

Avaliação da perfusão vascular e do nível de colesterol e estrógeno em folículos préovulatórios de éguas em condições de desconforto térmico*

Jhonatha Paulo Oliveira¹⁺, Daniela de Mello², Otávia Reis e Silva³, Cássia Regina Oliveira Agostini⁴, Júlio Cesar Ferraz Jacob⁵ e Marco Roberto Bourg de Mello⁶

ABSTRACT. Oliveira J.P., Mello D., Silva O.R., Agostini C.R.O., Jacob J.C.F. & Mello M.R.B. [Assessment of vascular perfusion and cholesterol and estrogen levels in preovulatory follicles of mares in conditions of thermal discomfort.] Avaliação da perfusão vascular e do nível de colesterol e estrógeno em folículos préovulatórios de éguas em condições de desconforto térmico. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(Supl.2):67-74, 2016. Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. Email: jhonnatha@ig.com.br

The aim of this study was to evaluate the pattern of blood perfusion of dominant follicles after ovulation induction with hCG by ultrasound Color Doppler, and cholesterol and estrogen levels in preovulatory follicles of mares submitted or not to thermal discomfort. Therefore, estrous cycles of 15 mares were randomly distributed between comfort (Group I) and thermal discomfort (Group II) groups and monitored by transrectal ultrasonography periodically until the largest follicle reached at least 32mm of diameter. At this time, the mares received 1000IU of Chorulon® (hCG), and had the preovulatory follicle accompanied by Doppler ultrasound every 6 hours up to 24 hours, at which time the aspirations were taken from the follicular fluid of cholesterol and estrogen dosing. The follicular vascular perfusion was estimated subjective basis, taking into account the percentage of the circumference of the follicular wall with Color Doppler signals. Aspirated follicular fluid was recovered and centrifuged at 1000G for 15 minutes, and the supernatant recovered and stored in cryovials at -20°C until the estrogen dosage and cholesterol were performed. To characterize the thermal environment, the temperature and humidity index test (THI), described by Hansen (2005), was used. In order to characterize the adaptation of animals to the thermal environment, the heat tolerance coefficient (HTC) and the adaptability coefficient (AC) were used. The average THI found for the analyzed period (March and April / 2014) was 58.33, which does not characterize stressful environment for the animals. After bioclimatic analysis found HTC average values of Group I and Group II 95.47, 87.14, these averages were

* Recebido em 14 de setembro de 2016.

Aceito para publicação em 13 de outubro de 2016.

¹ Médico-veterinário. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, Km 47, Seropédica RJ, 23890-000. + Autor para correspondência, E-mail: jhonnatha@ig.com.br

² Médica-veterinária. PPGMV, UFRRJ, BR 465, Km 47, Seropédica RJ, 23890-000. E-mail: danimelloveterinaria@hotmail.com

³ Médica-veterinária. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ), UFRRJ, BR 465, Km 47, Seropédica RJ, 23890-000. E-mail: otaviareis@hotmail.com

⁴ Médica-veterinária. Autônoma, Av. Minas Gerais, 2653, Apto 101, Bairro Grã-Duquesa, Governador Valadares, MG 35057-760. E-mail: kka-gostini@gmail.com

⁵ Médico-veterinário. PhD, Professor Doutor, Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Instituto de Zootecnia (IZ), UFRRJ, BR 465, Km 47, Seropédica RJ, 23890-000. E-mail: juliorep@ufrrj.br

⁶ Médico-veterinário. PhD, Professor Doutor, Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, IZ, UFRRJ, BR 465, Km 47, Seropédica RJ, 23890-000. E-mail: mmello@ufrrj.br

statistically different ($p < 0.05$), indicating a greater tolerance of Group I when compared to Group II. The AC average found for the group I was 3.84 and the Group II 4.29, values that differed statistically ($p < 0.05$), showing greater adaptability in Group I compared to Group II. The average values of vascular perfusion of preovulatory follicles were: Group I: H0=32.5%; H6=43.75%; H12=41.85%; H18=33.75%; H24=42.5%; Group II: H0=24.85%; H6=41.42%; H12=48.57%; H18=38.57%; H24=47.14%. There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) between the percentages of follicular vascular perfusion between the groups in the analyzed moments. The mean values of cholesterol and estrogen for Groups I and II were respectively 51.62mg/ml and 46.14mg/ml and 325739.64pg/dL and 316381.05pg/dL. There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) between groups. These results demonstrate that environments that deprive the shadow animals are likely to generate thermal discomfort, even if the indices do not point stressful environment for the animal. However, this discomfort is not enough to harm steroidogenesis or percentage follicular vascularization in 24 hours.

KEY WORDS. Thermal environment, Doppler ultrasonography, equine reproduction.

