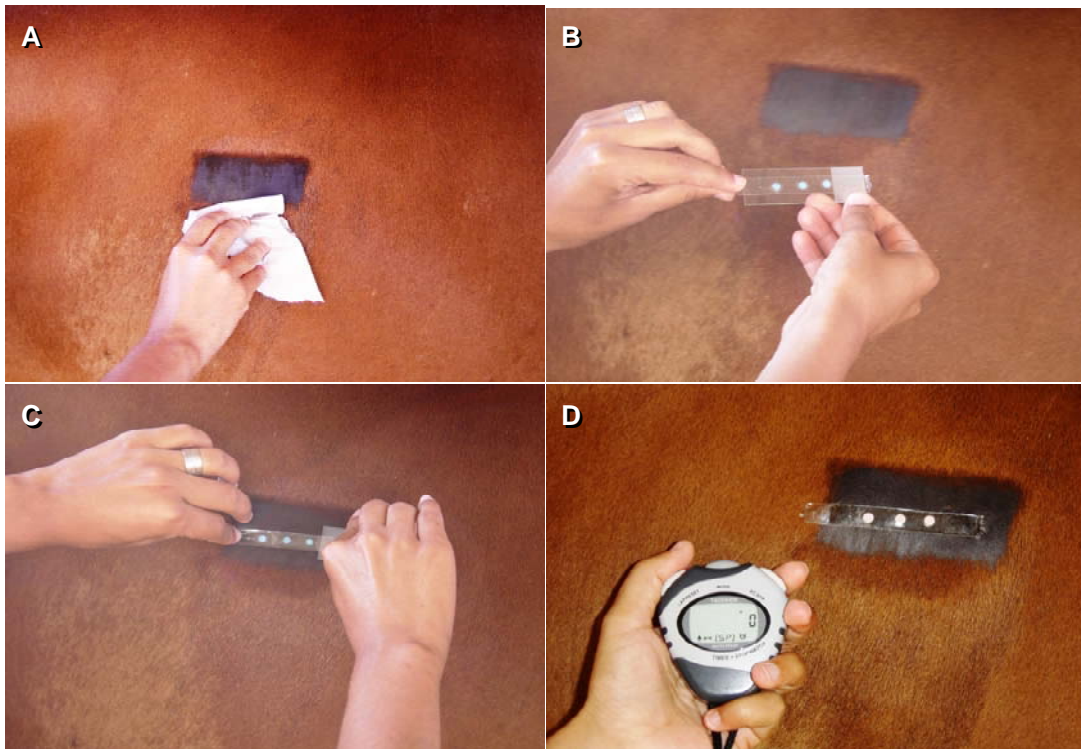
APÊNDICE E: Sumário do procedimento semanal de coleta de amostras individuais para obtenção do consumo de matéria seca.



APÊNDICE F: Tomada da temperatura da superfície cutânea (°C) por meio de um termômetro infravermelho digital.



APÊNDICE G: Procedimento para avaliação da taxa de sudação. A) *Limpeza da superfície da pele;* B) *Discos contendo solução de CoCl_2 a 10% dessecados e fixados com fita adesiva em lâmina de microscopia;* C) *Fixação da fita adesiva contendo os discos sobre a pele limpa e seca;* D) *Cronometragem do tempo gasto para cada disco mudar sua cor, por ação da infiltração de suor*



Apêndice H - Correlações entre as variáveis climáticas e fisiológicas em fêmeas da raça Gir (*Bos indicus*)

	TBS	TBU	UR	ITU	FR	TR	TC	CMS
TBU	0,901	---						
<i>P</i> =	<,000							
UR	-0,422	-0,029	---					
<i>P</i> =	<,000	0,571						
ITU	0,979	0,970	-0,248	---				
<i>P</i> =	<,000	<,000	<,000					
FR	0,214	0,176	-0,112	0,202	---			
<i>P</i> =	<,000	0,000	0,035	0,000				
TR	0,048	-0,009	-0,091	0,021	0,481	---		
<i>P</i> =	0,367	0,854	0,088	0,684	<,000			
TC	0,172	0,086	-0,239	0,136	0,645	0,531	---	
<i>P</i> =	0,001	0,104	<,000	0,010	<,000	<,000		
CMS	0,131	0,073	-0,163	0,105	0,059	-0,218	0,225	---
<i>P</i> =	0,102	0,365	0,043	0,190	0,362	0,000	0,000	
SUD	0,294	0,297	-0,085	0,303	0,295	-0,216	-0,031	0,215
<i>P</i> =	0,000	0,000	0,305	0,000	0,000	0,006	0,694	0,054

Legenda: TBS= temperatura de bulbo seco; TBU= temperatura de bulbo úmido; UR= umidade relativa do ar; ITU= índice de temperatura e umidade; FR= frequência respiratória; TR= temperatura retal; TC= temperatura da superfície cutânea; CMS= consumo de matéria seca; TXSUD= taxa de sudação.