RESUMO. O objetivo do presente estudo foi avaliar o padrão de perfusão sanguínea de folículos dominantes submetidos à indução da ovulação com hCG por meio da ultrassonografia Color Doppler e os níveis de colesterol e estrógeno em folículos préovulatórios de éguas submetidas ou não ao desconforto térmico. Para tanto, 15 ciclos estrais de éguas distribuídas aleatoriamente entre os grupos conforto (Grupo I) e desconforto térmico (Grupo II) foram acompanhados por ultrassonografia transretal periodicamente até que o maior folículo atingisse diâmetro maior ou igual a 32mm. Nesse momento, as éguas receberam 1000UI de Chorulon® (hCG), e tiveram o folículo préovulatório acompanhado por ultrassonografia Doppler de 6 em 6 horas, até 24 horas, momento em que foram realizadas as aspirações do fluido folicular para dosagem de colesterol e estrógeno. A perfusão vascular folicular foi estimada de maneira subjetiva levando-se em consideração o percentual da circunferência da parede folicular com sinais Doppler coloridos. O fluido folicular aspirado foi recuperado e centrifugado a 1000G por 15 minutos, sendo o sobrenadante recuperado e armazenado em criotubos a -20°C até que a dosagem de colesterol e estrógeno fosse realizada. Para caracterizar o ambiente térmico foi usado o teste do Índice de Temperatura e Umidade (ITU) segundo Hansen (2005), e para caracterizar a adaptação dos animais ao ambiente térmico foram utilizados o Coeficiente de Tolerância ao Calor (CTC) e o Coeficiente de Adaptabilidade (CA). O ITU médio encontrado para o período analisado (março e abril de 2014) foi de 58,33, o que não caracteriza ambiente estressante para os animais. Após análise dos dados bioclimáticos, foram encontra-

dos valores médios de CTC do Grupo I, 95,47 e do Grupo II, 87,14, sendo que essas médias diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$), apontando uma tolerância maior do Grupo I quando comparado ao Grupo II. A média de CA encontrada para o Grupo I foi de 3,84 e para o Grupo II de 4,29, valores que diferiram entre si ($p < 0,05$), mostrando uma maior adaptabilidade do Grupo I em relação ao Grupo II. Os valores médios de perfusão vascular dos folículos préovulatórios foram: Grupo I: H0=32,5%; H6=43,75%; H12=41,85%; H18=33,75%; H24=42,5%; Grupo II: H0=24,85%; H6=41,42%; H12=48,57%; H18=38,57%; H24=47,14%. Não foram encontradas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre o percentual de perfusão vascular folicular, entre os grupos, nos momentos analisados. Os valores médios de colesterol e de estrógeno para os Grupos I e II foram, respectivamente, 51,62mg/ml e 46,14mg/ml e 325.739,64pg/dL e 316.381,05pg/dL. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre os grupos. Estes resultados demonstram que ambientes que privam os animais de sombra são passíveis de gerar desconforto térmico, ainda que os índices não apontem ambiente estressante para o animal. No entanto, esse desconforto não foi o suficiente para prejudicar, a esteroidogênese ou percentual de vascularização folicular em 24 horas.

PALAVRAS-CHAVE. Ambiente térmico, ultrassonografia Doppler, reprodução equina.

INTRODUÇÃO

A equideocultura no Brasil teve um crescimento significativo nos últimos anos, possibilitando o aperfeiçoamento de técnicas na área reprodu-

tiva, de modo a melhorar a genética e expansão comercial do setor. O sucesso reprodutivo está diretamente ligado a fatores externos, como temperatura, estresse, fotoperíodo e nutrição, já que todos eles têm influência direta sobre a dinâmica folicular. Regiões caracterizadas por altas temperaturas, principalmente no verão, fazem com que os animais sofram adaptações fisiológicas e comportamentais para manter a homeotermia. Dentre as adaptações ocorrem alterações dos parâmetros fisiológicos, endocrinológicos, bem como do comportamento de ingestão de alimento e água. Como a reprodução é um processo de demanda energética considerável, é diretamente afetado por essas alterações. Estudos sobre a influência do clima na reprodução equina estão relacionados principalmente ao fotoperíodo. Entretanto, condições climáticas desfavoráveis podem desencadear um processo de estresse térmico e levar a alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, determinando queda ou insucesso reprodutivo. Sendo assim, há necessidade de medidas que minimizem o impacto negativo das intempéries, uma vez que, ao considerarmos a estacionalidade reprodutiva da égua, qualquer interferência na fisiologia reprodutiva, durante a estação de monta, significa prejuízo. O desconforto térmico deve ser mais estudado para que medidas preventivas possam ser adotadas no manejo dos animais. Diferente das outras espécies de mamíferos, os estudos correlacionando à atividade reprodutiva da égua e o clima, focam as avaliações nos efeitos da sazonalidade na reprodução tentando prolongar a ciclicidade de éguas na estação de monta. Sabe-se que as condições climáticas de desconforto provocam distúrbios reprodutivos em função do estresse climático e seus efeitos sobre a endocrinologia da reprodução de outras espécies. Com a diminuição da liberação das gonadotropinas (LH e FSH), a produção de estrógenos é alterada, pois afeta a capacidade esteroidogênica dos folículos e da dinâmica folicular ovariana. Altera ainda a expressão do RNAm de receptores de colesterol em células ovarianas, bem como, as concentrações de colesterol e ácidos graxos no fluido folicular ovariano de folículos de vários tamanhos como observado por Argov et al. (2005) em vacas.

O estresse térmico pode determinar mudanças nas características do fluido folicular de vacas (Roth et al. 2001), suprimir a habilidade do folículo dominante em exercer a dominância e efeito sobre a competência oocitária observando-se prejuízo ao desenvolvimento nuclear em vacas e ratas (Hansen et al. 2001, Matsuzuca et al. 2004).

A ausência de estudos sobre a atividade reprodutiva das éguas sob condições de desconforto ambiental torna essa avaliação necessária para que um manejo mais eficiente possa ser realizado de modo a minimizar os efeitos do estresse térmico sobre a reprodução da espécie e incrementar os índices reprodutivos obtidos durante a estação de monta. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o padrão de perfusão sanguínea de folículos dominantes submetidos à indução da ovulação com hCG por meio da ultrassonografia Color Doppler, e os níveis de colesterol e estrógeno em folículos préovulatórios de éguas submetidas ou não ao desconforto térmico.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IV/UFRRJ), sendo aprovado sob o de número 022/2015.

O experimento foi conduzido nos meses de março e abril de 2014 no Setor de Reprodução Animal (SFRIA) pertencente ao Departamento de Reprodução e Avaliação Animal (DRAA) do Instituto de Zootecnia da UFRRJ em Seropédica, RJ. Foram utilizados 15 ciclos estrais de éguas da raça Mangalarga Marchador, oriundas do Setor de Matrizes (Instituto de Zootecnia da UFRRJ), as quais tiveram seu trato reprodutivo previamente avaliado por ultrassonografia para certificação de que estivessem cíclicas. Em seguida foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: um grupo no qual as éguas ficaram em piquete sombreado (Grupo I; n=7) e o outro grupo em piquete com restrição de sombra (Grupo II; n=8). Todos os animais ficaram nos piquetes entre as sete horas da manhã e seis horas da tarde, recebendo durante o dia, 2% do peso vivo de matéria seca por animal, dois quilogramas de ração comercial por animal, sal mineral e água a vontade. Durante a noite, os animais ficavam soltos em piquete aberto, dispondo de capim e água à vontade. Os animais passaram por adaptação prévia de quatro meses (de novembro de 2013 a fevereiro de 2014) e informações relativas ao ciclo estral de cada égua durante os meses de março e abril (período de experimento) foram coletadas. Durante o período de experimento, os ciclos estrais das éguas foram acompanhados periodicamente com auxílio do ultrassom. No quinto dia após ovulação (D5), as éguas receberam 5mg de Lutalyse® (Lutalyse®, Dinoprost Trometamina, Pfizer, Brasil), IM, e partir de então tiveram seu trato reprodutivo avaliado por meio de ultrassonografia transretal modo B, transdutor linear de 5 MHz, periodicamente, a cada dois ou três dias. No momento em que o maior folículo atingiu diâmetro igual ou maior que 32mm, a égua recebeu uma dose de 1000UI de Chorulon® (Chorulon®, hCG, MSD, Brasil), IV, e passou a ser monitorada por ultrassonografia modo Doppler de 6 em 6 horas por 24 horas, momento em que o folículo préovulatório foi aspirado

segundo metodologia descrita por Carnevale (2004). A perfusão vascular folicular foi estimada de maneira subjetiva levando-se em consideração o percentual da circunferência da parede folicular com sinais Doppler coloridos, conforme Figura 1.

Para realização do procedimento de aspiração folicular as éguas foram sedadas utilizando 0,5mg/kg, IV, de Xilazina a 10%, 0,01mg/kg, IV, de Detomidina. Para obtenção de relaxamento retal foi utilizado 0,2mg/kg de Hyoscina N-butyl bromide (Butilescopolamina). Também foi utilizado 1,1mg/kg de Flunixin Meglumine, IV, para ação anti-inflamatória em dose única no momento da sedação e antibioticoterapia com Enrofloxacin 10%, 5mg/kg, IM, por 3 dias sendo a primeira logo após o procedimento e as outras com intervalos de 24 horas. Para facilitar o procedimento, as éguas tiveram a bexiga esvaziada através de uma sonda uretral.