Apêndice I - Correlações entre as variáveis inerentes à OPU-PIV em fêmeas da raça Gir (*Bos indicus*)

	FP	FM	FG	ØFD	ØFS	FV	CCO's	%REC	%G1	%VIA	%CLIV	%BL	TBL	P4
FM	-0.147	---												
<i>P=</i>	<i>0.028</i>													
FG	-0.166	-0.140	---											
<i>P=</i>	<i>0.013</i>	<i>0.037</i>												
ØFD	-0.122	-0.042	0.612	---										
<i>P=</i>	<i>0.069</i>	<i>0.529</i>	<i><.000</i>											
ØFS	-0.229	0.156	0.692	0.585	---									
<i>P=</i>	<i>0.000</i>	<i>0.019</i>	<i><.000</i>	<i><.000</i>										
FV	0.993	-0.082	-0.080	-0.068	-0.151	---								
<i>P=</i>	<i><.000</i>	<i>0.223</i>	<i>0.231</i>	<i>0.315</i>	<i>0.024</i>									
CCO's	0.601	-0.109	-0.166	-0.150	-0.177	0.589	---							
<i>P=</i>	<i><.000</i>	<i>0.107</i>	<i>0.013</i>	<i>0.026</i>	<i>0.008</i>	<i><.000</i>								
%REC	0.020	-0.122	-0.117	-0.122	-0.085	-0.009	0.750	---						
<i>P=</i>	<i>0.767</i>	<i>0.070</i>	<i>0.083</i>	<i>0.071</i>	<i>0.208</i>	<i>0.891</i>	<i><.000</i>							
%G1	0.176	0.014	-0.055	-0.090	-0.071	0.179	0.188	0.090	---					
<i>P=</i>	<i>0.009</i>	<i>0.831</i>	<i>0.420</i>	<i>0.185</i>	<i>0.297</i>	<i>0.008</i>	<i>0.005</i>	<i>0.185</i>						
%VIA	0.209	0.105	-0.076	-0.133	-0.084	0.224	0.298	0.149	0.381	---				
<i>P=</i>	<i>0.002</i>	<i>0.121</i>	<i>0.261</i>	<i>0.051</i>	<i>0.217</i>	<i>0.000</i>	<i><.000</i>	<i>0.028</i>	<i><.000</i>					
%CLIV	0.148	-0.085	-0.068	0.003	-0.090	0.141	0.030	-0.078	0.186	-0.026	---			
<i>P=</i>	<i>0.202</i>	<i>0.464</i>	<i>0.558</i>	<i>0.978</i>	<i>0.437</i>	<i>0.225</i>	<i>0.790</i>	<i>0.499</i>	<i>0.109</i>	<i>0.823</i>				
%BL	0.315	-0.081	-0.204	-0.154	-0.170	0.290	0.244	0.096	0.372	0.166	0.411	---		
<i>P=</i>	<i>0.020</i>	<i>0.554</i>	<i>0.133</i>	<i>0.260</i>	<i>0.212</i>	<i>0.033</i>	<i>0.071</i>	<i>0.482</i>	<i>0.005</i>	<i>0.229</i>	<i>0.001</i>			
TBL	0.252	0.018	-0.145	-0.067	-0.075	0.247	0.395	0.278	0.297	0.265	0.470	0.788	---	
<i>P=</i>	<i>0.000</i>	<i>0.787</i>	<i>0.029</i>	<i>0.317</i>	<i>0.260</i>	<i>0.000</i>	<i><.000</i>	<i><.000</i>	<i><.000</i>	<i><.000</i>	<i><.000</i>	<i><.000</i>		
P4	-0.036	0.105	-0.130	-0.191	-0.095	-0.041	0.020	0.079	-0.113	-0.016	-0.116	-0.229	0.017	---
<i>P=</i>	<i>0.585</i>	<i>0.116</i>	<i>0.051</i>	<i>0.004</i>	<i>0.154</i>	<i>0.535</i>	<i>0.762</i>	<i>0.243</i>	<i>0.094</i>	<i>0.805</i>	<i>0.314</i>	<i>0.091</i>	<i>0.790</i>	
Cortisol	0.281	0.041	-0.198	-0.185	-0.182	0.271	0.174	0.037	0.254	0.289	-0.112	0.267	0.155	-0.017
<i>P=</i>	<i><.000</i>	<i>0.550</i>	<i>0.003</i>	<i>0.006</i>	<i>0.007</i>	<i><.000</i>	<i>0.011</i>	<i>0.589</i>	<i>0.000</i>	<i><.000</i>	<i>0.340</i>	<i>0.050</i>	<i>0.023</i>	<i>0.799</i>