O fluido folicular aspirado foi recuperado em frascos tipo Erlenmeyer, sendo posteriormente colocado em tubo Falcon de 50ml e centrifugado a 1000G por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante recuperado foi armazenado em criotubos a -20°C até que a dosagem de estrógeno e colesterol fosse realizada. A dosagem de colesterol no fluido folicular foi realizada por espectrofotometria utilizando o "kit" Cholesterol, BioSystems (REF 11506) no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) da UFRRJ. A dosagem de estrógeno no fluido folicular foi realizada por radioimunoensaio (RIA) utilizando o "kit" Ultra-Sensitive Estradiol, Beckman Coulter (REF DSL4800), em parceria com o Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense (UFF), sendo necessária uma diluição de 4.444 vezes das amostras.

A resposta dos animais aos diferentes ambientes foi acompanhada pela mensuração da temperatura retal (TR), da frequência cardíaca (FC) e da respiratória (FR). A temperatura retal foi medida em graus Celsius (°C), introduzindo-se o termômetro de mercúrio pelo ânus e o mantendo em contato com a mucosa retal por um minuto. Já a frequência cardíaca foi aferida com utilização de estetoscópio manual (batimentos por minuto) e frequência respiratória por meio de contagem dos mo-

vimentos respiratórios observados no flanco por um minuto (movimentos por minuto). Esses dados foram obtidos em dias de sol com pouca nebulosidade, pelo menos uma vez por semana, até o dia da aspiração do folículo préovulatório.

As variáveis climáticas foram obtidas por uma estação meteorológica móvel, aparelho HOBOWare Data Logger, instalada junto ao piquete de restrição de calor e conforme instruções do fabricante, e dados referentes aos meses de março e abril de 2014 foram obtidos. Os dados avaliados foram: temperatura ambiental média, máxima e mínima (°C); umidade do ar média, máxima e mínima. A caracterização do ambiente térmico foi realizada utilizando-se do Índice de Temperatura e Umidade (ITU) segundo Hansen (2005), calculado pela seguinte fórmula: $ITU = 0,8 Tbs + UR (Tbs - 14,3) / 100 + 46,3$ Onde: Tbs = temperatura do bulbo seco (°C); UR = umidade relativa do ar (%).

A avaliação da adaptabilidade dos animais ao ambiente foi obtida com a utilização dos seguintes testes: Teste de Ibéria adaptado por Muller (1982), no qual a temperatura retal foi obtida em dias ensolarados, nos horários de 07:00h, 13:00h e 17:00h, com mensurações em dias alternados por ciclo estral. Coeficiente de Tolerância ao Calor (CTC) do teste de Ibéria foi adaptado de Amakiri e Funcho (1979): $CTC = 100 - [18 (TR_{13} - TR_7)]$ Onde: CTC = coeficiente de tolerância ao calor; 100 = eficiência máxima em manter a temperatura corporal em 38°C; 18 = constante; TR₁₃ = temperatura retal às 13:00h; TR₇ = temperatura retal às 07:00h. Nesse teste o valor mais próximo de 100 implica em animais mais adaptados ao ambiente.

O Coeficiente de Adaptabilidade (CA) foi estimado, a partir de uma adaptação da fórmula de Benezra: $CA = TR/38 + FR/16 + FC/34$ Onde: CA = Coeficiente de Adaptabilidade; TR = Temperatura retal às 13:00h; FR = Frequência respiratória, em movimentos por minuto às 13:00h; FC = Frequência cardíaca, em batimentos por minuto às 13:00h horas; 38 = Temperatura retal média normal de equinos (Esmay 1983), 16 = Frequência respiratória média normal de equinos (Thomassian 1984), 34 = Frequência cardíaca média para equinos (Thomassian 1984).

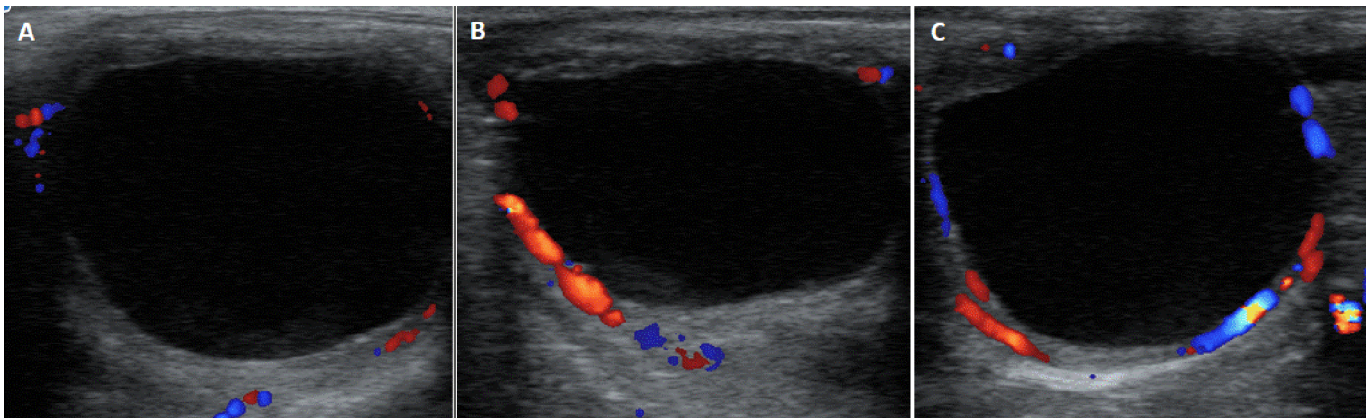


Figura 1. Exame ultrassonográfico modo color Doppler de folículos préovulatórios de éguas Mangalarga Marchador. Representação de perfusão vascular folicular subjetiva, de 0 a 100%, onde: A=15%, B=30%, C=50%.

O valor do índice obtido foi comparado a três que é observado quando os parâmetros fisiológicos não se alteram em relação ao aceito como normal, sendo considerados mais adaptados ao calor os animais com menor desvio desse valor. As variáveis climáticas e os testes bioclimáticos, bem como as variáveis fisiológicas foram mensurados de modo a obter subsídios para interpretação da influência das diferentes condições climáticas sobre a vascularização do folículo préovulatório após indução com hCG e níveis de colesterol e estrógeno do fluido folicular de éguas.

A análise estatística dos dados relativos à bioclimatologia foi realizada pelo teste de Tukey, para as variáveis CTC e CA. Os dados relativos à ultrassonografia Doppler foram submetidos ao teste de Friedman, que por se tratar de uma avaliação subjetiva utilizou-se um teste estatístico não-paramétrico. Dados relativos à dosagem de colesterol e estrógeno foram submetidos ao teste t de Student. O nível de significância estatística foi definido como 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico Bioestat versão 5.4 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá).

RESULTADOS

O ITU médio obtido para o período do experimento foi de 59,28, sendo 60,24 no mês de março e 58,33 no mês de abril. O resultado médio obtido após análise dos dados referentes ao CTC (Tabela 1) foi de 95,47 para o Grupo I (sombreado) e 87,14 para o Grupo II (restrição de sombra).

Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, demonstrando uma maior capacidade das éguas do Grupo I (sombreado) em relação às do Grupo II (restrição de sombra) em manter a temperatura retal constante, uma vez que para o cálculo deste índice, foi levada em consideração a temperatura retal das 07 e das 13 horas. A temperatura retal média encontrada às 7 e 13 horas no Grupo I foi de 37,5°C e 37,8°C, respectivamente. Já para o Grupo II, as médias foram de 37,4°C e 38,2°C, respectivamente, às 7 e 13 horas. Essas médias não diferiram significativamente entre si, ou entre os grupos. Em se tratando do CA, os resultados médios obtidos estão apresentados a seguir (Tabela 2).

Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, demonstrando uma maior adaptabilidade do Grupo I em relação ao Grupo II, já que, para esse teste, resultados mais próximos de três indicam animais mais adaptados ao ambiente. Este índice leva em consideração a temperatura retal e a frequência respiratória e cardíaca dos animais. O nível médio de colesterol dosado no fluido folicular das éguas do Grupo I (sombreado) foi de 51,625 mg/dL, e a média dosada para o Grupo II

(restrição de sombra) foi de 46,142 mg/dL (Tabela 3). O nível médio de estrógeno no fluido folicular no Grupo I (sombreado) foi de 325,73ng/ml, enquanto a dosagem média encontrada para o Grupo II (restrição de sombra) foi de 316,38ng/ml (Tabela 3). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) entre a média dos dois grupos, tanto no que se refere ao nível de colesterol, quanto no que se refere ao nível de estrógeno no fluido folicular.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da avaliação subjetiva da perfusão vascular folicular (PVF) após a indução com hCG, nas diferentes horas em que os folículos préovulatórios foram avaliados (da indução até o momento da aspiração folicular). No momento da indução da ovulação com hCG (H0), as éguas do Grupo I apresentaram média de PVF superior as éguas do Grupo II. Seis horas após a indução (H6) houve um aumento na

Tabela 1. Índice médio e erro padrão do Coeficiente de Tolerância ao Calor obtido para o Grupo I (sombreado) e Grupo II (restrição de sombra).

Índice	Grupo I (n=7)	Grupo II (n=8)
CTC	95,47 ^a ±1,41	87,14 ^b ±1,35

CTC = Coeficiente de Tolerância ao Calor.