Legenda: FP= Número de folículos pequenos (<6mm); FM= número de folículos médios (6-9mm); FG= número de folículos grandes (>9mm); ØFD= diâmetro do folículo dominante; ØFS= diâmetro do maior folículo subordinado; FV= número de folículos visualizados; CCO's= número de complexos *cúmulus*-oócitos recuperados; %REC= taxa de recuperação de CCO's; %G1= percentual de CCO's grau 1 recuperados; %VIA= percentual de CCO's viáveis recuperados; %CLIV= taxa de clivagem; %BL= taxa de produção de blastocistos; TBL= número de blastocistos produzidos; P4 = concentração de progesterona.

ANEXO A - Índice de temperatura e umidade (ITU) para bovinos (ARMSTRONG, 1994).

°C	UR %											
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
22,2											72	
22,8										72	73	
23,3									72	73	74	
23,9								72	73	74	75	
24,4							72	73	74	75	76	
25,0						72	73	74	75	76	77	
25,6					72	73	74	75	76	77	78	
26,1					73	74	75	76	77	78	79	
26,7				72	73	74	75	76	77	78	80	
27,2				72	73	75	76	77	78	79	81	
27,8				73	74	75	77	78	78	80	82	
28,3			72	73	75	76	78	79	80	82	83	
28,9			73	74	75	77	78	80	81	83	84	
29,4		72	73	75	76	78	79	81	82	84	85	
30,0		72	74	75	77	78	80	81	83	84	86	
30,6	72	73	74	76	77	79	81	82	84	85	87	
31,1	72	73	75	76	78	80	81	83	85	86	88	
31,7	72	74	75	77	79	80	82	84	86	87	89	
32,2	73	74	76	78	79	81	83	85	86	88	90	
32,8	73	75	76	78	80	82	84	86	87	89	91	
33,3	74	75	77	79	81	83	85	86	88	90	92	
33,9	74	76	78	80	81	83	85	87	89	91	93	
34,4	75	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	
35,0	75	77	79	81	83	85	87	89	91	93	95	
35,6	76	77	79	81	83	85	88	90	92	94	96	
36,1	76	78	80	82	84	86	88	91	93	95	97	
36,7	76	78	80	83	85	87	89	91	94	96	98	
37,2	77	79	80	83	85	88	92	92	94	97		
37,8	77	79	82	84	86	88	91	93	95	98		
38,3	78	80	82	84	87	89	92	94	96			
38,9	78	80	83	85	87	90	92	95	97			
39,4	79	81	83	86	88	91	93	96				
40,0	79	81	84	86	89	91	94	96				
40,6	80	82	84	87	89	92	94	97				
41,1	80	82	85	88	90	93	95					
41,7	81	83	85	88	91	94	96					
42,2	81	83	86	89	92	94	97					
42,8	81	84	87	89	92	95						
43,3	82	84	87	90	93	96						
43,9	82	85	88	91	94	96						
44,4	83	85	88	91	94	97						
45,0	83	86	89	92	95							
45,6	84	86	89	92	96							
46,1	84	87	90	93	96							
46,7	85	87	90	94	97							
47,2	85	88	91	94	98							
47,8	85	88	92	95								
48,3	86	89	92	96								

Legenda:

Ausência de estresse – até 72
Estresse moderado - 72 a 79
Estresse Térmico – 79 a 89
Severo estresse térmico – 90 a 98
Ocorrência de morte – acima de 98

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)