^{ab} Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 2. Índice médio e erro padrão do Coeficiente de Adaptabilidade obtido para o Grupo I (sombreado) e Grupo II (restrição de sombra).

Índice	Grupo I (n=7)	Grupo II (n=8)
CA	3,84 ^a ±0,06	4,29 ^b ±0,15

CA = Coeficiente de Adaptabilidade.

^{ab} Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 3. Níveis médios e erro padrão de colesterol e estrógeno para Grupo I (sombreado) e Grupo II (restrição de sombra).

	Grupo I	Grupo II
Colesterol (mg/dL)	51,62 ^a ±2,38	46,14 ^a ±4,48
Estrógeno (ng/ml)	325,74 ^b ±51,10	316,38 ^b ±98,24

^{ab} Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 4. Média da avaliação subjetiva da perfusão vascular de folículos préovulatórios ao momento da indução (H0), 6h, 12h, 18h da indução e momento da aspiração (H24).

	H0	H6	H12	H18	H24
Grupo I	32,5 ^a	43,7 ^b	41,8 ^c	33,7 ^d	42,5 ^e
Grupo II	24,8 ^a	41,4 ^b	48,5 ^c	38,5 ^d	47,1 ^e

^{abcd} Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($P > 0,05$).

PVF, sendo esse aumento mais acentuado nas éguas do Grupo I. Doze horas após a indução (H12), as éguas do Grupo I apresentaram uma redução na perfusão vascular enquanto as éguas do Grupo II mantiveram aumento na PVF média, em relação ao momento H12. Em H18, os dois grupos apresentaram taxa de PVF menor quando comparado ao momento anterior e no momento seguinte, H24, momento da aspiração folicular, ambos os grupos apresentavam PVF maior quando comparados ao momento anterior.

DISCUSSÃO

De acordo com Hahn (1985) um valor de ITU de 70 ou menos mostra uma condição normal; valores entre 71 e 78 indicam uma condição crítica; entre 79 e 83 existe um perigo e acima de 83 uma condição de emergência está presente. Portanto, os ITUs de março e abril estão dentro da faixa compreendida como confortável para os animais, no entanto, para o cálculo desse índice, considera-se a temperatura e umidade médias do dia e não os momentos nos quais as mensurações de frequência cardíaca, respiratória e temperatura retal foram feitas. Outro ponto a ser considerado refere-se ao fato do experimento ter sido realizado nos meses de março e abril, fim de verão (até 20 de março) e outono (20 de março a 31 de abril), quando a média de temperatura diária já se encontra mais amena. E ainda, segundo Rammerstorfer et al. (2001), apenas essas informações de temperatura e umidade não seriam suficientes para quantificar o grau do estresse a que estariam submetidos nesse ambiente, pois, além de informações climáticas, parâmetros inerentes ao animal também devem ser considerados.

Os animais se mostraram capazes de manter a temperatura abaixo de 38°C, que é a temperatura considerada normal para equinos (Esmay 1979), respeitando uma variação normal que existe nos homeotérmicos de 0,5°C para mais ou para menos. Anderson (1977) comenta que, em animais que são normalmente ativos durante o dia, há uma variação normal da temperatura corporal que é mínima, pela manhã, e máxima, no período da tarde, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

Ao observarmos as médias do parâmetro coeficiente de adaptabilidade obtidas para os diferentes grupos, constatou-se que a frequência respiratória foi o parâmetro que mais se distanciou do que é considerado fisiológico, tanto para o Grupo I quanto para o Grupo II, sendo este distanciamento mais acentuado no Grupo II. Paludo et al. (2002), que

justificaram ser essa característica a primeira linha de defesa fisiológica do animal, quando submetido ao estresse térmico, denotando assim ser passível de maior variação. A alteração na frequência respiratória parece ser o mecanismo termorregulatório mais facilmente usado pelos equinos em ambiente quente (Oliveira et al. 2008). Adicionalmente, a média de temperatura retal manteve-se dentro do parâmetro considerado normal nos dois grupos, o que indica adaptabilidade dos animais, uma vez que estes usam do aumento na frequência respiratória e frequência cardíaca para manterem a temperatura corporal o mais próximo possível do normal (Oliveira et al. 2008). Desta forma, fica evidente que os animais do Grupo II sofreram desconforto térmico, mas não estresse térmico, e que usaram da respiração e dos batimentos cardíacos, os recursos para a manutenção da temperatura corporal, sendo assim, considerados adaptados. Tal adaptação provavelmente fez com que não tivessem prejuízos na fisiologia reprodutiva, uma vez que o acréscimo na temperatura corporal em decorrência do estresse térmico é capaz de comprometer taxa de fertilização oocitária (Hansen 2001, Sartori et al. 2002), pois prejudica a capacidade esteroidogênica das células da teca e da granulosa (Rensis & Scaramuzzi 2003).

Após análise dos dados bioclimáticos e constatação da adaptabilidade dos animais ao ambiente, não era esperado que fossem encontradas diferenças nas concentrações de estrógeno e de colesterol entre os animais do Grupo I e do Grupo II. Em função da adaptação dos animais, o ambiente não foi capaz de provocar alterações na temperatura corporal dos mesmos, e a manutenção da temperatura corporal provavelmente impediu uma alteração da capacidade esteroidogênica das células da teca e da granulosa, reduzindo a atividade da aromatase e, conseqüentemente, as concentrações de estradiol em células ovarianas, bem como as concentrações de colesterol total e ácidos graxos no fluido folicular ovariano de folículos de vários tamanhos (Rensis & Scaramuzzi 2003, Argov et al. 2005, Ozawa et al. 2005, Shehab-El-Deen et al. 2010).

Caso fosse constatado que animais não se adaptaram e encontrássemos os mesmos resultados, estes poderiam ser explicados pelo fato de termos induzido a ovulação dos animais com hCG, uma vez que o tratamento com hCG causa, em folículos préovulatórios, a indução da expressão gênica do RNAm desta proteína nas células da granulosa (Kerban 1999). Além disso, o balanço energético negativo é associado à redução na concentração

de insulina, o que causaria uma diminuição nos efeitos estimulatórios da insulina sobre a secreção hipofisária de LH, devido aos efeitos sobre a liberação de GnRH e incremento no “feedback” negativo causado pelo estradiol. Causaria também o declínio na insulina ligada ao fator de crescimento-I (IGF-I) alterando diretamente a função ovariana (Fuck et al. 2000). Os animais utilizados no presente estudo, antes de iniciar o experimento, recebiam exclusivamente pasto nativo como alimentação, e passaram a receber feno de alfafa, ração comercial e sal mineral. Durante os meses em que ficaram em experimentação, foi notada uma melhora no escore de condição corporal – ECC (dados não mostrados) desses animais, fator que está diretamente ligado a balanço energético positivo. Segundo Rodrigues et al. (2011), o ECC influencia o tamanho do folículo préovulatório e o diâmetro do folículo préovulatório, de acordo com Ginther (2000) e Hafez & Hafez (2004), está relacionado com células da granulosa mais ativas e, conseqüentemente, com melhor qualidade do oócito e do embrião.

Em nenhum dos momentos avaliados houve diferença estatística significativa entre a taxa de PVF média dos dois grupos. Assim como para os níveis de estrógeno e de colesterol no fluido folicular das éguas dos dois grupos, após a análise bioclimática, não eram esperadas que fossem encontradas diferenças significativas na porcentagem de perfusão vascular entre os grupos, uma vez que o estresse térmico não foi causado. Além disso, no que se refere à irrigação dos folículos préovulatórios avaliados por ultrassonografia Color Doppler, foi sugerido que as concentrações plasmáticas mais baixas de LH durante a transição de primavera levam à menor perfusão vascular folicular e subsequente atresia folicular (Acosta et al. 2004). Por ter sido utilizado o hCG nos dois grupos, pode explicar a não diferença estatística significativa encontrada entre a média dos dois grupos em nenhum dos cinco momentos em que o folículo préovulatório foi avaliado. Em casos de ovulação espontânea, Gastal et al. (2006) encontraram um aumento progressivo na perfusão vascular do folículo préovulatório, atingindo valores máximos, entre 80 e 90% de pontos coloridos Doppler presentes na parede folicular, durante 36 e 12 horas prévias à ovulação, seguido por uma diminuição brusca nas últimas quatro horas. No presente estudo, perfusões vasculares foliculares com esses índices não foram encontradas, sendo que essa diferença pode ter ocorrido em função das diferentes metodologias utilizadas nos experimentos (ovulação induzida versus ovulação espontânea).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que: 1) As condições ambientes não foram capazes de causar estresse térmico aos animais; 2) Os animais do Grupo II (restrição de sombra) sofreram desconforto térmico, mas se mostraram adaptados quando foram capazes de manter a temperatura retal dentro dos parâmetros de normalidade; 3) O desconforto térmico não foi capaz de alterar os níveis de perfusão vascular dos folículos préovulatórios; 4) Os níveis de estrógeno e de colesterol no fluido folicular não sofreram alteração nas éguas mantidas em condições de desconforto térmico.

REFERÊNCIAS

- Acosta T.J., Beg M.A. & Ginther O.J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. *Biology of Reproduction*, 71:637-642, 2004.
- Amakiri S.F. & Funcho O.N. Studies of rectal temperature, respiratory rates and heat tolerance in cattle in the humid tropics. *Animal Production*, 28:329-335, 1979.
- Anderson B.E. Temperature regulation and environmental physiology. In: *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 9th ed. Cornell University Press, Ithaca, 1977, p.686-695.
- Argov N., Moallem U. & Sklan D. Summer heat stress alters the mRNA expression of selective-uptake and endocytotic receptors in bovine ovarian cells. *Theriogenology*, 64:1475-1489, 2005.
- Carnevale E.M. Oocyte transfer and gameta intrafallopian transfer in the mare. *Animal Reproduction Science*, 82:617-624, 2004.
- Esmay M.L. *Principles of animal environment*. 2nd ed. AVI Publishing Co Inc, 1983, p.358.
- Esmay M.L. *Principles of animal environment*. Westport: The AVI Publishing Company, (Environmental Engineering in Agriculture and Food Series), 1979. 325p.
- Fuck E.J., Moraes G.V. & Santos G.T. Fatores nutricionais na reprodução das vacas leiteiras. I. Energia e proteína. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 24:147-161, 2000.
- Gastal E.L., Gastal M.O. & Ginther O.J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour Doppler signal in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction Research*, 131:699-709, 2006.
- Ginther O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*, 60:61-79, 2000.
- Hafez E.S.E. & Hafez B. *Reprodução animal*. 7ª ed. Manole, São Paulo, 2004. 513p.
- Hahn G.L. Management and housing of farm animals in hot environments, p.151-174. In: Yousef M.K. (Ed.), *Stress Physiology in Livestock*. Vol. II. Ungulates. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1985.
- Hansen P.J., Drost M., Rivera M.R., Paula-Lopes F.F., Al-Katanani M.Y., Krininger E.C. & Chase C.C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, 55:91-103, 2001.
- Hansen J.P. Managing the Heat-Stressed Cow to Improve Reproduction. *Proceedings of the 7th Western Dairy Management Conference*, 1:9-11, 2005.
- Kerban A., Boerboom D. & Sirois J. Human chorionic gonadotropin induces an inverse regulation of steroidogenic acute regulatory proteins messenger ribonucleic acid in theca interna and granulosa cells of equine preovulatory follicles. *Endocrinology*, 140:667-674, 1999.
- Matsuzuka T., Ozawa M., Hirabayashi M., Ushitani A. & Kanai Y. Developmental competence and glutathione content of maternally

- heat stressed mouse oocytes and zygotes. *Animal Science Journal*, 75:117-24, 2004.
- Müller P.B. *Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos*. 3ª ed. Sulina, 1982, p.262.
- Oliveira A.L., Campel J.E.G., Azevedo D.M.M.R., Costa A.P.R., Turco S.H.N. & Moura J.W.S. Estudo de respostas fisiológicas de equinos sem raça definida e da raça Quarto de Milha às condições climáticas de Teresina, Piauí. *Ciência Animal Brasileira*, 9:827-838, 2008.
- Ozawa M., Tabayashi D., Latief L.A., Shimizu T., Oshima I. & Kanai Y. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. *Reproduction*, 129:621-630, 2005.
- Paludo G.R., McManus C., Melo R.Q., Cardoso A.G., Mello F.P.S., Moreira M. & Fuck B.H. Efeito do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do Exército Brasileiro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31:1130-1142, 2002.
- Rammerstorfer C., Potter G.D., Brumbaugh G.W., Gibbs P.G., Varner D.D. & Rammerstorfer E.H. Physiologic responses of acclimatized or non-acclimatized mature reining horses to heat stress. *Journal of Equine Veterinary Science*, 21:431-438, 2001.
- Rensis F.D. & Scaramuzzi J.R. Heat Stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. *Theriogenology*, 6:1139-1151, 2003.
- Rodrigues P.G., Raymundo C.M., Souza J.C., Miranda M.C.M.G. & Rezende A.S.C. Gordura corporal e eficiência reprodutiva em éguas doadoras de embrião Mangalarga Marchador. *Ciência e Agrotecnologia*, 5:1002-1008, 2011.
- Roth Z., Meidan R., Braw-Tal R., Shaham-Albalancy A. & Wolfenson D. Delayed effect of heat stress on steroidogenesis in bovine medium-size and preovulatory follicles. *Reproduction*, 121:745-751, 2001.
- Sartori R., Sartor-Bergfelt R., Mertens S.A., Guenther J.N., Parrish J.J. & Wilbank M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, 85:2803-2812, 2002.
- Shehab-El-Deen M., Fadel M.S., Soom A.V., Saleh S.Y., Mães D. & LeRoy J.L.M.R. Circadian rhythm of metabolic changes associated with summer heat stress in high-producing dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 42:1119-1125, 2010.
- Thomassian A. *Enfermidades dos cavalos*. Varela, Botucatu, 1984. 320p.